

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kristýna Slabá

**Role proteinů tepelného šoku v patogenezi
placentární insuficience**

**Role of heat shock proteins in pathogenesis of
placental insufficiency**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci na téma *Role proteinů tepelného šoku v patogenezi placentární insuficience* zpracovala samostatně pod vedením své školitelky prof. RNDr. Ilony Hromadníkové, Ph.D. a za použití uvedených informačních zdrojů a literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 8. 2015

Kristýna Slabá

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. a kolegyním v laboratoři, Mgr. Kateřině Kotlabové a Mgr. Lence Dvořákové, které mi ochotně poskytly odbornou pomoc a cenné rady při vypracování mé diplomové práce.

Pracoviště

Výzkum v rámci své diplomové práce jsem prováděla na Oddělení molekulární biologie a patologie buňky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Finančně byl podpořen grantem PRVOUK 32.

Abstrakt

Proteiny tepelného šoku (Hsp) jsou vysoce konzervované proteiny, které jsou součástí univerzální stresové odpovědi buňky. Jejich hlavní funkcí je ochrana buňky před strukturním a funkčním poškozením. U organismů vystavených různým formám stresu, jako je např. nedostatek živin či vody, hypoxie, infekce nebo zánět, byla prokázána zvýšená genová exprese těchto proteinů. Těhotenské komplikace představují pro organismus matky i plodu stresové podmínky, v jejichž důsledku může dojít ke zvýšení genové exprese Hsp. Ve své diplomové práci jsem zjišťovala koncentraci extracelulárních mRNA pěti různých proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1) v plazmě těhotných žen a zda je tato koncentrace ovlivněna případnými těhotenskými komplikacemi (preeklampsie, fetální růstová retardace a gestační hypertenze). Dále jsem zjišťovala možné korelace mezi plazmatickou koncentrací mRNA pro Hsp a hodnot indexů pulsatility (PI) získaných Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením. Tento výzkum by měl napomoci vynalezení nové prediktivní metody vybraných těhotenských komplikací, založené na detekci specifických biomarkerů v prvním trimestru těhotenství.

Výzkum jsem prováděla na plazmách získaných z periferní krve těhotných žen, jejíž odběr byl prováděn v době klinické manifestace těhotenských komplikací. Studovaná kohorta zahrnovala ženy s fyziologickým těhotenstvím, preeklampií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí. Ze vzorků plazmy jsem izolovala RNA a následnou kvantifikaci Hsp mRNA jsem provedla pomocí kvantitativní RT-PCR v reálném čase. Míru genové exprese Hsp jsem zjišťovala pomocí komparativní Ct metody s využitím β -aktinu, jako endogenní kontroly. Výsledky ukázaly signifikantní zvýšení koncentrace mRNA pro Hsp70 u vzorků patologií (preeklampsie s/bez fetální růstové retardace, fetální růstová retardace, gestační hypertenze) v porovnání se skupinou žen s fyziologickým těhotenstvím. Analýza koncentrace mRNA u skupin jednotlivých diagnóz ukázala statisticky signifikantní zvýšení exprese Hsp70 u žen s preeklampií (s/bez fetální růstové retardace) a u žen s gestační hypertenzí v porovnání s fyziologickým těhotenstvím. Zvýšení koncentrace mRNA pro Hsp70 oproti kontrolním vzorkům bylo také pozorováno u skupin mírné a závažné preeklampsie a dále u skupin preeklampsie s ukončeným těhotenstvím před 34. týdnem gravidity a po 34. týdnu gravidity. Mezi koncentrací mRNA pro Hsp v plazmě a hodnotami indexů pulsatility nebyla pozorována žádná korelace.

Klíčová slova

proteiny tepelného šoku, placentární insuficience, těhotenské komplikace, preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze, kvantifikativní RT-PCR v reálném čase

Abstract

Heat shock proteins (Hsp) are highly conserved proteins that are part of the universal stress response of the cell. Their main function is to protect cells against structural and functional damage. Organisms exposed to different forms of stress, such as e.g. a lack of nutrients or water, hypoxia, infection or inflammation, demonstrated an increased gene expression of these proteins. Pregnancy complications cause stress conditions for maternal and fetal organism, which may result in an increased gene expression of Hsp. In my thesis, I examined the concentration of extracellular mRNA for five different heat shock proteins (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1) in the plasma of pregnant women and whether this concentration is affected by possible pregnancy complications (preeclampsia, fetal growth restriction and gestational hypertension). I also investigated a possible correlation between mRNA plasma concentration for Hsp and pulsatility index values (PI) obtained by Doppler ultrasound. This research should help to invent a new predictive method for pregnancy complications, based on a detection of specific biomarkers in the first trimester of pregnancy.

The research was conducted on plasma samples obtained from peripheral blood of pregnant women, whose collection was performed during clinical manifestations of pregnancy complications. The studied cohort included women with a normal pregnancy, preeclampsia, fetal growth retardation and gestational hypertension. I isolated RNA from plasma samples and subsequent quantification of Hsp mRNA was performed by using real-time quantitative RT-PCR. Changes in gene expression of Hsp were examined by using comparative Ct method (β -actin was used as an endogenous control). The results showed a significant increased concentration of Hsp70 mRNA in a group of women with pathological pregnancy (preeclampsia with / without fetal growth retardation, fetal growth retardation, gestational hypertension) compared with the group of women with physiological pregnancy. Analysis of mRNA levels in individual diagnoses groups showed a statistically significant increase in expression of Hsp70 in plasma of women with preeclampsia (with / without fetal growth retardation) and in women with gestational hypertension in comparison with the group of women with physiological pregnancy. Elevated concentration of Hsp70 mRNA was also observed in the groups of patients with mild and severe preeclampsia and in the groups of women with preeclampsia with terminated pregnancy before 34th week of gestation and after the 34th week of gestation. No correlation between Hsp mRNA concentration in plasma and pulsatility index values was found.

Key words

heat shock proteins, placental insufficiency, pregnancy complications, preeclampsia, fetal growth retardation, gestational hypertension, real-time quantitative RT-PCR

Obsah

1.	SEZNAM ZKRATEK	9
2.	ÚVOD	11
2.1.	Placentární insuficience	11
2.1.1.	Etiologie a patofyziologie placentární insuficience	11
2.2.	Vybrané těhotenské komplikace	18
2.2.1.	Hypertenzní poruchy v těhotenství	18
2.2.2.	Fetální růstová retardace	21
2.3.	Diagnostika a predikce těhotenských komplikací	23
2.3.1.	Markery těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí	24
2.4.	Proteiny tepelného šoku	29
2.4.1.	Rodina malých Hsp	29
2.4.1.	Rodina Hsp60	30
2.4.2.	Rodina Hsp70	31
2.4.3.	HspBP1	32
2.4.1.	Rodina Hsp90	32
2.4.2.	Expresce proteinů tepelného šoku v těhotenství	33
2.4.3.	Role proteinů tepelného šoku v patogenezi placentární insuficience	36
3.	HYPOTÉZA A CÍLE PRACE	39
4.	MATERIÁL A METODY	40
4.1.	Pacientky	40
4.2.	Metody	42
4.2.1.	Izolace RNA z krevní plazmy	42
4.2.2.	Kvantitativní RT-PCR v reálném čase	43
4.2.3.	Metodika zpracování výsledků	46
5.	VÝSLEDKY	47
5.1.	Koncentrace mRNA pro Hsp v plazmě	47
5.2.	Plazmatická koncentrace mRNA pro Hsp a závažnost těhotenských komplikací	50
5.3.	Vztah mezi plazmatickou koncentrací mRNA pro Hsp a výsledky Dopplerovského ultrazvukového vyšetření	52
6.	DISKUZE	54
7.	SOUHRN	58
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1. SEZNAM ZKRATEK

A1M	α 1-mikroglobulin
AGT	angiotenzinogen
Apaf-1	apoptotický peptidázu aktivující faktor 1
ATP	adenosintrifosfát
COX-2	cyklooxygenáza 2
CPR	cerebroplacentární poměr
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FG	fyziologické těhotenství
FGR	fetální růstová retardace
HbF	fetální hemoglobin
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Plateles count</i>
HIF1 α/β	hypoxií-indukovaný faktor 1 α/β
HLA	lidský leukocytární antigen
HSF-1	<i>heat shock factor 1</i>
Hsp	protein tepelného šoku
HspBP1	Hsp70-vazebný protein 1
IFN	interferon
IL	interleukin
IUGR	intrauterinní růstová retardace
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
MAP	mitogenem aktivovaná protein kináza
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MMP	matrixová metaloproteináza
NK	<i>natural killer</i>
NO	oxid dusný
NOS	syntetáza oxidu dusného
OR	poměr šancí (<i>odds ratio</i>)
PAPP-A	těhotenský plazmatický protein A
PE	preeklampsie
PI	index pulsatility

PIGF	placentární růstový faktor
PP13	placentární protein 13
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	polymerázová řetězcová reakce spojená s reverzní transkripcí
SBD	substrát vazebná doména
s-Eng	solubilní endoglin
sFlt-1	solubilní fms-podobná tyrozin kináza 1
SGA	konstitučně malý plod (<i>small for gestational age</i>)
sHsp	malé proteiny tepelného šoku
TGF β	transformující růstový faktor β
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
tt	týden těhotenství
ÚPMD	Ústav pro péči o matku a dítě
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
β -hCG	β podjednotka lidského choriového gonadotropinu

2. ÚVOD

V úvodu své diplomové práce bych ráda charakterizovala placentární insuficienci, její etiologii a patofyziologii, vybrané těhotenské komplikace a jejich diagnostiku. Následně je několik kapitol věnováno proteinům tepelného šoku, jejich funkci a současnému významu v diagnostice těhotenských komplikací.

2.1. Placentární insuficience

Placenta je dočasný orgán, jenž během těhotenství zajišťuje několik nezbytných funkcí. Zprostředkovává transport dýchacích plynů mezi mateřskou a fetální krví, zásobování plodu živinami, exkreci jeho odpadních látek, hormonální produkci a vytváří imunologickou bariéru. Správná funkce placenty je zásadní podmínkou pro správný růst a vývoj plodu. Patofyziologický stav, kdy placenta není plně funkční a výměna látek mezi matkou a plodem je tedy narušena, je nazýván placentární insuficience. K té dochází především narušením imunologické tolerance mezi matkou a plodem, nedostatečnou trofoblastickou invazí do endometria a působením endoteliálních faktorů. Výsledná hypoxie a nutriční insuficience má negativní dopad na vývoj vitálně důležitých orgánů plodu, zejména ledvin, jater, plic a mozku. Placentární insuficience může být akutní či chronická. Akutní placentární insuficience je výsledkem komplikací před porodem nebo během porodu. Chronická se zpravidla projevuje během druhého či třetího trimestru a je spojena s těhotenskými komplikace, především s preeklampsí (PE) a intrauterinní růstovou retardací (IUGR).

2.1.1. Etiologie a patofyziologie placentární insuficience

K narušení funkce placenty může dojít u jakékoliv těhotné ženy, existují však rizikové faktory, které pravděpodobnost rozvoje placentární insuficience zvyšují. Často se tyto komplikace objevují u žen s chronickým vysokým krevním tlakem, anémií či poruchou srážlivosti krve. Mezi další onemocnění, která mohou mít podíl na narušení funkce placenty, patří především autoimunitní onemocnění, např. diabetes 1. typu. Negativní vliv má také obezita či užívání návykových látek. Mezi další rizikové faktory patří například i věk matky, kdy z pohledu pravděpodobnosti rozvoje placentární insuficience je rizikové těhotenství do 20 let matky a po jejím 35. roce. Na rozvoji placentární insuficience se pravděpodobně podílejí i genetické predispozice, často právě v kombinaci s některými výše zmíněnými rizikovými faktory.

Etiologie a patofyziologie placentární insuficience zatím není zcela objasněna. Jde o složitý patologický stav, který může být způsobem fetálními, placentárními i mateřskými faktory a pravděpodobně se ve většině případů jedná o kombinaci více faktorů. Počátky rozvoji placentární insuficience zpravidla spadají do prvního trimestru, ke klinické manifestaci však dochází až v druhém či třetím trimestru. Na základě studií, které byly na toto téma uskutečněny, vzniklo několik hypotéz rozvoje placentární insuficience. Počátek rozvoje tohoto patologického stavu je komplexní proces, kde pravděpodobně hrají roli v různé míře všechny z uvedených hypotéz. Jednotlivé hypotézy se tedy navzájem prolínají a doplňují. Podívejme se nyní na jednotlivé tyto hypotézy.

2.1.1.1. Hypotéza spojená s poruchou imunologické tolerance

Hlavní příčinou placentární insuficience je pravděpodobně narušení imunologické tolerance mezi matkou a plodem (Wang et al. 2002). Vzhledem k tomu, že u fetoplacentární jednotky se vyskytují jak mateřské, tak i paternální antigeny, jde vlastně o tolerovaný semi-alogenní štěp. Poruchy imunoregulačních mechanismů často vedou k potratům a poruchám plodnosti. Při částečném narušení imunologické tolerance se plod vyvíjí, nicméně těhotenství může být ohroženo těhotenskými komplikacemi, zejména placentární nedostatečností. Fetoplacentární jednotka je v takovém případě odmítána podobně jako štěp u alogenních transplantací (Sibai et al. 2005; Einarsson et al. 2003; Dekker et Robillard 2003).

Hlavní roli v narušení imunologické tolerance matky vůči plodu hrají pravděpodobně glykoproteiny MHC I. třídy. U člověka jsou tyto glykoproteiny označovány jako HLA antigeny a jsou exprimovány na povrchu jaderných buněk. Můžeme je rozdělit na klasické (HLA-A, HLA-B, HLA-C) a neklasické (HLA-E, HLA-F, HLA-G). Invaze trofoblastických buněk do deciduy a následná arteriální transformace vede k přímému kontaktu mateřských a trofoblastických buněk. Aby byla tato invaze umožněna, trofoblastické buňky nevystavují na svých buňkách klasické HLA proteiny (chybí všechny klasické HLA, kromě HLA-C) a naopak exprimují neklasické HLA-G a HLA-E, které se významně podílejí na navození tolerance mateřského imunitního systému vůči plodu.

V počátcích rozvoje placentární insuficience je pravděpodobně klíčové glykoproteiny HLA-C na povrchu trofoblastických buněk. Otcovské HLA-C jsou rozpoznávány mateřskými deciduálními T buňkami a především hojnějšími deciduálními NK buňkami. Rozpoznávání HLA-C trofoblastických buněk mateřskými NK buňkami je významně ovlivněno polymorfismem HLA-C a NK buněčných receptorů. Lidský genom obsahuje více než 100 alel

genu pro HLA-C. Receptory lidských NK buněk jsou kódovány 17 různými geny, z nichž každý má navíc vlastní polymorfismus. Jde o inhibiční a aktivační receptory a poměr jejich signálů rozhoduje o aktivaci NK buněk. V lidské populaci jsou dva haplotypy NK receptorů označované A a B, kde B haplotyp obsahuje větší počet aktivačních NK receptorů. Deciduální NK buňky produkují chemokiny a angiogenní cytokiny, které podporují trofoblastickou invazi. Jejich sekrece je stimulována ligací NK receptorů haplotypu B a snižována ligací NK receptorů haplotypu A (shrnuto v (Mofett et Hiby 2007)). Mateřský genotyp NK receptorů může být tedy AA, AB nebo BB a každý tento genotyp vede k aktivaci NK buněk v jiné míře. Haplotypy HLA-C můžeme na základě dimorfismu v pozici 80 v $\alpha 1$ doméně rozdělit na dvě skupiny: C1 a C2, přičemž HLA-C2 reaguje s NK receptory silněji, než HLA-C1 (Rajagopalan et Long 2005). Zdá se, že kombinace fetálních HLA-C2 a maternálních BB NK receptorů je nejvhodnější ke správnému průběhu trofoblastické invaze. Naopak kombinace HLA-C2 a AA NK receptorů vede k vyšší pravděpodobnosti mělké trofoblastické invaze a rozvoji placentární insuficience (Hiby et al. 2004).

2.1.1.2. Hypotéza založená na placentárních faktorech

Tato hypotéza je založena na nedostatečné trofoblastické invazi, spočívající v neschopnosti extravilózního trofoblastu invadovat myometrální segment spirálních arterií. V uteroplacentárním řečišti dojde k nedostatečné remodelaci spirálních arterií s vysokým odporem a následkem toho dochází ke snížení průtoku krve placentou. Jde o multifaktoriální hypotézu, která úzce souvisí především s hypotézou poruchy imunologické tolerance a hypotézou spojenou s působením cirkulačních a endoteliálních faktorů.

Invaze trofoblastu probíhá ve dvou vlnách, k první dochází v 10. týdnu těhotenství (tt) a druhá vlna začíná o 4 – 5 týdnů později. Na základě toho hypotéza uteroplacentární ischemie předpokládá dvoufázový vývoj placentární insuficience. V první fázi vede snížená exprese adhezivních molekul k mělkému zanoření trofoblastu do endometria a nedostatečný průtok krve vede k ischemii placenty a indukci oxidativního stresu (Gupta et al. 2005; shrnuto v (Khalil et Granger 2002)). Druhá fáze je pak mateřský syndrom charakterizovaný systematickou zánětlivou odpovědí (Redman et Sargent 2000), zahrnující trombózu, leukocytární a endoteliální dysfunkci (Redman et Sargent 2004). V pozdějších fázích těhotenství vznikají v důsledku této mateřské odpovědi klinické příznaky onemocnění. Správná diferenciací trofoblastu na syncytiotrofoblast (vnější část) a cytotrofoblast (vnitřní část), ke které dochází během gestace, je také klíčovým krokem pro následnou invazi.

Ukazuje se, že zásadní roli hraje vrstva cytotrofoblastu oddělující embryo od endometria. Endovaskulární cytotrofoblasty transformují během gestace svůj fenotyp tak, aby napodobily endoteliální buňky, které později nahradí. Zhou a jeho kolegové dokázali, že rozvoj preeklampsie souvisí se selháním této transformace cytotrofoblastického fenotypu (Zhou et al. 1997). V případě fyziologického těhotenství se na počátečních vaskulárních změnách podílejí zejména intersticiální trofoblasty a lymfocyty, především NK buňky. Tyto fyziologické změny vedou k vytvoření arteriol s nízkým odporem a bez mateřské vazomotorické kontroly, což umožňuje podstatné zvýšení prokrvení plodu.

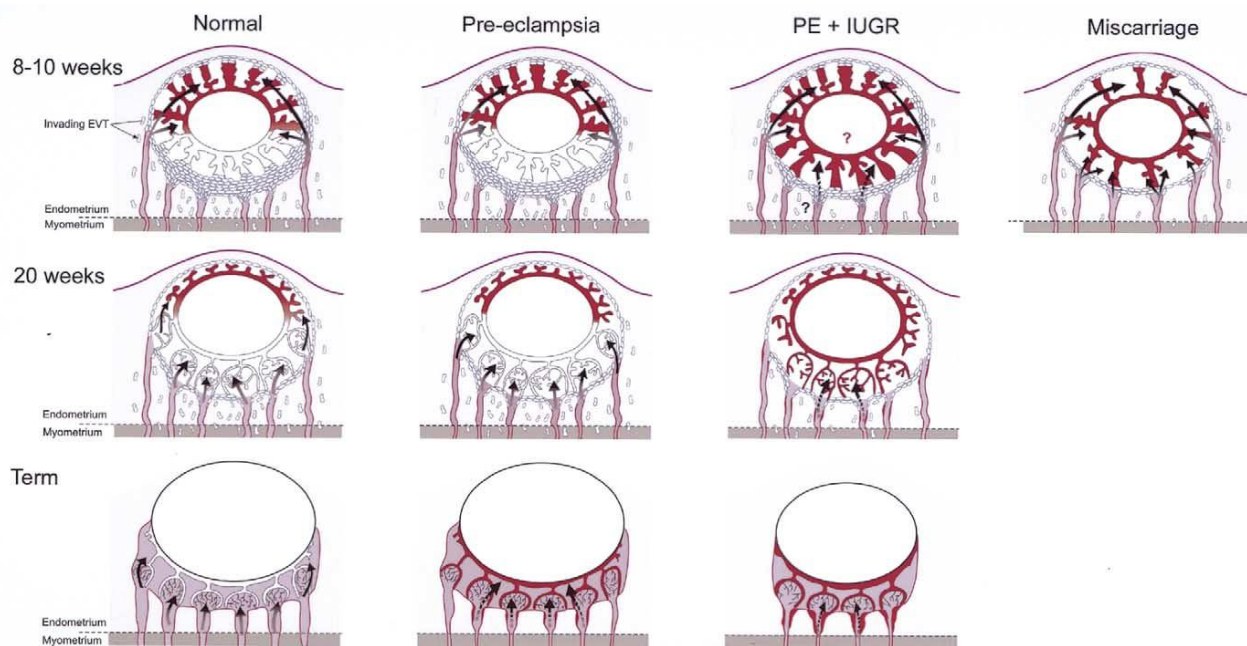
V brzkých fázích gestace se nedostatečná invaze trofoblastu zpravidla nijak neprojevuje a k její klinické manifestaci dochází až v pozdějších fázích těhotenství, kdy jsou výrazně zvýšeny metabolické nároky plodu. Nízký průtok spirálních cév a jejich mělká invaze do placenty vede k ischemii placenty a následnému vyplavení regulačních faktorů do krevního oběhu matky. Důležitou roli zde hraje dysbalance pro- a anti-angiogenních faktorů. Maynard a jeho kolektiv zkoumaly hladiny anti-angiogenního faktoru sFlt-1 (solubilní Fms-podobná tyrozin kináza 1) a pro-angiogenního faktoru PlGF (placentární růstový faktor) u preeklamptických žen (Maynard et al. 2003). U fyziologického těhotenství stoupá hladina faktoru sFlt-1 v prvních dvou trimestrech a v posledním trimestru tato hladina postupně klesá. Naopak hladina faktoru PlGF je nižší v průběhu těhotenství a v jeho pokročilých fázích dochází k jejímu zvýšení. U žen, u kterých se později vyvinula preeklampsie byly pozorovány vysoké hladiny sFlt-1 a nízké hladiny PlGF, jenž mají za důsledek inhibici angiogeneze.

V případě intrauterinní růstové retardace (IUGR) bylo publikováno několik článků prokazujících na souvislost tohoto onemocnění s mělkou invazí cytotrofoblastu a patologickým vývojem arterií v placentě (Fisher 2004; Kaufmann et al. 2003). Klinická studie zabývající se studiem velikosti placenty u dětí s IUGR zjistila, že mají průměrně o 24 % menší placentu, než u fyziologického těhotenství (Heinonen et al. 2001). Ačkoliv není velikost placenty nutně vypovídající o její funkčnosti, je zajisté znakem narušení jejího vývoje. V několika dalších studiích byla zjištěna větší míra apoptózy v místě implantace placenty v souvislosti s IUGR a bylo navrženo, že jde o mechanismus omezující endovaskulární invazi (Ishihara et al. 2002; Levy et al. 2000). Stejně jako u preeklampsie byly i u IUGR potvrzeny nízké hladiny faktorů PlGF a VEGF a zvýšení hladiny jejich antagonistů (Crispi et al. 2006).

2.1.1.3. Hypotéza založená na působení endoteliálních a cirkulačních faktorů

Tato teorie vychází z potvrzení výskytu oxidativního stresu v placentě v důsledku nedostatečné placentární perfuze a abnormální arteriální remodelace (shrnutí v (Burton et Jauniaux 2004)). Jde o hypotézu úzce spjatou s hypotézou založenou na placentárních faktorech. Chronická hypoxie indukuje změnu profilu genové exprese a postupně zhoršuje stav placenty (Zhou et al. 1998). Důsledky hypoxie jsou zprostředkovány posttranslační stabilizací transkripčního faktoru HIF1 α (hypoxií-indukovaný faktor 1 α). Tento protein spolu s HIF1 β (hypoxií-indukovaný faktor 1 β) vytváří heterodimer, který spouští transkripci více než 60 genů, jež se podílejí zejména na angiogenezi a erytropoéze. Jedná se o obranný mechanismus organismu, který vede ke zvýšení přívodu kyslíku k místu hypoxie (Semenza 2002). Pokud dojde ke stabilizaci HIF1 α , v buňkách není spuštěn tento obranný mechanismus a následná chronická hypoxie má zásadní dopad na vývoj placenty.

V důsledku ischemie placenty a nadměrné mateřské zánětlivé reakce dochází k rozvoji oxidativního stresu v placentě. Ten se v menší míře vyskytuje i u fyziologického těhotenství vlivem vstupu mateřské krve do intervilózního prostoru a dále vlivem zvýšené mitochondriální aktivity placentární tkáně a produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). V případě placentární insuficience dochází k hromadění ROS vlivem nepravidelně se měnící koncentrace kyslíku v placentě (Burton et al. 2003). Důsledkem je narušení proliferace a diferenciací trofoblastu, angiogeneze, zvýšení apoptózy a následně dochází k omezení funkce placenty (Kingdom et Kaufmann 1997). U fyziologického těhotenství se vyvíjí silná vrstva cytotrofoblastu, která na počátku vývoje placenty zabraňuje vstupu mateřské krve (Burton et al. 2002; Jauniaux et al. 2003). Její cirkulace tak začíná na periférii zárodka, kde způsobí lokální oxidativní stres. Postupně dojde k regresi periferních cév a mezitím se vrstva cytotrofoblastu ztenčí natolik, aby se mateřská krev mohla vlít do lakun na opačné straně embrya a zformovat budoucí placentu. U placentární insuficience dochází k vytvoření tenčí vrstvy cytotrofoblastu, která tak nedokáže ochránit trofoblast před oxidativním stresem. Podle toho nakolik je vrstva cytotrofoblastu poškozena může dojít k rozvoji mírné, či závažné preeklampsie. V horších případech dochází k rozvoji intrauterinní růstové retardace nebo dokonce k potratu (obrázek č. 1). Udává se, že zhruba dvě třetiny spontánních potratů v brzkých fázích těhotenství je způsobeno patologickým vývojem placenty, způsobeným především mělkou trofoblastickou invazí a absencí ochranné cytotrofoblastické vrstvy buněk.



Obrázek č. 1: Schéma teorie rozvoje oxidativního stresu při vývoji placenty. Tmavě šedou barvou je zvýrazněn oxidativní stres. U fyziologického těhotenství je silná vrstva cytotrofoblastu vzniklá díky dostatečné trofoblastické invazi. Zabraňuje vstupu mateřské krve a cirkulace tak začíná nejdříve na periferii. Oxidativní stres je tak lokálně zvýšen pouze v periferii a mateřská krev se do arterií na opačné straně zygoty dostává až v pozdějších fázích, kdy je zygota adaptována na vyšší přítomnost kyslíku. Tloušťka vrstvy cytotrofoblastu koresponduje se závažností placentární insuficience. Může dojít k mírné preeklampsii, těžké formě preeklampsie kombinované s intrauterinní růstovou retardací nebo dokonce k potratu (Burton et Jauniaux 2004)

2.1.1.4. Hypotéza založená na genetických faktorech

Skutečnost, že výskyt preeklampsie a eklampsie má familiární charakter, vedla k vytvoření hypotézy založené na genetických faktorech. Studium významu genetických faktorů ukázalo, že u dcer matek trpících preeklampsií či gestační hypertenzí je signifikantně vyšší riziko rozvoje těchto těhotenských komplikací (Nilsson et al. 2004). Navrhli 31% pravděpodobnost rozvoje preeklampsie a 20% pravděpodobnost rozvoje gestační hypertenze u žen, jejichž matky trpěly těmito těhotenskými komplikacemi. Dědičnost predispozic pro placentární insuficienci zatím nebyla zcela prozkoumána, pravděpodobně zde však bude hrát roli více genů. Předpokládá se, že půjde především o geny ovlivňující mateřský kardiovaskulární a koagulační systém či o geny regulující mateřskou zánětlivou odpověď. Studie zabývající se genomem žen s preeklampsií identifikovala tři genové lokusy, které mají vztah k této těhotenské komplikaci: 2p12, 2p25 a 9p13 (Laiuori et al. 2003). Nicméně tyto lokusy

mohou vysvětlit jen malé procento případů preeklampsie a navíc jsou odlišné v různých populacích (Oudejans et al. 2004).

Porovnáváním genomů žen s těhotenskými komplikace asociovanými s placentární insuficiencí s genomy kontrolních žen bylo navrženo několik kandidátních genů. Patří mezi ně geny kódující proteiny trombofilie, hemodynamiky, oxidativního stresu, metabolismu lipidů a angiogeneze a dále také geny kódující některé cytokiny (Chappell et Morgan 2006). Jedním z nich je gen *SERPINA8* kódující angiotenzinogen (AGT), jež má důležitou funkci v regulaci krevního tlaku. V souvislosti s těhotenskými hypertenzními poruchami byla pozorována substituce methioninu za threonin [T 235], vedoucí k vyšší hladině AGT (Zafarmand et al. 2008). Další gen, který byl studován v souvislosti s genetickými predispozicemi preeklampsie, je gen matrixové metaloproteinázy (MMP). V lidském genomu se nachází několik jeho alel a jedna z nich (MMP-9-1562T) je pravděpodobně spojena s nižším rizikem rozvoje preeklampsie (Coolman et al. 2006).

Často se v souvislosti s dědičností těchto těhotenských komplikací zkoumají HLA glykoproteiny. Tato problematika již byla částečně popsána v kapitole hypotézy poruchy imunologické tolerance. Dřívější studie dědičnosti preeklampsie se věnovaly zejména antigenu HLA-DR4. Jde o leukocytární glykoprotein MHC II třídy, který je dobře znám svoji úlohou v rozpoznávání cizích antigenů od vlastních. Studie poukázaly na to, že u žen s touto patologií se často vyskytuje homozygotnost *HLA-DR* lokusu (Brunori et al. 2000). V poslední době se pozornost obrací také k HLA-G antigenům. Tento antigen MHC Ib třídy je vystavován na buňkách placentární tkáně, kde má imunomodulační funkci. Ve spojení s výskytem preeklampsie bylo u prvorodiček pozorováno snížení exprese HLA-G antigenů a větší zastoupení homozygotního HLA-G genotypu (Hylenius et al. 2004). Analýzy genotypu preeklamptických a kontrolních žen ukázaly, že rozdílná úroveň exprese a pravděpodobně i odlišný mRNA sestřih je důsledkem delečního/inzerčního polymorfismu 14 bp v exonu 8.

Na dědičnosti preeklampsie se podílejí i epigenetické jevy, především genomický imprinting (Oudejans et al. 2004). V této spojitosti byl objeven lokus 10q 21.1. Studie zkoumala haplotypy dcer – dvojčat, které stejně jako jejich matky trpěly preeklampsií. Ve všech vyšetřovaných rodinách byla alela zmíněného lokusu předána z maternální strany, což potvrzuje teorii vlivu genomického imprintingu.

2.2. Vybrané těhotenské komplikace

V průběhu těhotenství se mohou vyskytnout komplikace, které ohrožují zdravotní stav jak těhotné ženy, tak jejího dítěte. Studie v rámci mé diplomové práce zahrnovala ženy s preeklampsií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí. V následujících kapitolách jsem se nejvíce zaměřila na těhotenské komplikace asociované s placentární insuficiencí, mezi které patří preeklampsie a intrauterinní růstová retardace.

2.2.1. Hypertenzní poruchy v těhotenství

Hypertenze v těhotenství se vyskytuje u 5 – 10 % žen a jde o hlavní příčinu mateřské, fetální i novorozenecké morbidity i mortality v civilizovaných zemích (Garovic 2000). Definice hypertenze v těhotenství vychází z absolutních hodnot krevního tlaku, tj. systolický krevní tlak ≥ 140 mm Hg či diastolický krevní tlak ≥ 90 mm Hg. Hypertenzi vyskytující se během těhotenství dále členíme na:

- chronickou hypertenzi (hypertenze diagnostikována před začátkem těhotenství nebo do 20. týdne těhotenství)
- gestační hypertenzi (hypertenze je poprvé diagnostikována po 20. týdnu těhotenství)
- preeklampsii (hypertenze je poprvé diagnostikována po 20. týdnu těhotenství v kombinaci s proteinurií a případnými edémy)
- preeklampsii superponovanou na předchozí hypertenzi (hypertenze diagnostikována před začátkem těhotenství nebo do 20. týdne těhotenství v kombinaci s proteinurií a případnými edémy) (Gifford 2000).

Ženy s diagnostikovanou chronickou hypertenzí je nutné po celou dobu těhotenství monitorovat. Může u nich dojít k rozvoji superponované preeklampsie, jež je zpravidla těžší formou tohoto onemocnění.

2.2.1.5. Gestační hypertenze

Jak již bylo zmíněno, gestační hypertenze (GH) je charakterizována vysokým krevním tlakem diagnostikovaným po 20. týdnu těhotenství (nejpozději do 24 hodin po porodu). Vysoký krevní tlak zpravidla vymizí do 12 týdnů po porodu. Na rozdíl od preeklampsie není provázána proteinurií ani otoky. Diagnostika byla dříve založena na zvýšení krevního tlaku v druhém trimestru oproti hodnotám naměřeným v prvním trimestru. V průběhu těhotenství

však dochází ke kolísání těchto hodnot, proto je v současné době diagnostika založena na absolutních hodnotách krevního tlaku, tj. systolický krevní tlak ≥ 140 mm Hg či diastolický krevní tlak ≥ 90 mm Hg. Často se jedná o předběžnou nebo pracovní diagnózu, než dojde k jejímu zpřesnění. Může být totiž počátečním projevem preeklampsie, u které se zatím neprojevily další příznaky.

2.2.1.6. Preeklampsie

Preeklampsie je velmi závažné idiopatické multisystémové onemocnění, které v těžké formě může ohrozit život matky i dítěte. Je charakterizováno abnormální cévní odpovědí na placentaci, endoteliální dysfunkcí, aktivací koagulačního systému a zvýšenou agregací krevních destiček (Heart 2000). Jde o jednu z nejčastějších komplikací spojených s placentární insuficiencí. Celosvětově se objevuje u 2 – 10 % všech těhotenství (Duckitt et Harrington 2005). Důkazem, že jde o onemocnění placenty, je jeho výskyt i u patologických gravidit, kdy dochází pouze k tvorbě trofoblastu, nikoli však k tvorbě plodu. Preeklampsie se tedy může objevit pouze v období gravidity. Mezi hlavní klinické příznaky patří hypertenze, proteinurie a případné edémy. V současné době je diagnostika preeklampsie založena na výskytu alespoň dvou z těchto tří symptomů vyskytujících se po 20. týdnu gravidity. Podle závažnosti příznaků můžeme rozdělit preeklampsii na mírnou a závažnou. Podrobná diagnostická kritéria použitá v naší studii jsou uvedena v kapitole Materiál a metody.

Preeklampsie se významně podílí na zvýšení výskytu prematurity, růstových restrikcí plodu i mateřské a perinatální mortality a morbidit. V ekonomicky rozvinutých zemích jde o jednu z nejčastějších předčasných porodů. Její prevalence ve střední Evropě se udává v rozmezí 3,5 až 8,5% všech porodů. V rozvojových zemích je procento výskytu i několikanásobně vyšší. Preeklampsie se objevuje až u 7 % zdravých primipar, nicméně výrazně vyšší riziko jejího rozvoje je u žen s vícečetnou graviditou, chronickou hypertenzí, diabetem 1. typu a dalšími autoimunitními chorobami, preexistujícími trombofilními stavy a u žen trpících obezitou. S vyšší četností se preeklampsie vyskytuje u žen mladších 20 let a starších 35 let. Zajímavé je zjištění, že riziko rozvoje této komplikace je vyšší také u žen, které měly omezenou expozici partnerskými spermii (Einarsson et al. 2003; Dekker et Robillard 2003). Dlouhodobá expozice spermatem téhož partnera či předchozí těhotenství se stejným partnerem vede ke snížení pravděpodobnosti rozvoje tohoto onemocnění. Častěji se také vyskytuje u žen s darovaným oocytom (Salha et al. 1999). Dále se ukazuje, že časté

mateřské infekce močového traktu vyvolané chlamydiemi a cytomegaloviry jsou také asociovány s preeklampsii (Dadelszen et Magee 2002).

Preeklampsie je onemocnění doposud neznámé etiologie. Zatím bylo zjištěno, že roli hraje zejména porucha imunologické tolerance matky vůči plodu, nedostatečná invaze trofoblastu do endometria, ischemií vzniklý oxidativní stres, působení endoteliálních a cirkulačních faktorů a následná endoteliální dysfunkce (Levine et al. 2004). Etiologie a patofyziologie je podrobněji popsána v kapitole o hypotézách etiologie a patofyziologie placentární insuficience. K rozvoji tohoto onemocnění dochází již na začátku těhotenství, klinické příznaky se však objevují až v druhé polovině těhotenství (Dukát et al. 2003). Včasná diagnostika má zásadní význam pro zmírnění negativních dopadů. Metoda predikující rozvoj preeklampsie už v počátcích rozvoje by znamenala zásadní zlom v její léčbě.

Pokud se stav ženy s diagnostikovanou preeklampsií stále zhoršuje, může dojít k rozvoji tzv. HELLP syndromu (H= hemolyses, EL= Elevated Liver Function Tests , LP= Low Platelet Counts). Jak již naznačuje význam této zkratky, je syndrom charakterizován hemolytickou anémií, elevací jaterních testů a sníženým počtem krevních destiček. Jde o velmi závažnou komplikaci s mortalitou a morbiditou dosahující až 40 %. Život matky může být také bezprostředně ohrožen méně častou, ale opět velice závažnou komplikací – eklamptickým záchvatem. Eklampsie je velmi nebezpečný patologický stav charakterizovaný edémem mozku a často i mozkovým krvácením. Mezi její projevy patří tonicko-klonické křeče, poruchy vidění, amnézie, poporodní psychóza a porucha vědomí až bezvědomí. K rozvoji eklampsie může dojít před porodem, během porodu nebo dokonce až 10 dnů po porodu. Mortalita u žen s eklampsií se pohybuje okolo 2 %.

Preeklampsie je v současné době nevléčitelné onemocnění. Snahou lékařů je tedy minimalizovat její dopady na zdraví matky a dítěte. V medikamentózní léčbě preeklampsie je nejvýznamnější léčba hypertenze a antikonvulzivní terapie jako prevence přechodu k eklampsii. Nejčastěji předepisovaným antihypertenzivem v těhotenství je alfamethyldopa či jiný preparát s obsahem methyldopa jako účinné látky. Tato látka se v těle konvertuje na α -methylnoradrenalin , který funguje jako agonista alfa-2-adrenoreceptorů v prodloužené míše, čímž snižuje dráždění sympatiku a následně krevní tlak. Druhou nejčastěji užívanou skupinou léků na léčbu hypertenze jsou tzv. betablokátory. Účinná látka zde blokuje β -adrenergní receptory, nacházející se v srdečním a hladkém svalstvu a následnou redukcí minutového srdečního objemu a srdeční frekvence dochází ke snížení krevního tlaku. U těžkých forem a

při akutním ohrožení života matky musí být těhotenství ukončeno císařským řezem, případně indukovaným porodem.

Antikonvulzivní terapie slouží jako prevence eklamptických záchvatů. Nejčastěji se těhotným ženám podává magnesium sulfát ($MgSO_4$), ten nejen uvolňuje křečové stavy, ale má i pozitivní vliv na prokrvení dělohy (Afifi et Churchill 2003; Dukát et al. 2003).

2.2.2. Fetální růstová retardace

Fetální růstová retardace (FGR) je charakterizována opožděním růstu plodu o 3 – 4 týdny podle ultrazvukové biometrie plodu ve vztahu ke gestačnímu stáří. Vzhledem k tomu, že neznáme přesnou odpovídající hmotnost plodu, je formulace přesné definice FGR vcelku komplikovaná. Nejčastěji se hovoří o plodech, jejichž odhadovaná hmotnost je pod desátým percentilem jejich gestačního stáří. U FGR plodů se objevují problémy plynoucí z nezralosti plodu, zejména respirační problémy, polycytemie, hypoglykémie a hypotermie (Bon et al. 2007). Čím dříve se projeví klinické příznaky, tím je prognóza novorozence zpravidla horší. FGR se v různé míře vyskytuje až u 6 % všech těhotenství a takto postižené plody mají až třikrát vyšší riziko předčasného porodu a až šestkrát vyšší riziko perinatálního úmrtí (Lackman et al. 2001). Do současné doby, nejen že není k dispozici účinná léčba plodů s FGR, ale velkým problémem stále zůstává i její včasná diagnostika a predikce. Z praktického hlediska (prognostického, diagnostického i léčebného) byla určena klasifikace fetální růstové retardace na dvě podskupiny: konstitučně malé plody (SGA) a intrauterinně růstově retardované plody (IUGR). Klasifikace fetální růstové retardace na SGA a IUGR je založena na Dopplerovském ultrazvukovém vyšetření průtoků v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media*. IUGR je kromě opožděného růstu plodu také charakterizován patologickým nálezem alespoň v jedné z těchto arterií, čímž se liší od SGA.

2.2.2.7. Konstitučně malé plody

Jak již bylo popsáno, plody, u kterých je diagnostikováno FGR, lze rozdělit do dvou podskupin. První z nich je označována jako SGA (small for gestational age) a spadá sem přibližně 70% plodů označovaných jako FGR. Plody SGA jsou konstitučně malé, tudíž jejich snížená velikost není dána narušením jejich vývoje, ale je dána výškou, váhou, rasovými faktory či paritou těhotné. Jelikož nejde o patologické narušení růstu, je prognóza takovýchto plodů zpravidla dobrá. Zbýlých 30% FGR plodů je postiženo intrauterinní růstovou retardací

(IUGR). Primární příčiny IUGR jsou multifaktoriální, jde však vždy o projev patologického vývoje plodu, čímž se liší od plodů SGA.

2.2.2.8. Intrauterinní růstová retardace

Poprvé toto onemocnění popsal newyorský pediatr Lubchenco v roce 1963 a s různou klinickou závažností postihuje 2 – 5 % živě narozených dětí ve vyspělých zemích a 6 – 30 % v rozvojových zemích. U novorozenců s IUGR je výrazně zvýšena mortalita (4 – 8x) a u přeživších dětí je až 50 % morbidita.

IUGR se dále člení na dvě skupiny – symetrická (proporcionální) a nesymetrická (dysproporcionální) IUGR. Symetrická IUGR je méně častá (20 – 25 % všech IUGR) a je charakterizována symetrickým zmenšením celého těla plodu. Ultrazvukové biometrické parametry (obvod hlavy, obvod břicha, biparietální průměr, délka stehenní kosti) těchto plodů jsou tedy sníženy v přibližně stejném poměru. To naznačuje, že se plod vyvíjel pomaleji po celou dobu trvání těhotenství a k jeho patologickému narušení došlo už v rané fázi vývoje. Mezi příčiny symetrické IUGR patří zejména chromozomální aberace, anémie, či intrauterinní infekce (např. cytomegalovirová infekce, zarděnky, toxoplasmóza). Může být také způsobena užíváním návykových látek v průběhu těhotenství. Asymetrická IUGR tvoří až 80 % všech případů IUGR a k narušení růstu takto postižených plodů dochází dysproporciálně. U plodů je výrazně snížen obvod břicha v porovnání s obvodem hlavy a muskuloskeletárním rozměrům. Jde o ochranný mechanismus na nepříznivé podmínky nedostatku kyslíku a živin, kterým je plod vystaven vlivem placentární insuficience. K narušení vývoje a růstu u nich dochází až v druhém či třetím trimestru. Hypoxie a hypoglykémie plodu vede k preferenčnímu vývoji důležitých orgánů, především mozku, srdce a nadledvin (shrnuto v (Resnik 2002)). Kromě disproporce je dalším příznakem suchá, odlupující se kůže a tenká pupeční šňůra. Příčinou bývají negativní vnější faktory, jejichž vlivu je plod vystaven v pozdější fázi těhotenství. Zejména jde o preeklampsii, chronický vysoký krevní tlak a těžkou podvýživu.

Jak již bylo zmíněno, u novorozenců s IUGR je zásadně zvýšeno procento morbidity. Jako krátkodobé komplikace se objevují respirační problémy, metabolické abnormality, či hypoglykémie. IUGR má však řadu dlouhodobých následků na zdraví dítěte. Často takto postižené děti trpí genetickými vadami a rozsáhlými orgánovými malformacemi. Doktor James Low provedl se svými kolegy studii, ve které dokázal, že IUGR může dokonce negativně ovlivnit kognitivní funkce dítěte. Za použití četných standardizovaných testů zjistil, že téměř 50 % IUGR dětí ve věku 9 – 11 let má výrazné problémy s učením (Lou at al. 1992).

Jiná studie poukázala na silný vztah mezi výskytem IUGR a spastickou mozkovou obrnou u novorozenců narozených po 33. týdnu těhotenství (Blair et Stanley, 1990). Nejprokazatelnější vztah této nemoci s IUGR byl u proporcionálně menších plodů, které mají zpravidla horší prognózu. Tato zjištění jsou podporována i nedávnou pitevní studií, ve které vědci potvrdili výrazně nižší počet buněk šedé kůry mozkové u dětí s IUGR (Samuelsen et al. 2007). Toto onemocnění je také významným rizikovým faktorem pro pozdější rozvoj chronické hypertenze, ischemické choroby srdeční a diabetu 2. typu. V současné době se poměrně mnoho vědeckých skupin zabývá zkoumáním vztahu IUGR a výskytu různých onemocnění v dospělosti. Domnívají se, že již během nitroděložního života dochází k jakémusi programování, jež je ovlivněno celou řadou faktorů: zejména genotypem matky a plodu, porodnickou anamnézou a životním stylem matky nejen během těhotenství. V poslední době se ukazuje, že negativní faktory, které nás ovlivňují během nitroděložního období života, mají na naše duševní a fyzické zdraví mnohem větší vliv, než se doposud myslelo.

Možné příčiny růstových retardací již byly částečně zmíněny, zde bych je však chtěla vhodně shrnout. Faktory, které růst plodu ovlivňují, můžeme rozdělit do tří skupin: mateřské, fetální a placentární. Jelikož se často jedná o kombinaci několika faktorů, je IUGR různorodou skupinou onemocnění, které mají společné to, že negativně ovlivňují růst a vývoj plodu. Mateřskými faktory jsou genetické predispozice matky, vysoký krevní tlak, anémie, poruchy srážlivosti krve, celkový zdravotní stav matky a její životní styl. Fetální faktory zahrnují chromozomální aberace, genetické mutace, virové infekce, strukturální malformace (např. srdeční vady) i vícečetná těhotenství. A v neposlední řadě placentární faktory, které jsou založené na patologické interakci mezi trofoblastem a deciduou a následném narušení vývoje placenty. Vědci se domnívají, že nejdůležitější úlohu v rozvoji tohoto onemocnění hrají právě zmíněné placentární faktory.

2.3. Diagnostika a predikce těhotenských komplikací

Diagnostika patologicky se vyvíjejícího plodu je v současné době založena na pozorování klinických příznaků, které se objevují až po 20. týdnu těhotenství. Mezi současné diagnostické metody uvedených těhotenských komplikací patří ultrazvuková sonografie, kompletní vyšetření krve a moči, kontrola nárůstu hmotnosti, průběžné měření krevního tlaku a měření průtoků krve pomocí Dopplerovského ultrazvukového vyšetření. Vývoj posledních let se ubírá směrem vývoje diagnostické metody, která by byla založena na biochemických

markerech, které se vyskytují už od počátečních fází placentární insuficience. Jak již bylo popsáno, patofyziologické procesy začínají už na konci prvního trimestru, tudíž už v této fázi je teoreticky možné případné problémy odhalit. Tato neinvazivní prediktivní metoda by byla založena na vyšetření biochemických markerů v periferní krvi matky v prvním trimestru těhotenství.

2.3.1. Markery těhotenských komplikací asociovaných s placentární insufiencí

V posledních letech se stále více studií věnuje výzkumu markerů pro diagnostiku a predikci těhotenských komplikací asociovaných s placentární insufiencí.

Ideální biomarkery by měly splňovat určitá pravidla:

- hrát hlavní roli v patogenezi a být specifické pro tyto patologie
- být detekovatelné už v prvním trimestru, tj. před klinickými projevy
- být spolehlivě, jednoduše a levně měřitelné v periferní krvi matky
- vykazovat vysokou míru specifity a senzitivity
- korelovat se závažností komplikací
- být nedetekovatelné nebo detekovatelné v minimální míře u fyziologického těhotenství

Výzkumy se soustředí zejména na různé cirkulační faktory, které produkují buňky placentární tkáně a plodu pod vystaveným stresem nebo na zánětlivé a metabolické produkty systémové imunitní reakce mateřského organismu. Vědci se v souvislosti s predikcí těhotenských komplikací zabývají několika desítkami molekul. Nejvýznamnější markery současného výzkumu jsou uvedeny v tabulce č. 1 a podrobně popsány v kapitolách níže.

Biochemický marker	Funkce proteinu	Gestační stáří plodů v dané studii [týden + den]	Pravděpodobnost predikce/procento falešně pozitivních výsledků	Reference
PAPP-A	metaloproteináza podílející se na remodelaci spirálních arterií	11 + 0 až 13 + 6	9,6 – 20,1 % / 5 %	Odibo et al. 2011 Poon et al. 2009
			20,5 – 50 % / 10 %	Odibo et al. 2011 Poon et al. 2009
			v kombinaci s Dopplerovou ultrasonografií – 25 – 64,4 % / 5 %	Odibo et al. 2011 Poon et al. 2009
HbF a A1M	HbF zajišťuje transport kyslíku u plodu A1M váže hem a ROS	10 + 0 až 16 + 0	69 % / 5 %	Anderson et al. 2011
			90 % / 23 %	Anderson et al. 2011
PP13	funkce zatím neznámá, pravděpodobně se podílí na remodelaci spirálních arterií	11 + 0 až 13 + 6	37,5 % / 5 %	Akolekar et al. 2009
			52,1 – 80 % / 10 %	Nicolaides et al. 2006
			69 % / 10 %	Khalil et al. 2010
			v kombinaci s Dopplerovou ultrasonografií – 66,7 % / 5 % 71,4 – 90 % / 10 %	Nicolaides et al. 2006
sEng	anti-angiogenní faktor	11 + 0 až 13 + 6	30 % / 5 %	Foidart et al. 2010
			v kombinaci s Dopplerovou ultrasonografií – 66,7 % / 5 %	Foidart et al. 2010
sFlt-1 a PlGF	sFlt-1 a PlGF regulují angiogenezi v placentě	od 24 + 0 do ukončení těhotenství	82 % / 5 %	De Vivo et al. 2008
			88,5 % / 10 %	Verlohren et al. 2010
PlGF	reguluje angiogenezi v placentě	11 + 0 až 13 + 6	80,8 % / 10 %	Akolekar et al. 2011
metabolity	řada metabolitů, jejichž koncentrace je měřena v plazmě těhotné ženy	14 + 0 až 16 + 0	77 % / 10 %	Kenny et al. 2010

Tabulka č. 1: Biochemické predikční markery pro preeklampsii. U každého markeru je uvedena jeho funkce, fáze těhotenství, kdy byla detekce prováděna, úspěšnost predikce a procento falešně pozitivních výsledků (přepřacováno dle (Anderson et al. 2011))

2.3.1.9. Těhotenský plazmatický protein A

Už více než 30 let se jako marker preeklampsie studuje glykoprotein nazývaný těhotenský plazmatický protein A (PAPP-A). Jde o metaloproteinázu, která je důležitá pro proliferaci trofoblastu a remodelaci spirálních arterií. Jeho koncentrace v krevní plazmě matky se v průběhu těhotenství zvyšuje a jeho nízké hladiny v séru jsou spojovány s vyšším rizikem rozvoje PE, IUGR, SGA, či předčasného porodu (Ranta et al. 2011; Odibo et al. 2011; Spencer et al. 2005; Smith et al. 2002). V kombinaci s β podjednotkou lidského choriového gonadotropinu (β -hCG) se využívá k diagnostice trisomie 21, 13 a 18, kde se jeho detekce provádí od 11 + 0 do 14 + 0 tt. (Kagan et al. 2008). Jako biochemický marker těhotenských komplikací v druhém a třetím trimestru byl mnohokrát potvrzen, nicméně úspěšnost prvotrimetriálního screeningu založeného na tomto jediném biomarkeru byla pouze 10 – 20 % (Odibo et al. 2011; Poon et al. 2009; Spencer et al. 2005). V kombinaci s Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením je však úspěšnost predikce až 70% (s 5 % falešně pozitivních výsledků).

2.3.1.10. Fetální hemoglobin a α_1 -mikroglobulin

Poslední výzkumy ukazují, že volný extracelulární fetální hemoglobin (HbF) je také zahrnut v patogenezi placentární insuficience. Tento fetální protein zajišťuje transport kyslíku. Ve volné formě má ale mnoho negativních účinků. Hemoglobin je vysoce reaktivní molekula schopná narušit buněčné membrány (Tsemakhovich et al. 2005). Dále je schopný vázat a inaktivovat oxid dusnatý (NO), následkem čehož dochází k vazokonstrikci (Kim-Shapiro et al. 2006). Metabolity hemoglobinu také poškozují DNA, proteiny i lipidy přímou oxidací a/nebo generováním reaktivních forem kyslíku. Navíc hem působí jako prozánětlivá molekula pro neutrofilní buňky (Kumar et Bandyopadhyay 2005). Další z kandidátních biomarkerů, α_1 -mikroglobulin (A1M) je extracelulární globulární protein, který je schopný vázat HbF, hem a reaktivní formy kyslíku a tím chránit buňky a tkáně před oxidačním poškozením. Při zvýšené koncentraci HbF, hemu a ROS dochází ke zvýšení exprese A1M.

Výzkum placentární tkáně potvrdil vyšší koncentraci mRNA pro HbF v placentární tkáni a volného HbF v placentárním vaskulárním lumen u žen s preeklampsií (Centlow et al. 2008). Byly provedeny také studie plazmatické koncentrace HbF a A1M. V experimentu zahrnujícím 96 těhotných žen měřili koncentraci HbF a A1M v krevní plazmě žen v období 11 + 0 až 16 + 0 týdne těhotenství. U žen, u kterých se v pozdějších fázích vyvinula preeklampsie byla pozorována signifikantně vyšší koncentrace HbF i A1M. Kombinace těchto

dvou markerů vykazovala míru predikce 69 % s 5 % falešně pozitivních výsledků (Anderson et al. 2011). Dále byla pozorována pozitivní korelace plazmatické koncentrace HbF a krevního tlaku matky (Olsson et al. 2010). Využitelnost těchto markerů je potřeba ještě potvrdit na větší kohortě.

2.3.1.11. Placentární protein 13

Placentární protein 13 (PP13) je protein galektinové rodiny produkovaný buňkami trofoblastu (Than et al. 2004; Visegrády et al. 2001). Jeho funkce zatím není zcela prostudována, ale je známo, že se podílí na implantaci a remodelaci mateřských spirálních arterií a tudíž i na správném vývoji placenty (Than et al. 2004). U fyziologického těhotenství plazmatická koncentrace PP13 stoupá v průběhu gestace. Několik studií prokázalo sníženou plazmatickou hladinu v prvním trimestru u žen, u kterých se později rozvinuly těhotenské komplikace asociované s placentární insuficiencí (Akolekar et al. 2009). Měření koncentrace PP13 v krevní plazmě ukázalo 37,5% pravděpodobnost predikce PE s 5 % falešně pozitivních výsledků. Khalil a jeho kolegové se také věnovali této problematice a pravděpodobnost predikce v jejich studii byla 69 % s 10 % falešně pozitivních výsledků (Khalil et al. 2010). Pravděpodobnost predikce v další studii byla dokonce 80 % (Nicolaidis et al. 2006). V kombinaci s Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením byla úspěšnost predikce až 90%.

2.3.1.12. Solubilní fms-podobná tyrozin kináza a solubilní endoglin

Vcelku dobře prostudované jsou dva angiogenní faktory: solubilní fms-podobná tyrozin kináza (sFlt-1) a solubilní endoglin (sEng). Protein sFlt-1 je solubilní forma receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a sEng funguje jako koreceptor pro transformující růstový faktor β (TGF- β). U pacientek s PE jsou plazmatické koncentrace obou těchto proteinů zvýšeny (Reddy et al. 2009; Levine et al. 2006; Levine et al. 2004). Vyšší hladiny sFlt-1 byly také pozorovány ještě před klinickými projevy a úroveň exprese korelovala se závažností PE (Maynard et al. 2003). Jako biomarker v prvním trimestru ukázal 77,8% pravděpodobnost predikce (při 5% falešné pozitivitě) v kombinaci s Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením (Foidart et al. 2010).

2.3.1.13. Placentární růstový faktor

Dalším zkoumaným potenciálním biomarkerem je placentární růstový faktor (PIGF). Tento protein, patřící do stejné rodiny jako VEGF, hraje klíčovou roli v angiogenezi a vaskulogenezi během vývoje placenty. Jeho snížená genová exprese je spojena s vyšším rizikem

preeklampsie (De Vivo et al. 2008). Senzitivita metody založené na měření jeho koncentrace v séru v druhém trimestru byla 80,8 %. Ještě přesnějším markerem se ukázal být poměr sFlt-1/PIGF, jehož vyšetření v séru přineslo 88,5% pravděpodobnost predikce.

Současná studie, zahrnující 351 pacientek (71 s PE), také sledovala koncentraci PIGF a sFlt-1, a to v průběhu druhého a třetího trimestru (Verlohren et al. 2010). Spolehlivě prokázali, že hladiny sFlt-1 a PIGF se u žen s preeklampsií signifikantně lišily od kontrolních žen s fyziologickým těhotenstvím; u žen s preeklampsií byla koncentrace sFlt-1 zvýšena a koncentrace PIGF snížena. Navrhli automatizovanou metodu analýzy koncentrace těchto proteinů v séru za využití imunoanalytické metody. Pro diagnostiku preeklampsie v druhém trimestru byla nejvyšší senzitivita opět u analýzy poměru sFlt-1/PIGF (82 % při 5% falešné pozitivitě). Další výzkum se bude zaměřovat na využitelnost PIGF a poměru sFlt-1/PIGF jako markerů preeklampsie v prvním trimestru těhotenství.

2.3.1.14. Cystatin C

Cystatin C je inhibitor cysteinových proteináz využívaný pro diagnostiku funkce ledvin a odhadu úrovně glomerulární filtrace. V poslední době se začal také testovat jako marker pro predikci placentární insuficience. V několika studiích byla pozorována signifikantně zvýšená koncentrace v plazmě žen s preeklampsií (Kristensen et al. 2007; Strevens et al. 2001). Studium je zatím na počátku, ale už teď se ukazuje, že jako samostatný marker nejspíše nebude v důsledku poměrně nízké specifity klinicky využitelný, mohl by se však využívat v kombinaci s jinými biomarkery (Thilaganathan et al. 2010).

2.3.1.15. Metabolické profilování

Detekce buněčných metabolitů, které jsou specifické pro patofyziologii placentární insuficience, se zdá být také slibnou predikční metodou. Tzv. metabolické profilování bylo provedeno na kohortě 60 žen s fyziologickým těhotenstvím a 60 žen s PE (Kenny et al. 2010). V séru těhotných žen měřili na konci prvního trimestru koncentraci 45 metabolitů. Svůj prediktivní model založili na 14 z těchto metabolitů, jejichž hladina se signifikantně lišila u žen s pozdějším rozvojem PE od zdravých kontrol (5-hydroxytryptofan, monosacharidy, dekanoylkarnitin, methylglutarová a/nebo adipová kys., olejová kys., dokosahexanová a/nebo dokosatrienová kys., γ -butyrolakton a/nebo oxolan-3-on, 2-oxovalerová a/nebo oxo-methylbutanová kys., 3-oxobutanová kys., hexadecenoyl-eikosatetraenoyl-sn-glycerol, di-(oktadekadienoyl)-sn-glycerol, sfingosin-1-fosfát, sfinganin-1-fosfát, deriváty vitamínu D3).

Pravděpodobnost predikce byla 73 – 77 % s 10 % falešně pozitivních výsledků. V této oblasti je opět potřeba dalšího výzkumu. Studie na větší kohortě by mohly vést k upravení kritérií metabolického profilování a zvýšení senzitivity a specificity této analýzy.

2.4. Proteiny tepelného šoku

Jako proteiny tepelného šoku (Hsp) je označována skupina proteinů, jejichž hladina exprese je výrazně zvýšena u buněk vystavených různým formám stresu (shrnuto v (De Maio, 1999)). Hsp jsou vysoce konzervované proteiny, vyskytující se ve všech živých organismech od bakterií po člověka a to ve všech buňkách těchto organismů. Aktivace genů kódujících Hsp je součástí univerzální odpovědi buněk na stresové podmínky, jako je jejich vystavení vysokým teplotám, extrémnímu pH, infekci, zánětu, toxickým látkám, či nedostatku živin a kyslíku. Jejich funkce závisí na jejich intracelulární, či extracelulární lokalizaci. Intracelulární proteiny Hsp rodiny hrají rozhodující roli v kontrole buněčného cyklu a ochraně buněk před stresem. Jsou také nezbytné ve skládání proteinů a multiproteinových komplexů, transportu a třídění proteinů do správných subcelulárních kompartmentů. Jejich funkce je tedy zejména cytoprotektivní. Extracelulární Hsp mohou být buď vázané na membrány buňky, nebo volné a zprostředkovávají zejména imunitní funkce.

Podle molekulové hmotnosti se dají Hsp rozdělit do několika rodin: rodina malých Hsp, Hsp30, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp110. Číslo v názvu označuje přibližnou velikost proteinů v kilodaltech (kDa). Moje studie zahrnovala pět proteinů: Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1. V detailnějším popisu jsem se tedy zaměřila pouze na rodiny, do nichž tyto proteiny spadají.

2.4.1. Rodina malých Hsp

Protein označovaný Hsp27, spadá do rodiny malých Hsp (sHsp). Ta zahrnuje proteiny jako ubiquitin, α -crystalin, Hsp20 a další. Jde o skupinu proteinů majících podobnou strukturu a biochemické vlastnosti. Jejich molekulová hmotnost je 15 – 30 kDa a v jejich C-terminální doméně se nachází charakteristická vysoce konzervovaná oblast o přibližně 90 aminokyselinových zbytcích.

Hsp27 je u člověka kódován genem *HSPB1* a má zejména cytoprotektivní funkci. Jde o ATP-independentní chaperon, který brání agregaci denaturovaných proteinů a usnadňuje jejich sbalení do nativní konformace (Rogalla et al. 1999). Hsp27 má kromě této úlohy i několik dalších funkcí. Hraje roli v inhibici apoptotické signalizaci, kde interaguje s vnější

mitochondriální membránou a vazbou na cytochrom c inhibuje aktivaci prokaspázy-9 (Sarto et al. 2000). Hsp27 také interaguje s aktinem a intermediálními filamenty. Zabraňuje tak nekovalentním interakcím intermediálních filament a fragmentaci aktinových filament. Další jeho funkcí je aktivace proteasomu, kde napomáhá degradaci denaturovaných proteinů. V neposlední řadě také zvyšuje aktivaci NF κ B dráhy, hrající klíčovou roli v regulaci imunitní reakci, zánětu a stresové odpovědi buňky (Parcellier et al. 2003).

Hsp27 často podléhá oligomerizaci a může tak vytvářet oligomery složené z 16 až 32 podjednotek o celkové molekulové hmotnosti až 1000 kDa (Thériault et al. 2004). Oligomerizace Hsp27 závisí zejména na podmínkách, kterým je buňka vystavena. Stres, kterým může být například teplotní šok či působení oxidativního stresu, výrazně zvyšuje expresi Hsp27 (po několika hodinách) a jeho fosforylaci (po několika minutách). Fosforylace Hsp27 probíhá na třech serinových zbytcích – Ser15, Ser78 a Ser82 a je katalyzována MAPKAP kinázami 2 a 3. Ty jsou aktivovány p38 MAP kinázovou dráhou po stimulaci buňky například zánětlivými cytokiny TNF α a IL-1 β , mitogeny či peroxidem vodíku. Vystavení buněk stresu a následná fosforylace Hsp27 vede tedy k rozpadu oligomerů.

Extracelulární Hsp27 působí jako významný antioxidant. Při působení oxidativního stresu snižuje hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) a volného hemu.

2.4.1. Rodina Hsp60

Do rodiny Hsp60 spadají molekulární chaperony, které jsou známé pod názvem chaperoniny. Jejich hlavní funkcí je napomáhání sbalení proteinů především po vystavení buněk stresovým podmínkám. Vytvářejí oligomerní soudkovité komplexy s centrální dutinou, do které se váží nesbalené proteiny (Martin et Hartl 1994). Za spotřeby ATP se opět uvolňují a tento proces se opakuje do té doby, než se protein složí do nativní konformace.

V lidských buňkách jsou proteiny rodiny Hsp60 exprimovány konstitutivně a nacházejí se zejména v cytosolu a v mitochondriální matrix (Kampinga et al. 2009). Mohou však být i uvolňovány z buněk do extracelulárního prostředí (Ranford et al. 2000). Podle lokalizace mají tyto proteiny odlišné funkce. Cytosolické proteiny Hsp60 rodiny vytvářejí komplexy s proteiny podílejícími se na aktivaci apoptózy. Hrají tak klíčovou roli v inhibici proapoptotické kaskády (Itoh et al. 2002). Nedávné studie ukazují, že existuje korelace mezi koncentrací cytosolického Hsp60 a hladinou enzymu 6-fosfofruktokinázy 1 (Kaufman et al. 2003). To naznačuje, že se proteiny rodiny Hsp60 podílejí také na regulaci glykolýzy.

V mitochondriích se tyto proteiny podílejí zejména na transportu nesbalených proteinů přes vnitřní mitochondriální membránu a v mitochondriální matrix jejich sbalení (Koll et al. 1992). Podílejí se zde také na replikaci mitochondriální DNA. Důkazem toho je zjištění, že mutace genů kódujících Hsp60 vedou k častým mutacím mitochondriální DNA (Kaufman et al. 2003).

Extracelulární Hsp60 mohou být lokalizovány na buněčné membráně nebo volně v extracelulárním prostředí. Jsou součástí tzv. signálu nebezpečí, který se podílí na aktivaci signalizace imunitní odpovědi. Extracelulární Hsp60 mohou aktivovat řadu imunitních buněk, především makrofágů, monocytů a dendritických buněk a tím spustit sekreci široké škály cytokinů (Hansen et al. 2003). Podle experimentů Julie Ranfordové a jejího kolektivu je sekvence bakteriálních a lidských Hsp60 natolik podobná, že protilátky produkované proti bakteriálnímu Hsp60 se mohou vázat i na lidský Hsp60. To může mít za následek rozvoj autoimunitního onemocnění (Ranford et al. 2000).

2.4.2. Rodina Hsp70

Rodina Hsp70 je nejvíce konzervovaná a nejlépe prostudovaná skupinou Hsp. V lidském genomu se nachází 13 genů kódujících tyto proteiny. Všichni zástupci mají stejnou molekulární strukturu složenou z N-terminální ATPázové domény, substrát-vazebné domény (SBD) a C-terminální domény, která se podílí na vazbě substrátu a má pravděpodobně i další funkce. Můžeme je rozdělit na konstitutivně exprimované Hsp70, stresem indukované Hsp70, mitochondriální Hsp75 a proteiny lokalizované v endoplazmatickém retikulu označované jako Grp78. Primárně fungují v buňce jako ATP-dependentní molekulární chaperony, hrající roli ve skládání proteinů, jejich transportu přes membrány a ochraně nově vznikajících proteinů. Další jejich funkcí je ochrana buňky před teplotním a oxidativním stresem, kterou zajišťují vazbou na nesbalené proteiny a zabraňují tak jejich agregaci. Hsp70, podobně jako mnoho dalších Hsp, mají anti-apoptotickou funkci. Apoptózu blokují hned na několika úrovních: brání permeabilizaci mitochondriální membrány, fragmentaci jádra a aktivaci některých kaspáz (Buzzard et al. 1998). Nedávné studie ukázaly, že v mitochondriální fázi apoptózy blokují Hsp70 translokaci proteinu Bax a v postmitochondriální fázi se váží na pro-apoptotické faktory AIF a Apaf-1 (shrnutí v (Schmitt et al. 2007)). Co se týče genové exprese Hsp70 u nádorových buněk, je její úroveň v porovnání se zdravými buňkami výrazně zvýšena (Volloch et Sherman 1999). Hsp70 se pravděpodobně i aktivně podílí přímo na onkogenní

transformaci buněk. Široká škála stresových stimulů zvyšuje expresi Hsp70 a zvyšuje tak schopnost buněk přežít. Důležité je zmínit, že mezi tyto stimuly patří například i protinádorová léčba (Gurbuxani et al. 2003).

2.4.3. HspBP1

Hsp70 vazebný protein 1 (HspBP1) spadá do rodiny nukleotidových výměnných faktorů pro Hsp70. Nejedná se tedy o protein tepelného šoku, zde ho však uvádím vzhledem k jeho roli v regulaci aktivity Hsp70. ATPázová aktivita Hsp70 je regulována vazbou co-chaperonů a HspBP1 je jedním z nich. Váže se na N-terminální ATPázovou doménu a tím snižuje afinitu substrátu a substrát-vazebné domény Hsp70 (Raynes et Guerriero 1998).

2.4.1. Rodina Hsp90

Hsp proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 90 kDa spadají do rodiny označované Hsp90. Jde o vysoce konzervovanou třídu proteinů, jejichž konstitutivní exprese je i u buněk v klidových podmínkách velmi vysoká. Za fyziologických podmínek tvoří 1 – 2% všech buněčných proteinů (Brown et al. 2007). Vystavení buněk vysokým teplotám vede ke zvýšení tohoto poměru na 4 – 6% (Crevel et al. 2001). Zástupce této rodiny můžeme najít u bakterií a všech eukaryot, pouze u archaebakterií nebyly tyto proteiny zatím objeveny. V lidském genomu je celkem 5 genů, které kódují funkční izoformy Hsp90, a dalších 12 pseudogenů (Chen et al. 2005). Molekulární struktura těchto proteinů se skládá z vysoce konzervované N-terminální, střední a C-terminální domény. N-terminální doména vykazuje ATPázovou aktivitu regulovanou vazbou co-chaperonu, střední doména se podílí na substrátové specifitě proteinu (Hawle et al. 2006) a C-terminální doména obsahuje alternativní ATP-vazebné místo a zajišťuje dimerizaci proteinu (Terasawa et al. 2006).

Proteiny rodiny Hsp90 hrají v buňce klíčovou roli jako molekulární chaperony. Podílejí se na skládání proteinů, jejich intracelulárním transportu, stabilizaci, degradaci a také na buněčné signalizaci. Vzhledem k tomu, že se účastní procesů buněčného růstu, diferenciaci a reprodukci, jde o proteiny, které jsou pro buňku esenciální. Proteiny rodiny Hsp90 nacházíme jak v cytosolu buňky, tak v dalších buněčných kompartmentech. V cytosolu savčích buněk se mohou vyskytovat 2 izoformy, označované jako Hsp90 α a Hsp90 β . Majoritní izoforma Hsp90 α je inducibilní a její exprese je výrazně zvýšena po stimulaci buňky stresovými podněty, zatímco Hsp90 β je minoritní izoforma a k její expresi dochází konstitutivně. Proteiny této rodiny jsou nezbytné pro maturaci mnoha proteinů v buňce,

například steroidních receptorů a dalších transkripčních faktorů, některých serin/threoninových a tyrozinových kináz a mnoha dalších enzymů (McClellan et al. 2007). Stejně jako řada dalších Hsp i Hsp90 inhibují indukci apoptózy. Jedním z možných způsobů této inhibice je jeho přímá vazba na faktor Apaf-1, čímž zabraňuje jeho oligomerizaci a následné aktivaci prokaspázy-9 (Pandey et al. 2000).

Kromě intracelulární formy Hsp90 existuje i forma extracelulární. Tato forma se může vyskytovat volně nebo vázaná na membráně a její funkcí je stimulace imunitní odpovědi (Pockley et al. 2008). Skupina vědců zkoumala imunitní funkci Hsp90 pomocí homologního proteinu odvozeného od cytosolického Hsp90 z nádorových buněk označovaného jako Gp96. (Srivastava et al. 1998). Přesvědčivě prokázaly, že protein Gp96 může aktivovat T-buněčnou imunitní odpověď. Nedávné studie ukázaly, že Hsp90 se podílí i na aktivaci řady transkripčních faktorů pro cytokiny. Farmakologická inhibice Hsp90 vedla k aktivaci I κ B-kinázového (IKK) komplexu a následné inhibici NF κ B signalizace (Salminen et al. 2008). Experimenty provedené na myších makrofázích ukázaly, že inhibice Hsp90 dále vede ke snížení exprese onkogenu Akt a tudíž ke snížení produkce IL-6, TNF a NO u těchto buněk (Shimp et al. 2012). Což je dalším spolehlivým důkazem, že úlohou Hsp90 je stimulace imunitní odpovědi. Hsp90 se také významně podílí na klíčových procesech onkogeneze. Extracelulární Hsp90 hraje například roli v invazi nádorů a to podporou degradace extracelulární matrix, adheze a migrace nádorových buněk. (Dowling et al. 2008).

2.4.2. Exprese proteinů tepelného šoku v těhotenství

Studiem exprese a role Hsp během těhotenství se zatím zabývalo pouze pár vědeckých skupin a jde tedy o problematiku, která stále není příliš prozkoumána. Nejdříve uvádím dvě důležité studie exprese Hsp v placentární tkáni a následně tři další studie, které se věnují hladině proteinu Hsp70 v souvislosti s preeklampsií, gestační hypertenzí a HELLP syndromem.

Jeden z nejvýznamnějších experimentů zkoumajících expresi jednotlivých Hsp provedl Shah a jeho tým (Shah et al. 1998). Studovali úroveň exprese a lokalizaci celkem čtyř Hsp (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90), které detekovali u buněk tkáně děložní sliznice a placentární tkáně během prvního, druhého a třetího trimestru (vždy pětkrát v každém trimestru). K tomu využívali imunohistochemii s použitím vysoce specifických protilátek. Pro Hsp60 a Hsp27 se intenzita barvení během těhotenství neměnila, u Hsp70 a Hsp90 však bylo zjištěno postupné snižování exprese s délkou těhotenství. U všech Hsp pak byla sledována i lokalizace

v placentě a lokalizace uvnitř jednotlivých buněk. V tabulce č. 2 můžeme vidět souhrnné výsledky jejich pozorování. Hsp90, Hsp70 a Hsp60 byly detekovány v různé míře ve všech pozorovaných buňkách a až na výjimky ve všech trimestrech. Pozorování Hsp27 však přineslo jiné výsledky. Tento protein byl detekován pouze ve stromálních buňkách děložní sliznice, buňkách intermediálního trofoblastu a syncytiotrofoblastu a to především v prvních dvou trimestrech. Tkáně během prvních dvou trimestrů byly získávány ze spontánních potratů, u kterých nebyly známy příčiny, a placenta vykazovala fyziologickou morfologii. V této tkáni bylo očekáváno zvýšení exprese i indukibilní formy Hsp70, tento protein však nebyl vůbec detekován.

	Hsp 90			Hsp 70			Hsp 60			Hsp 27		
	Trimestr			Trimestr			Trimestr			Trimestr		
Tkáň	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Decidua												
Cytoplazma	++	+	+	++	++	+	++	+	+	+++	+++	+++
Jádro	+++	++	++	++	++	+	++	++	++	-	-	-
Syncytiotrofoblast												
Cytoplazma	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Jádro	+	+	++	++	+	+	++	++	++	+	+	-
Cytotrofoblast												
Cytoplazma	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
Jádro	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
Intermediální trofoblast												
Cytoplazma	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+++	+	+
Jádro	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Hofbauerovy buňky	+++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++	-	-	-
Endotelium (jádro)	++	+	+	++	+++	++	+	+	+	-	-	-

Tabulka č. 2 : Míra exprese a lokalizace Hsp v buňkách děložní sliznice a placenty v průběhu všech trimestrů těhotenství. Detekce byla prováděna u několika typů buněk a to vždy v jejich jádře a cytoplazmě (přepřacováno dle (Shah et al. 1998))

V roce 2000 byl vydán článek Londýnské vědecké skupiny, která se věnovala studiu oxidativnímu stresu v placentární tkáni jako potenciální příčiny brzkých potratů (Jauniaux et al. 2000). Ke vzniku oxidativního stresu v placentární tkáni dochází v souvislosti s vývojem spirálních cév endometria a následnému propojení s mateřským krevním oběhem a jak již bylo popsáno, k jeho výraznému zvýšení může dojít při patologickém vývoji placentární tkáně. Sledovali několik parametrů, jako je tlak kyslíku v krvi, aktivitu několika

antioxidačních enzymů a míru exprese Hsp70. Svůj výzkum prováděli na placentách získaných od zdravých žen, u kterých došlo mezi 6. a 17. týdnem těhotenství k ukončení gravidity. Prokázali, že morfologické změny placenty, které vedou k průtoku mateřské krve do placenty, jsou spojeny se zvýšením aktivity katalázy, glutathion peroxidázy a superoxid dismutázy a také se zvýšením koncentrace mRNA těchto enzymů. Co se týče Hsp70, v 6. a 7. tt byla pozorována velice nízká exprese a naopak výrazný nárůst vykazovala v 8. a 9. tt a to zejména v syncytiotrofoblastu a buňkách endometria. V tkáních vyššího gestačního stáří byla exprese Hsp70 lehce snížena a rovnoměrně rozložena do všech typů buněk.

Nyní se podívejme, jaké výsledky přinesly studie hladin proteinu Hsp70 v séru těhotných žen. Fukushima a jeho kolektiv sledovali hladinu proteinu Hsp70 v séru matky pomocí ELISA metody (Fukushima et al. 2005). Studovaná kohorta zahrnovala 31 žen s vysokým rizikem předčasného porodu, sedm žen s PE, 46 žen s fyziologickým těhotenstvím a sedm kontrolních netěhotných žen. Skupina žen s vysokým rizikem předčasného porodu zahrnovala 15 žen, které doopravdy rodily předčasně a 16 žen, které rodily v termínu. U žen, které rodily předčasně, bylo pozorováno signifikantní zvýšení hladiny Hsp70 v séru oproti ženám, které rodily v termínu a také oproti ženám s fyziologickým těhotenstvím. U žen s preeklampsií byla signifikantně zvýšena hladina proteinu v porovnání s fyziologickým těhotenstvím. Závěrem této studie tedy bylo uznání proteinu Hsp70 jako možného markeru predikce preeklampsie a rizika předčasného porodu.

Další velice podobná studie byla provedena u výrazně většího počtu žen (Molvarec et al. 2006). Výzkumu se účastnilo 269 těhotných žen (93 s PE, 29 s GH, 20 se superponovanou preeklampsií na předchozí hypertenzi – SPE a 127 normotenzních žen – FG). Opět zde byly hladiny proteinu Hsp70 zjišťovány pomocí ELISA metody. V porovnání s FG byly hladiny signifikantně zvýšeny u skupin PE, GH i SPE. Koncentrace Hsp70 se u skupin jednotlivých patologií nelišily.

Molvarec se svým kolektivem provedli další studii zabývající se touto problematikou. Prokázali, že hladina proteinu Hsp70 je výrazně zvýšena u žen s HELLP syndromem v porovnání s FG a navíc, že tyto hladiny silně korelují s hemolytickými markery (hladina volného hemoglobinu v plazmě, aktivita sérové laktát dehydrogenázy a hladina bilirubinu) (Madách et al. 2008). Hladina Hsp70 také korelovala se závažností HELLP syndromu.

Uvedené výzkumy ukázaly, že Hsp70 by mohl být velice spolehlivý biomarker sledovaných těhotenských komplikací.

2.4.3. Role proteinů tepelného šoku v patogenezi placentární insuficience

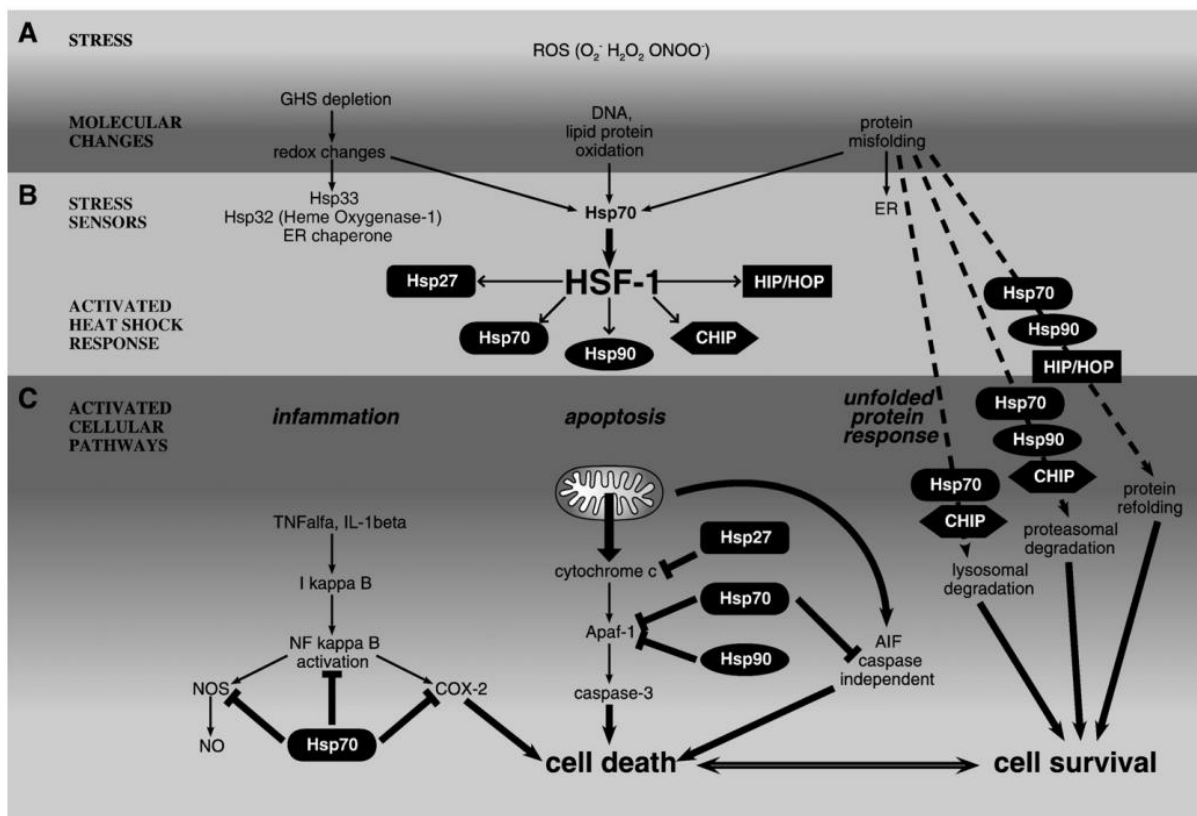
Proteiny tepelného šoku hrají také roli v buněčných procesech, ke kterým dochází pod vlivem oxidativního stresu. Jak již bylo popsáno, během vývoje placentární tkáně dochází k lokálnímu oxidativnímu stresu, jež je v případě placentární insuficience výrazně zvýšen (Burton et al. 2003). Role proteinů tepelného šoku v patogenezi placentární insuficience je tedy primárně jejich úloha v ochraně buněk před působením oxidativního stresu.

Hsp mají v buňkách vystavených oxidativnímu stresu hned několik funkcí. Za prvé, některé Hsp zajišťují funkci molekulárního přepínače, který rozpoznává redoxní změny v rámci intracelulárního prostředí. Jde především o Hsp32, také nazývaný hemová oxygenáza 1, a dále také Hsp72 (shrnuto v (Celabrese et al. 2004)). Mechanismus detekce redoxních změn byl lépe prostudován u Hsp33, který plní stejnou roli, ale nachází se pouze u bakterií. Tento protein snímá redoxní změny prostřednictvím několika vysoce reaktivních cysteinových zbytků, které pracují v koordinaci se zinkovými ionty. Jiná jeho doména reaguje na přítomnost nesbalených proteinů. K plné aktivaci Hsp33 jsou tedy zapotřebí dvě podmínky: přítomnost nesbalených proteinů a redoxní změny (Ilbert et al. 2007). Exprese Hsp32 je regulována aktivací transkripčního faktoru označovaného HSF-1 (*heat shock factor 1*), který je transkripčním faktorem pro většinu proteinů tepelného šoku.

Působením oxidativního stresu mohou intracelulární komponenty včetně DNA, lipidů a proteinů být poškozeny oxidací. Proteiny, které jsou na změny pH citlivější, tak mohou ztratit svou nativní konformaci. Důležitými senzory přítomnosti špatně sbalených proteinů jsou Hsp70 a Hsp90. Ty za normálních podmínek váží monomerní HSF-1 a jsou tedy neaktivní. Pokud se v buňkách objeví nesbalené proteiny, monomerní HSF-1 se uvolní a Hsp70 a Hsp90 tak mohou napomáhat sbalení těchto proteinů. Uvolněný HSF-1 začne vytvářet trimery, které se translokují do jádra a spustí transkripci proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp70, Hsp90) a jejich co-chaperonů (Morimoto et Santoro 1998). Takto Hsp70 a Hsp90 tedy regulují genovou expresi proteinů tepelného šoku. Hsp27 také chrání proteiny proti působení oxidativního stresu, a to tak, že působí jako antioxidant. Tento ochranný účinek je primárně způsoben schopností Hsp27 udržet glutathion v redukované formě i za oxidativních podmínek a tím napomáhá obnovit homeostázu redoxních podmínek (Arrigo 2007).

Dlouhotrvající oxidativní stres může vést až k buněčné smrti a to především prostřednictvím aktivace apoptotické kaskády. Bylo prokázáno, že v podmínkách oxidativního stresu dochází k aktivaci vnitřní i vnější molekulární dráhy apoptózy a dále také k aktivaci apoptotické dráhy nezávislé na kaspázách (Yuan et al. 2003). Proteiny tepelného šoku interagují s komplexy těchto drah na několika úrovních. Působí protiapoptoticky a zajišťují tak přežití buněk ve stresových podmínkách. Hsp27 může inhibovat apoptózu zabráněním uvolnění mitochondriálního cytochromu c (Gorman et al. 2005) nebo přímou vazbou na cytochrom c (Bruey et al. 2000). Hsp70 a Hsp90 pak inhibují apoptózu vazbou faktoru Apaf-1, který je v apoptotické kaskádě aktivován uvolněným cytochromem c (Beere et al. 2000).

Jednou z událostí, ke které dochází po poškození buněk oxidativním stresem, je aktivace zánětlivých drah. Zánětlivá odpověď je primárně regulována transkripčním faktorem NFκB. Vlivem oxidativního stresu dochází v cytosolu k oddělení inhibitoru IκB od NFκB a následně se tento faktor přesune do jádra, kde spouští transkripci zánětlivých mediátorů, především syntetázy oxidu dusného (NOS), cytokinu TNF-α a indukibilní cyklooxygenázy 2 (COX-2). Stále více důkazů naznačuje, že existuje komplementární regulace mezi Hsp70 a těmito zánětlivými mediátory. V modelech zánětu a mrtvice vedlo stabilizování up-regulace Hsp70 ke snížení genové exprese COX-2 a také snížení produkce oxidu dusného (NO) (Zheng et al. 2007; Jo et al. 2006). Tento protizánětlivý účinek je způsoben vazbou Hsp70 na NFκB, která zabraňuje jeho translokaci do jádra. U některých zánětlivých mediátorů dochází k negativní zpětné vazbě. Například nadměrná exprese COX-2 vede ke snížení exprese Hsp70 a inhibitor COX-2 má opačný účinek. Všechny popsané role proteinů tepelného šoku v ochraně buňky před oxidativním stresem jsou znázorněny na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: Role proteinů tepelného šoku v ochraně buňky před oxidativním stresem (Kalmar et Greensmith 2009)

3. HYPOTÉZA A CÍLE PRACE

Hypotéza mé diplomové práce je založena na poznatku o roli proteinů tepelného šoku a zvýšení jejich exprese ve stresových podmínkách. Ve své studii jsem navazovala na práci mé kolegyně z laboratoře Lenky Dvořákové, která sledovala míru genové exprese Hsp v placentární tkáni a plné periferní krvi u vybraných těhotenských komplikací. Navrhujeme, že stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi se projeví změnou profilu genové exprese proteinů tepelného šoku. Cílem bylo ukázat, zda se tyto změny se projeví v koncentraci jejich mRNA v plazmě těhotné ženy. V rámci své diplomové práce jsem se podílela na snaze skupiny profesorky Hromadníkové zjistit, zda jsou proteiny tepelného šoku vhodné k predikci pozdějšího výskytu vybraných těhotenských komplikací. Cílem mé diplomové práce bylo zjistit hladiny mRNA proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1) v plazmě těhotných žen v době klinické manifestace vybraných těhotenských komplikací (preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze). Dále také, zda hladina zmíněných Hsp reflektuje závažnost onemocnění a její souvislost s hodnotami indexů pulsatility získaných Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením krevních průtoků.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Pacientky

V rámci své diplomové práce jsem zpracovávala vzorky plazmy periferní krve těhotných žen. Vzorky od žen s fyziologickým těhotenstvím byly získávány na Gynekologicko-porodnické klinice Fakultní nemocnice v Motole a byly odebrány při pravidelných kontrolách. Vzorky od žen s vybranými diagnózami byly získány ve spolupráci s Ústavem pro péči o matku a dítě (ÚPMD) v pražském Podolí a odběry byly prováděny v rámci hospitalizace. Studovaná kohorta zahrnovala 78 žen s diagnostikovanou PE s/bez FGR, 25 žen s FGR, 33 žen s GH a 39 žen s fyziologickým těhotenstvím. Dále jsem vzorky dělila do skupin podle závažnosti klinických symptomů (mírná/závažná), do skupin podle týdne ukončení těhotenství (před/po 34. tt) a podle hodnot indexů pulsatility (PI) získaných Dopplerovým ultrazvukovým vyšetřením krevních průtoků. Počty vzorků v jednotlivých skupinách jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Diagnóza	Počet vzorků	Další rozdělení do skupin	Počet vzorků
Fyziologická těhotenství	39		
Preeklampsie +/- FGR	78	mírná	27
		závažná	51
		před 34. tt	30
		po 34. tt	48
		patologické průtoky v <i>arteria umbilicalis</i>	12
		patologické průtoky v <i>arteria cerebri media</i>	9
		CPR pod 5. percentilem	8
FGR	25	patologické průtoky v <i>arteria umbilicalis</i>	14
		patologické průtoky v <i>arteria cerebri media</i>	5
		CPR pod 5. percentilem	9
GH	33		

Tabulka č. 3: Počty zpracovaných vzorků krevní plazmy. Vzorky jsou rozděleny podle diagnóz; vzorky od žen s preeklampií jsou dále rozděleny na skupiny mírné a závažné preeklampsie a podle týdne gestace, kdy bylo těhotenství ukončeno. Dále jsou u preeklampsie a fetální růstové retardace uvedeny počty vzorků s patologickými průtoky v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* a počty vzorků s hodnotou cerebroplacentárního poměru pod pátým percentilem

Mezi ženy s fyziologickým těhotenstvím byly v naší studii zařazeny pouze ženy, které rodily v termínu, po 37. týdnu těhotenství, porodily jedno zdravé dítě s hmotností nad 2500 g a během naší studie u nich nebyly pozorovány žádné těhotenské a porodní komplikace. Preeklampsie byla diagnostikována po 20. týdnu těhotenství na základě krevního tlaku > 140/90 mm Hg ve dvou měřeních s šestihodinovým odstupem v kombinaci s proteinurií > 300 mg/ 24 hod. Diagnostika mírné a závažné PE byla učiněna na základě těchto kritérií:

- mírná preeklampsie: krevní tlak vyšší než 140/90 mm Hg ve dvou měřeních v rozmezí alespoň 6 hodin, proteinurie vyšší než 0,3 g za 24 hodin
- závažná preeklampsie: krevní tlak vyšší než 160/110 mm Hg ve dvou měřeních v rozmezí alespoň 6 hodin, proteinurie vyšší než 5 g za 24 hodin; v kombinaci

s některými z těchto kritérií: plicní edémy, cyanóza, oligurie (méně než 500 ml za 24 hodin), porucha funkce jater, trombocytopenie, výskyt fetální růstové retardace, poruchy zraku, těžké bolesti hlavy, bolest v epigastriu nebo v horním pravém kvadrantu

Fetální růstová retardace byla definována hmotností plodu pod desátým percentilem příslušného gestačního stáří.

Všechny ženy, které se zúčastnily této studie, poskytly písemný informovaný souhlas. Studie byla schválena etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

4.2. Metody

4.2.1. Izolace RNA z krevní plazmy

Odebraná periferní krev byla 10 minut centrifugována při 1200x g a pokojové teplotě. Oddělená krevní plazma byla do samotné izolace RNA skladována při -80°C . K izolaci RNA z plazmy byl využit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Při izolaci bylo postupováno podle návodu výrobce, který je uveden v protokolu č.1.

Protokol č.1: Izolace RNA z krevní plazmy

- K 1 ml plazmy bylo přidáno 3 ml Trizolu LS Reagent a promícháno pipetou.
- Poté byly vzorky 5 minut inkubovány při $15 - 30^{\circ}\text{C}$.
- Následně bylo přidáno 800 μl chloroformu a promícháno intenzivním třesením po dobu 15 sekund.
- Směs byla 15 minut inkubována při $15 - 30^{\circ}\text{C}$.
- Vzorky byly 15 minut centrifugovány při 12 000x g a teplotě 4°C .
- Vrchní vrstva chloroformu byla opatrně odebrána do čisté zkumavky.
- K té bylo přidáno 1,143 ml 100% etanolu a promícháno.
- Vzorek byl postupně přepipetován na kolonku (QIAamp spin column) a vždy 30 sekund centrifugován při 14 500 rpm
- Na kolonku bylo napipetováno 700 μl RW1 pufru a vzorek centrifugován 30 sekund při 14 500 rpm.
- Na kolonku bylo napipetováno 500 μl RPE pufru a vzorek centrifugován 30 sekund při 14 500 rpm.

- Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l RPE pufru a vzorek centrifugován 2 minuty při 14 500 rpm.
- Nakonec byl vzorek ještě jednou centrifugován 90 sekund při 14 500 rpm (kvůli odstranění zbytků ethanolu).
- Izolovaná RNA byla eluována přidáním 50 μ l Rnase-free vody a následnou centrifugací 90 sekund při 14500 rpm.
- Do vzorku bylo přidáno 5 μ l DNázy (Fermentas International, Ontario, Canada) a 5 μ l $MgCl_2$ (Fermentas International, Ontario, Canada) a vzorek byl inkubován 30 minut při teplotě 37 °C.
- Do vzorku bylo přidáno 5 μ l 50 mM EDTA a vzorek byl inkubován 10 minut při teplotě 65 °C.
- Koncentrace a čistota izolované RNA ze vzorku byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop 1000).
- Vzorek izolované RNA byl uchováván při teplotě -20 °C.

4.2.2. Kvantitativní RT-PCR v reálném čase

Ke kvantitativní analýze genové exprese jsem využívala metodu kvantitativní RT-PCR v reálném čase (reverse transcription polymerase chain reaction). Všechny vzorky izolované RNA byly ošetřeny DNázou (blíže popsáno výše v protokolech izolace RNA), aby se zabránilo případné DNA kontaminaci. Analýzu jsem prováděla na analyzátoru: ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Materiálem pro RT-PCR byla RNA získaná izolací z plazmy. Ve vzorcích jsem detekovala celkem 5 Hsp systémů: Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1. Jako endogenní kontrola byl zvolen β -aktin. Postup analýzy vzorků je popsán v protokolu č.2. Složení reakčních směsí bylo následující: TaqMan One-step RT-PCR Master Mix, přímý a zpětný primer pro β -aktin a pro jeden systém Hsp, TaqMan a/nebo MGB sondy pro β -aktin a pro jeden systém Hsp, reverzní transkriptáza (RT) a voda ošetřená DEPC. Poměr jednotlivých složek reakční směsi je uveden v tabulce č. 4. Sondy a primery byly od firmy Applied Biosystems (Primer Express version 2.0). Použitý Master Mix byl od stejné firmy: TaqMan[®] One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit. Primery byly naředěny na koncentraci 10 μ M a sondy na koncentraci 20 μ M. K analýze jsem používala osmijamkové stripy a jednotlivé vzorky byly vždy v duplikátech, referenční vzorek v triplikátu. Jako referenční vzorek pro

všechny analyzované vzorky jsem využívala placentární tkáň ženy s fyziologickým těhotenstvím. Při každé analýze byly 2 jamky naplněny reakční směsí a vodou ošetřenou DEPC a sloužily jako negativní kontrola, které nám daly informaci o sterilitě a preciznosti naší práce. Sekvence primerů a sond jsou uvedeny v tabulkách č.5 a 6. Vzorky mRNA z plazmy byl naředěny na 2 ng/μl. Do každé jamky bylo napipetováno vždy 5 μl vzorku, tudíž na jednu reakci bylo použito 10 ng RNA.

Protokol č.2: Kvantitativní RT-PCR v reálném čase

- Při pokojové teplotě se rozmrazily vzorky RNA, primery a sondy.
- Vzorky RNA získané izolací se naředily na potřebnou koncentraci.
- Následně se připravily reakční směsi. Poměry jednotlivých složek se lišily podle materiálu, ze kterého byla RNA izolována. Podrobný rozpis je uveden v tabulce č. 4.
- Do každé jamky bylo napipetováno 20 μl reakční směsi a 5 μl analyzovaného vzorku RNA.
- Víčkem uzavřené jamky byly umístěny do PCR přístroje.
- Nastavení podmínek PCR přístroje bylo provedeno podle manuálu výrobce. (Níže uvedené kroky probíhaly v přístroji automaticky.)
- Nejdříve proběhla reverzní transkripce (30 minut, 48 °C).
- Následně preinkubace vedoucí k aktivaci DNA polymerázy (10 minut, 95 °C).
- Nakonec proběhlo 50 cyklů dvoukrokové PCR: denaturace cDNA (15 s, 95 °C), anelace primerů a syntéza DNA (1 minuta, 60 °C).

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90	HspBP1
MM	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
DEPC voda	0,25	0,375	3,375	3,375	2
RT	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
hsp primery (F+R)	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
hsp sonda	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
beta-aktin primery (F+R)	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
beta-aktin sonda	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125

Tabulka č. 4: Složení reakčních směsí pro analýzu RNA izolované z krevní plazmy pomocí kvantitativní RT-PCR v reálném čase (objemy jsou uvedeny v µl, množství je pro jednu jamku)

Protein	Informace o genu	Sekvence přímého (forward) primeru
		Sekvence zpětného (reverse) primeru
β-aktin	ACTB, ID genu 60	5' - CCT GGC ACC CAG CAC AAT -3'
		5' - GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT -3'
Hsp27	HSPB1, ID genu 3315	5' - TCC CTG GAT GTC AAC CAC TTC -3'
		5' - TCT CCA CCA CGC CAT CCT -3'
Hsp60	HSPD1, ID genu 3329	5' - GAT GTT GAT GGA GAA GCT CTA AGT ACA -3'
		5' - TGC CAC AAC CTG AAG ACC AA -3'
Hsp70	HSPA1A, ID genu 3303	5' - ACC AAG CAG ACG CAG ATC TTC -3'
		5' - GCC CTC GTA CAC CTG GAT CA -3'
Hsp90	HSP90AA1, ID genu 3320	5' - TGC GGT CAC TTA GCC AAG ATG -3'
		5' - GAA AGG CGA ACG TCT CAA CCT -3'
HspBP1	HSPBP1, ID genu 23640	5' - TGG CCG ACC TGT GTG AGA -3'
		5' - GCA GGT GCA TGC CAG ACA -3'

Tabulka č. 6: Sekvence primerů použitých při kvantitativní RT-PCR analýze

Protein	Sekvence sond
Beta-aktin	5' - (VIC) ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG CGC (TAMRA) - 3' délka ampliconu: 70 bp
Hsp27	5' - (6FAM) CCC CGG ACG AGC TGA CGG TC (TAMRA) - 3' délka ampliconu: 67 bp
Hsp60	5' - (6FAM) TCG TCT TGA ATA GGC TAA AG (MGB) – 3' délka ampliconu: 69 bp
Hsp70	5' - (6FAM) CCT ACT CCG ACA ACC AAC CCG GG (TAMRA) - 3' délka ampliconu: 87 bp
Hsp90	5' - (6FAM) CCC AGA CCC AAG ACC AAC CGA TGG (TAMRA) - 3' délka ampliconu: 85 bp
HspBP1	5' - (6FAM) CAT GGA CAA TGC CG (MGB) – 3' délka ampliconu: 65 bp

Tabulka č. 7: Sekvence sond použitých při kvantitativní RT-PCR analýze

4.2.3. Metodika zpracování výsledků

K analýze relativních změn genové exprese jsem využila tzv. komparativní Ct metodu (Livak et Schmittgen 2001). Prahová hodnota (Ct; cycle threshold) vyjadřuje cyklus, při kterém amplifikační křivka poprvé překročí limit detekce fluorescence. Z hodnot Ct, které získáme RT-PCR analýzou nejdříve vypočítáme hodnotu ΔCt , která je rovna rozdílu průměrných hodnot Ct pro Hsp a průměrných hodnot Ct pro referenční gen (v našem případě gen pro β -aktin). Tím je eliminována variabilita v rámci stanovení (např. nepatrné rozdíly v pipetování). Rozdílem ΔCt analyzovaného a referenčního vzorku získáme hodnotu $\Delta\Delta Ct$. Z této hodnot je vypočítána hodnota $2^{-\Delta\Delta Ct}$, čímž docílíme převodu $\Delta\Delta Ct$ do absolutní hodnoty.

Výsledné hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ jsem statisticky zpracovala pomocí programu Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Pomocí Shapiro-Wilk testu jsem testovala normalitu dat. U všech skupin vzorků měly hodnoty nenormální rozdělení. Pro porovnání dvou skupin/diagnóz byl použit Mann-Whitney U test a pro porovnání více skupin/diagnóz Kruskal-Wallis test. Pro porovnání koncentrace mRNA pro Hsp v plazmě s výsledky Dopplerovského ultrazvukového vyšetření byl využit Mann-Whitney U test.

5. VÝSLEDKY

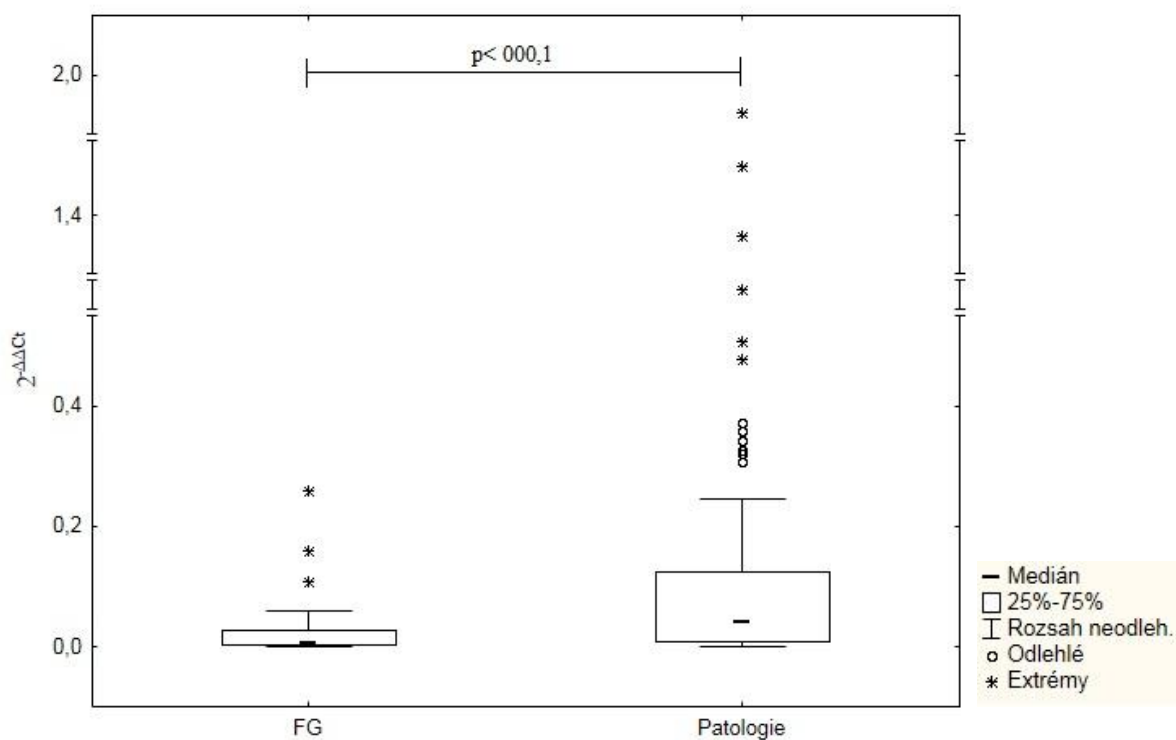
Proces izolace RNA z plazmy a kvantifikace RNA pomocí RT-PCR v reálném čase byl optimalizován skupinou paní profesorky Hromadníkové ještě před mým nástupem do této laboratoře.

Už na počátku mého výzkumu se ukázalo, že plazmatická koncentrace mRNA pro HspBP1 je natolik nízká, že její detekce je velice nespolehlivá. Pozitivní amplifikace Hsp60 byla detekována u limitovaného počtu vzorků. Proto se domníváme, že tyto dva proteiny jsou pro budoucí spolehlivou predikci vybraných těhotenských komplikací nevhodné a z dalších analýz byly vyřazeny. Kompletní analýzu plazmatické koncentrace mRNA jsem tedy provedla na Hsp27, Hsp70 a Hsp90.

Pro přehlednost jsou statisticky signifikantní výsledky v textu vyznačeny tučně.

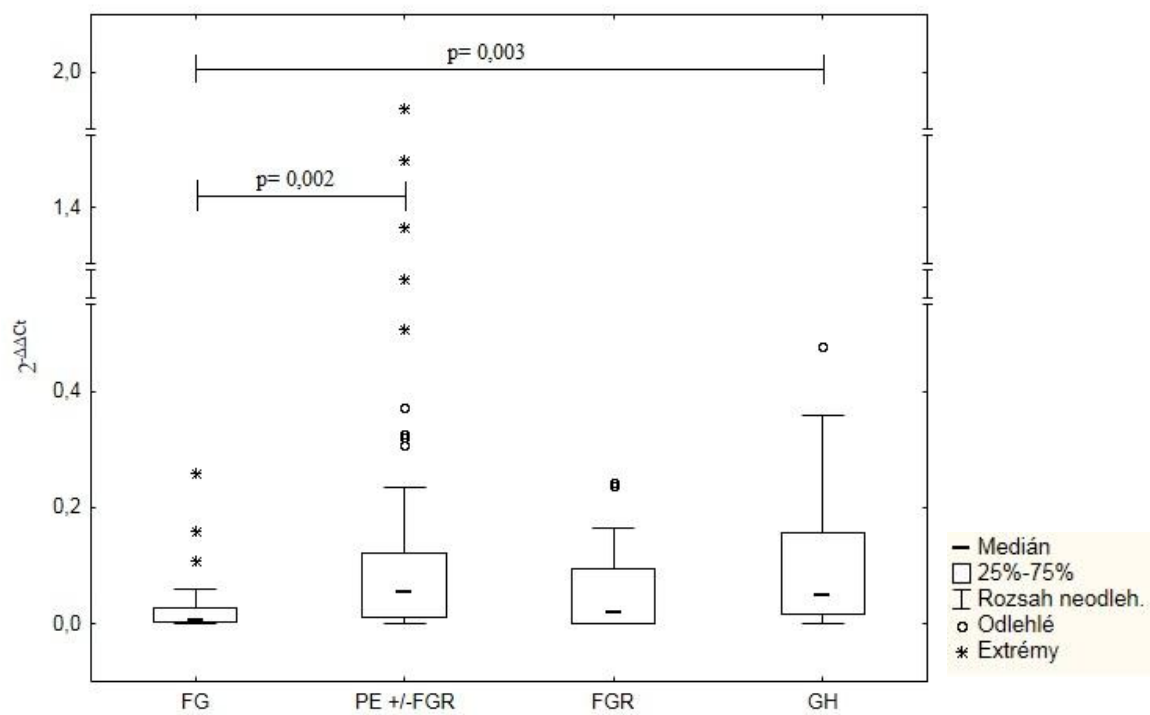
5.1. Koncentrace mRNA pro Hsp v plazmě

Jednotlivé vzorky jsem nejdříve rozdělila na fyziologická a patologická těhotenství (zahrnující preeklampsii, fetální růstovou retardaci a gestační hypertenzi). V první skupině bylo 39 vzorků a v druhé celkem 136 vzorků. Pomocí Mann-Whitney statistického testu jsem porovnávala získané hodnoty těchto dvou skupin. Ukázalo se, že statisticky signifikantní zvýšení genové exprese v porovnání se skupinou fyziologických těhotenství bylo pouze u **Hsp70** ($p < 0,001$; viz graf č.1). U Hsp27 a Hsp90 nebylo pozorováno statisticky významné zvýšené exprese ($p = 0,768$; $p = 0,104$).



Graf č. 1: Porovnání genové exprese Hsp70 u fyziologických a patologických těhotenství

Dále jsem porovnávala vzorky rozdělené do 4 skupin: fyziologická těhotenství (FG), preeklampsie s/bez FGR (PE± FGR), fetální růstová retardace (FGR) a gestační hypertenze (GH). Počty vzorků ve skupinách byly následující: FG – 39, PE± FGR – 78, FGR – 25, GH – 33. Statisticky signifikantní výsledky jsem získala opět pouze u proteinu **Hsp70**. Kruskal-Wallisova analýza potvrdila zvýšení exprese u skupin PE± FGR (**p= 0,002**) a GH (**p= 0,003**) v porovnání s FG (viz graf č.2), u skupiny FGR signifikantní zvýšení pozorováno nebylo (p= 0,996). Pozoruhodné je, že úroveň RNA pro Hsp70 se nelišily mezi skupinou PE ± FGR a GH (p= 1,0). Cut-off analýza (medián + směrodatná odchylka skupiny FG) úroveň RNA pro Hsp70 ukázala následující výsledky pro PE ± FGR: p< 0,001, poměr šancí [odds ratio; OR], 8,31; 95% konfidenční interval [CI], 2,69 – 25,62 a pro GH: p< 0,001, poměr šancí [OR], 8,23; 95% konfidenční interval [CI], 2,38 – 28,44). U Hsp27 a Hsp90 se plazmatická úroveň RNA nelišila od FG skupina PE ± FGR (p= 1,0; p= 0,271), skupina FGR (p= 1,0; p=1,0) a skupina GH (p= 1,0; p= 1,0). Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulce č.8.



Graf č. 2: Porovnání genové exprese Hsp70 u jednotlivých skupin diagnóz

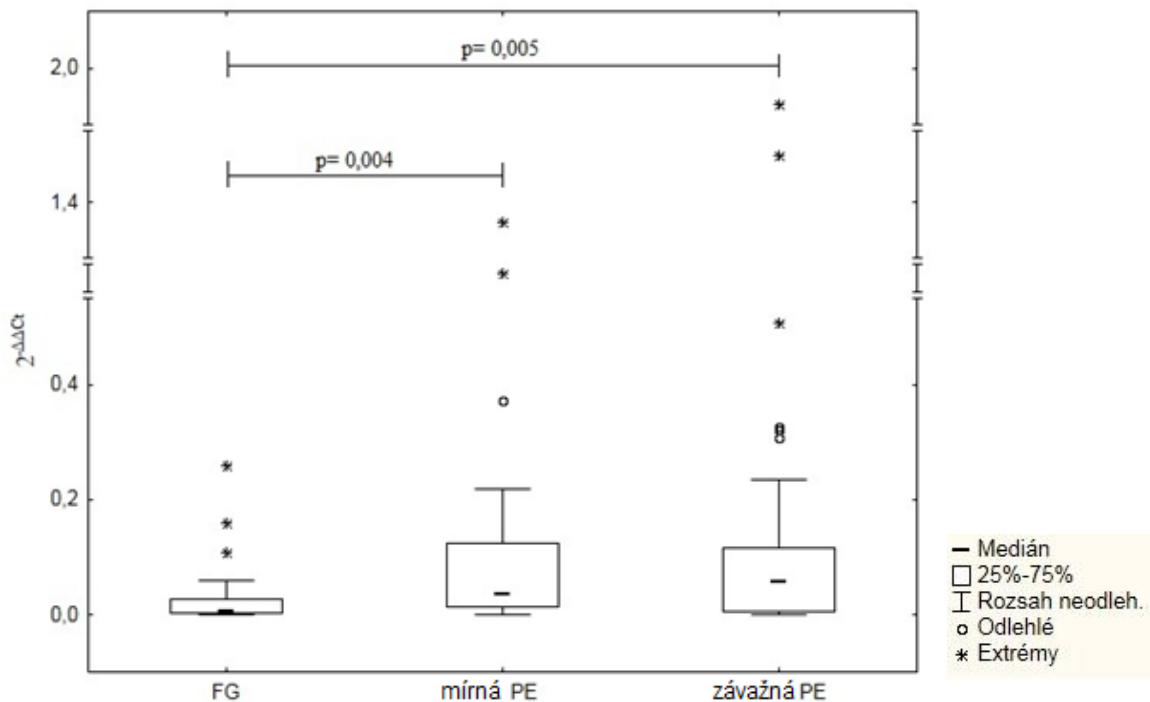
Hsp27	FG	PE ± FGR	FGR	GH
FG		1,0	1,0	1,0
PE ± FGR	1,0		0,810	1,0
FGR	1,0	0,810		1,0
GH	1,0	1,0	1,0	
Hsp70	FG	PE ± FGR	FGR	GH
FG		0,002	0,996	0,003
PE ± FGR	0,002		0,732	1,0
FGR	0,996	0,732		0,489
GH	0,003	1,0	0,489	
Hsp90	FG	PE ± FGR	FGR	GH
FG		0,271	1,0	1,0
PE ± FGR	0,271		1,0	1,0
FGR	1,0	1,0		1,0
GH	1,0	1,0	1,0	

Tabulka č. 8: Kompletní výsledky (p hodnoty) statistické analýzy porovnávající míru exprese Hsp27, Hsp70, Hsp90 mezi jednotlivými skupinami (FG – fyziologická těhotenství, PE ± FGR – preeklampsie s/bez fetální růstové retardace, FGR – fetální růstová retardace, GH – gestační hypertenze). Statisticky signifikantní výsledky jsou vyznačeny tučně

5.2. Plazmatická koncentrace mRNA pro Hsp a závažnost těhotenských komplikací

Abych zjistila, zda se v úrovni exprese Hsp projevuje i závažnost těhotenských komplikací rozdělila jsem vzorky na několik dalších podskupin. Zde jsem se věnovala pouze skupině PE± FGR, ve které se daly vzorky rozdělit na mírnou PE (27 vzorků) a závažnou PE (51 vzorků). U obou skupin jsem zjistila statisticky významný rozdíl u **Hsp70** v porovnání s FG (**p= 0,004**; **p= 0,005**; graf č.3). Míra exprese RNA pro Hsp70 mezi skupinami mírné PE a závažné PE mezi sebou se opět nelišila (p= 1,0). Následná cut-off analýza (medián + směrodatná odchylka skupiny FG) úrovně RNA pro Hsp70 potvrdila nejvyšší hodnotu odchylky u skupiny závažné PE (p< 0,001, poměr šancí [OR], 9,84; 95% konfidenční interval [CI], 3,05 – 31,77). Koncentrace transkriptu pro Hsp27 se u skupiny mírné PE a skupiny závažné PE

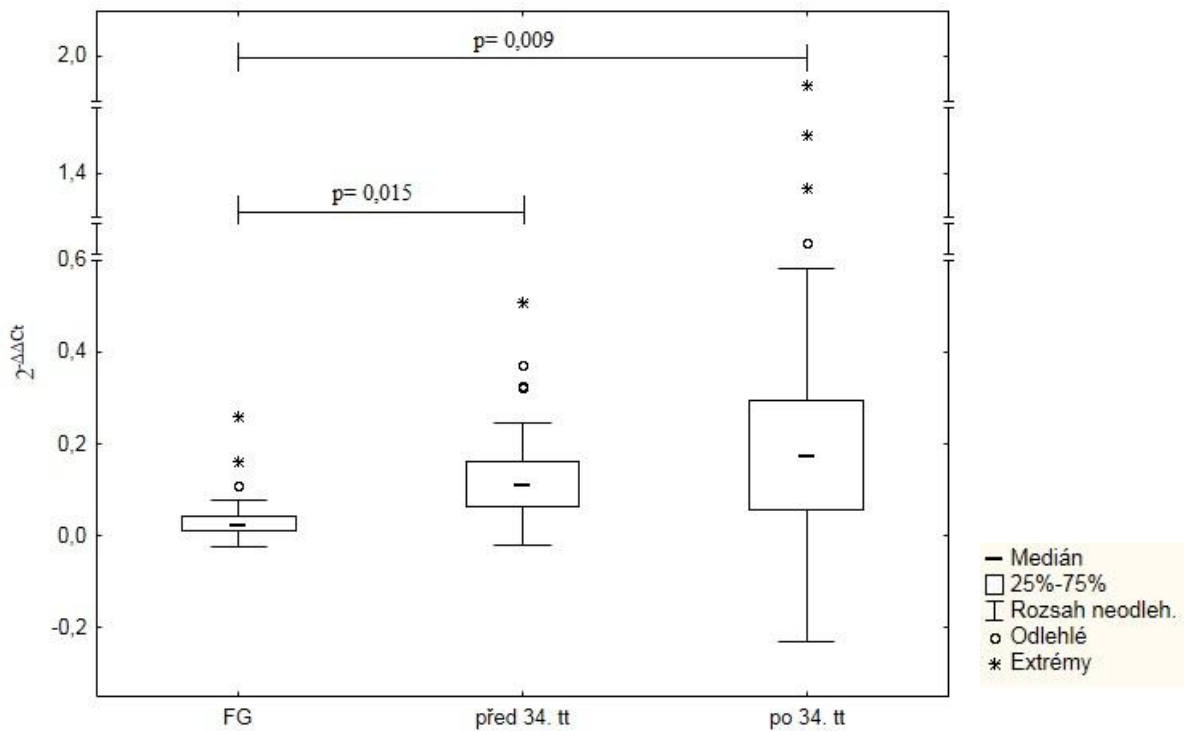
nelišila od FG ($p=0,246$; $p=1,0$). Ke stejnému závěru jsem došla i u analýzy Hsp90 ($p=0,114$; $p=0,335$).



Graf č. 3: Plazmatické koncentrace mRNA pro Hsp70 u žen s preeklampsii rozdělené do dvou skupin mírné a závažné preeklampsie ve srovnání s koncentrací mRNA u žen s fyziologickým těhotenstvím

Závažnost preeklampsie se dá posuzovat i podle týdnu ukončení těhotenství. Vzorky jednotlivých diagnóz jsem rozdělila na 2 podskupiny – porod před a po 34. týdnu těhotenství. Ve skupinách diagnóz FGR a GH byl v jednotlivých podskupinách malý počet vzorků (7 a 18; 3 a 30), abych je mohla statisticky analyzovat. Věnovala jsem se zde tedy opět pouze skupině PE. Skupina PE s ukončenou graviditou před 34. tt obsahovala 30 vzorků a skupina s ukončenou graviditou po 34. tt zahrnovala 48 vzorků. U obou skupin bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese vůči skupině FG pouze u **Hsp70** ($p=0,015$; $p=0,009$) a je znázorněno v grafu č.4. Koncentrace mRNA skupin před a po 34. tt mezi sebou se opět nelišila ($p=1,0$). Výsledky cut-off analýzy (medián + směrodatná odchylka skupiny FG) byly pro obě podskupiny následující: PE před 34. tt: ($p<0,001$; poměr šancí [OR], 11,44; 95% konfidenční interval [CI], 3,24 – 40,4), PE po 34. tt: ($p<0,001$; poměr šancí [OR], 8,05; 95% konfidenční interval [CI], 2,47 – 26,18). Míra exprese Hsp27 a Hsp90 se u obou podskupin nelišila ve srovnání s mírou exprese u fyziologických gravidit (Hsp27, $p=1,0$, $p=0,183$; Hsp90, $p=0,118$, $p=0,348$).

Skupinu vzorků od žen s preeklampií jsem dále rozdělila na dvě podskupiny: PE superponovaná na předchozí hypertenzi a PE bez předchozí hypertenze. Koncentrace mRNA pro jednotlivé Hsp jsem opět porovnávala s koncentrací mRNA u žen s fyziologickým těhotenstvím. Tato analýza neukázala žádné signifikantní změny úrovně exprese (Hsp27, $p=0.842$; Hsp70, $p=0.761$; Hsp90, $p=0.937$).



Graf č.4: Plazmatické koncentrace mRNA pro Hsp70 u žen s preeklampií rozdělené do dvou skupin podle týdnu ukončení těhotenství ve srovnání s koncentrací mRNA u žen s fyziologickým těhotenstvím

5.3. Vztah mezi plazmatickou koncentrací mRNA pro Hsp a výsledky Dopplerovského ultrazvukového vyšetření

Dopplerovské ultrazvukové vyšetření je v současné době důležitou součástí diagnostiky těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí. Jde o zobrazovací techniku, která za využití principu ultrazvuku a Dopplerova jevu umožňuje vizualizaci průtoku krve cévami. Pomocí této metody mohou lékaři posoudit funkčnost placenty. U těhotných žen se měření získávají hodnoty pulsatility (PI) v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media*. Při fyziologické průběhu těhotenství dochází k postupnému snižování PI v *arteria umbilicalis* a jako kritická hodnota pro diagnostiku placentární insuficience je 95. percentil pro dané

gestační stáří. U *arteria cerebri media* dochází vlivem placentární insuficience naopak k poklesu hodnoty PI a kritická hodnota pro její diagnostiku je pátý percentil pro dané gestační stáří (Parra-Cordero et al. 2007). Kromě indexů pulsatility se také udává cerebroplacentární poměr (CPR), který udává poměr PI v *arteria cerebri media* a *arteria umbilicalis*. Hodnoty CPR pod pátým percentilem jsou určeny jako patologické.

Hodnoty PI a CPR byly uvedeny pouze u některých žen s preeklampsií a některých žen s fetální růstovou retardací. Do této analýzy bylo celkem zahrnuto 103 žen, z nichž 26 mělo abnormální hodnotu PI v *arteria umbilicalis*, 14 v *arteria cerebri media* a 17 mělo abnormální hodnotu cerebroplacentárního poměru. Statistická analýza byla provedena tak, že vzorky preeklampsie a fetální růstové retardace byly rozděleny na dvě skupiny podle hodnot PI nebo CPR na skupinu s normálními průtoky a skupinu s abnormálními průtoky. Plazmatická koncentrace mRNA pro jednotlivé Hsp pak byla porovnávána mezi těmito skupinami.

Porovnání koncentrace mRNA u skupin rozdělených na základě hodnot PI v *arteria umbilicalis* neukázalo žádný signifikantní rozdíl (Hsp27, $p=0.126$; Hsp70, $p=0.872$; Hsp90, $p=0.199$). Stejně tomu bylo u skupin rozdělených na základě hodnot PI v *arteria cerebri media* (Hsp27, $p=0.465$; Hsp70, $p=0.392$; Hsp90, $p=0.465$) i u skupin rozdělených na základě hodnot CPR (Hsp27, $p=0.145$; Hsp70, $p=0.379$; Hsp90, $p=0.065$).

6. DISKUZE

V posledních letech se stále častěji můžeme setkávat se studiem detekcí nukleových kyselin a proteinů v periferní krvi matky ve spojitosti s diagnostikou a predikcí těhotenských komplikací. V průběhu celého těhotenství dochází k remodelaci placentární tkáně a do krevního oběhu se uvolňují extracelulární nukleové kyseliny obsažené v apoptotických tělíscích pocházejících z buněk trofoblastu. Bylo prokázáno, že v průběhu těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí dochází k výraznému zvýšení apoptózy placentárního trofoblastu a následnému uvolňování obsahu těchto buněk do krevního oběhu matky (Redman et al. 1999; Redman et al. 2004; Orozco et al. 2006). V krvi matky tak kolují nejen proteiny a nukleové kyseliny pocházející z jejích vlastních buněk, ale i z buněk plodu a placentární tkáně. V periferní krvi matky se tak projevuje nejen odpověď mateřského organismu i plodu na stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi. Již mnohokrát bylo prokázáno, že složení mateřské periferní krve je schopné reflektovat patologický průběh těhotenství prostřednictvím různých expresních profilů řady proteinů. Pravidelný screening těhotných žen pomocí markeru/markerů pro těhotenské komplikace by znamenal včasné odhalení těchto problémů, zmírnění jejich dopadů na zdraví matky a plodu, snížení nákladů na zdravotní péči a vyšší šance na narození zdravého dítěte. V současné době se již kombinace ultrazvukové sonografie a vyšetření biochemických markerů využívá k diagnostice Downova syndromu v průběhu prvního trimestru. Nyní se dokonce vědci zabývají vytvářením matematických modelů kombinujících několik biomarkerů pro predikci preeklampsie. Akolekar a jeho kolektiv vytvořili na základě velké studie algoritmus zahrnující několik markerů (PIGF, PAPP-A, PP13, inhibin-A, activin-A, sEng, pentraxin-3, p-selektin), měření krevního tlaku a Dopplerovské ultrazvukové vyšetření (Akolekar et al. 2009). Měření od 11 + 0 do 13 + 6 týdne těhotenství ukázalo následující pravděpodobnosti predikce: 91 % pro PE s brzkým nástupem, 79,4 % pro PE s intermediálním nástupem a 60,9 % pro PE s pozdním nástupem (5 % falešně pozitivních výsledků). Objevení dalších biomarkerů těhotenských komplikací by mohlo ještě zvýšit úspěšnost predikce.

Proteiny tepelného šoku jsme pro tento výzkum vybrali hned z několika důvodů. Jedním z nich byly již optimalizované systémy analýzy genové exprese proteinů tepelného šoku. Tyto postupy byly skupinou profesorky Hromadníkové využity ve studiích, zabývajících se například různými typy leukémie nebo revmatoidní artritidou. Zejména pak ve výzkumu mé kolegyně Lenky Dvořákové, která sledovala expresi Hsp v placentární tkáni a

plné krvi v souvislosti s těhotenskými komplikacemi. Optimalizace těchto metod pro výzkum plazmatické mRNA tak vyžadovala pouze minimum úprav. Dalším neméně důležitým důvodem byla řada studií zabývajících se studiem Hsp ve vztahu k mnoha jiným patologiím, zejména nádorovým a autoimunitním onemocněním. Poznatky o cytoprotektivní funkci Hsp vedly k domněnce, že tyto proteiny mohou reflektovat i jiná onemocnění, právě například těhotenské komplikace. V této souvislosti bylo několik studií provedeno, ale jejich detekce byla prováděna především u buněk placentární tkáně, případně v plné periferní krvi. Tyto studie přinesly různé výsledky, nicméně většina z nich poukazovala na protein Hsp70, jako možný budoucí biomarker vybraných těhotenských komplikací (zejména preeklampsie).

Ve své diplomové práci jsem zjišťovala, zda proteiny tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1) mohou sloužit jako biomarkery těhotenských komplikací (preeklampsie, gestační hypertenze a fetální růstové retardace) v době jejich klinické manifestace. Sledovala jsem koncentraci jejich mRNA pro tyto Hsp v plazmě těhotné ženy a její vztah ke zmíněným těhotenským komplikacím.

Již na počátku své studie jsem z dalších analýz vyřadila proteiny Hsp60 a HspBP1. Koncentrace mRNA pro HspBP1 byla v plazmě velice obtížně detekovatelná a pomocí našich metod byla zjištěna u velmi malého procenta vzorků. Nemohly bychom tedy otestovat statistickou významnost těchto výsledků. Důvodem je pravděpodobně velmi nízká koncentrace jejich mRNA v plazmě. Nízká plazmatická koncentrace mRNA pro HspBP1 pravděpodobně souvisí s vysokou koncentrací mRNA pro Hsp70, která byla pozorována. Ve stresových podmínkách se u buněk zpravidla zvyšuje genová exprese Hsp70, a to vzhledem k jeho cytoprotektivní funkci. HspBP1 je inhibítorem Hsp70 (Raynes et Guerriero 1998), proto se domníváme, že ve stresových podmínkách je jeho genová exprese naopak snížena.

Protein Hsp60 byl z analýzy vyřazen z důvodu amplifikace u minimálního počtu vzorků. Co se týče jeho genové exprese v placentární tkáni a plné krvi matky, tak signifikantní zvýšení v porovnání s FG bylo pozorováno pouze u plné krve (Dvořáková 2013). Výsledky naznačují, že vlivem námi zkoumaných těhotenských komplikací dochází ke zvýšení genové exprese u mateřských buněk, nicméně signifikantní zvýšení jeho genové exprese v placentární tkáni se v našich experimentech nepotvrdilo. V literatuře jsem objevila pouze jednu studii zabývajících se touto problematikou. Koh a jeho kolegové se věnovali detekci Hsp60 v krevním séru těhotných žen v souvislosti s preeklampsií (Koh et al. 2005). Pomocí ELISA metody detekovali Hsp60 pouze u 34 % žen bez preeklampsie a u 40 % žen s

preeklampií. Žádný vztah úrovně Hsp60 a preeklampsie nezaznamenali. Tento článek podporuje naše přesvědčení, že detekce plazmatické mRNA pro Hsp60 pravděpodobně nebude vhodnou metodou diagnostiky a predikce námi studovaných těhotenských komplikací.

Tento výzkum ukázal, že hladina exprese Hsp27 a Hsp90 se u žádné skupiny žen s patologickým průběhem těhotenství v porovnání se skupinou žen s fyziologickým těhotenstvím nelišila. Studie jejich genové exprese v placentární tkáni také nepoukázala na žádný signifikantní rozdíl mezi ženami s fyziologickým těhotenstvím a ženami s těhotenskými komplikacemi. V plné periferní krvi bylo pozorováno signifikantní snížení exprese Hsp90 u žen s preeklampií v porovnání s FG (Dvořáková 2013). Dle mých informací žádná další studie zkoumající hladinu mRNA Hsp27 a Hsp90 v plné krvi nebo plazmě v souvislosti s těhotenskými komplikacemi nebyla provedena. Výsledky zde mohly být ovlivněny počtem vzorků, nicméně i přesto se domníváme, že naše experimenty ukázaly, že Hsp27 a Hsp90 nejsou vhodnými markery námi studovaných těhotenských komplikací.

Nadějným plazmatickým markerem by však mohl být Hsp70, u něhož byly v souvislosti s některými námi sledovanými těhotenskými komplikacemi detekovány zvýšené hladiny mRNA v mateřské plazmě. Signifikantní zvýšení v porovnání s FG bylo pozorováno u skupin PE ± FGR a GH, nikoliv však u FGR. U analýzy genové exprese v plné periferní krvi matky bylo pozorováno statisticky signifikantní zvýšení u všech tří skupin patologií v porovnání s kontrolní skupinou žen s fyziologickým těhotenstvím (Dvořáková 2013). V placentární tkáni však toto zvýšení pozorováno nebylo. Nicméně další čtyři studie provedené jinými vědeckými skupinami signifikantní zvýšení genové exprese Hsp70 v placentární tkáni potvrdily (Abdulsid et al. 2013; Barut et al. 2010; Padmini et Geetha 2008; Liu et al. 2008). Domnívám se tedy, že ke zvýšení jeho exprese v placentární tkáni dochází a rozdílné výsledky mohly být způsobeny odběrem jiné části placentární tkáně či nedostatečným počtem vzorků.

Naše hypotéza, že oxidativní stres, hemodynamický stres a ischemie placenty či jiných orgánů vede ke zvýšení koncentraci mRNA v cirkulaci matky je podporována i několika dalšími nezávislými studii. Molvarec a jeho vědecká skupina provedli řadu experimentů, které poukázaly na zvýšené hladiny cirkulujícího Hsp70 u žen trpících gestační hypertenzí či preeklampií (Molvarec et al. 2011; Molvarec et al. 2010; Molvarec et al. 2009; Madách et al. 2008; Molvarec et al. 2007). Příčin zvýšené exprese Hsp70 u žen s placentární insuficiencí může být hned několik. V důsledku uvolňování částí fetálních a placentárních buněk do

krevní cirkulace matky dochází k aktivaci mateřských cirkulujících monocytů a následně dalších imunitních buněk. Usuzuji tedy, že námi detekovaná mRNA Hsp70 může být důsledkem systémové odpovědi matky, ale i zvýšenou genovou expresí v placentární tkáni.

Analýza vztahu koncentrace mRNA pro Hsp v plazmě a hodnot indexu pulsatility (PI) v *arteria umbilicalis*, *arteria cerebri media* a hodnot CPR neukázala žádnou závislost. Vzhledem k výše zmíněným signifikantním výsledkům jsem očekávala, že u skupin s abnormálními hodnotami bude koncentrace mRNA pro Hsp70 zvýšena. Důvod nenaplnění mého očekávání přikládám malému počtu vzorků, u kterých byly abnormální hodnoty určeny. Tuto analýzu by bylo potřeba provést na výrazně větší kohortě těhotných žen, aby bylo možné tuto souvislost potvrdit, či vyvrátit.

7. SOUHRN

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit vztah plazmatické koncentrace mRNA proteinů tepelného šoku a výskytu vybraných těhotenských komplikací (preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze). Na základě tohoto vztahu pak zhodnotit, zda by některý ze studovaných Hsp mohl být použitelný jako biomarker pro jejich predikci a diagnostiku. Signifikantní zvýšení koncentrace mRNA u patologických těhotenství ve srovnání s fyziologickými bylo pozorováno pouze u Hsp70. Dále bylo zvýšení koncentrace pozorováno u skupiny preeklampsie a gestační hypertenze ve srovnání s koncentrací u žen s fyziologickým těhotenstvím. Koncentrace mRNA mezi těmito dvěma skupinami diagnóz se nelišily. Rozdělení vzorků preeklampsie na mírnou a závažnou ukázalo signifikantní zvýšení koncentrace mRNA u obou skupin (v porovnání s koncentrací u žen s fyziologickým těhotenstvím) a mezi sebou se opět nelišily. Vzorky preeklampsie jsem dále rozdělila podle týdne ukončení těhotenství na skupinu před a po 34. týdnu těhotenství. V porovnání s fyziologickým těhotenstvím obě skupiny také vykazovaly signifikantní zvýšení exprese. Míra exprese Hsp70 se u těchto skupin preeklampsie mezi sebou opět nelišila. Výsledky analýzy ukázaly, že Hsp70 by mohl být vhodným plazmatickým markerem pro diagnostiku preeklampsie a gestační hypertenze. Nyní je potřeba zjistit, zda by mRNA pro Hsp70 byla vhodným prediktivním markerem těchto komplikací. Mým návrhem předmětu další studie je tedy provedení analýzy sledování plazmatické koncentrace mRNA pro Hsp70 v prvním trimestru. Pokud by se opět potvrdila signifikantně zvýšená koncentrace, věnovali bychom se studii kombinující více potenciálních markerů. Algoritmus několika biomarkerů by mohl představovat prediktivní metodu o vyšší senzitivitě a specificitě.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdulsid A, Hanretty K, Lyall F. Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia. *PLoS One*. 2013; 8(1): 2–8.
- Afifi Y, Churchill D. Pharmacological treatment of hypertension in pregnancy. *Current Pharmaceutical Design*. 2003; 9(21): 1745–53.
- Akolekar R, Syngelaki A, Beta J, Kocylowski R, Nicolaides KH. Maternal serum placental protein 13 at 11-13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenatal Diagnosis*. 2009. 29(12): 1103–8.
- Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late preeclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenatal Diagnosis*. 2011; 31(1): 66–74
- Anderson UD, Olsson MG, Rutardóttir S, Centlow M, Kristensen KH, Isberg PE, Thilaganathan B, Akerström B, Hansson SR. Fetal Hemoglobin and α 1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204(6): 520: 1–5.
- Arrigo AP. The cellular „networking“ of mammalian Hsp27 and its function in the control of protein folding, redox state and apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007; 594: 14–26.
- Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, Harma MI, Ozdamar SO. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathology Research and Practice*. 2010; 206(9): 651–56.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(8): 469–475.
- Bon C, Raudrant D, Poloce F, Champion F, Golfier F, Pichot J, Revol A. Biochemical profile of fetal blood sampled by cordocentesis in 35 Pregnancies complicated by growth retardation. *Pathologie-Biologie*. 2007; 55(2): 111–20.
- Blair E, Stanley F. Intrauterine growth and spastic cerebral palsy. Association with birth weight for gestational age. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990; 162(1): 229–37.
- Brown MA, Zhu L, Schmidt CT, Tucker PW. Hsp90 – from signal transduction to cell transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 363(2): 241–46.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(9): 645–652.
- Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reproductive Biomedicine Online*. 2003; 6(1): 84–96.

- Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004; 11(6): 342–52. Review.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein Hsp72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(27): 17147–53.
- Calebrase V, Stella AM, Butterfield DA, Scapagnini G. Redox regulation in neurodegeneration and longevity: role of the heme oxygenase and Hsp70 systems in brainstress tolerance. *Antioxidation & Redox Signaling*. 2004; 6(5): 895–913. Review.
- Centlow M, Carninci P, Nemeth K, Mezey E, Brownstein M, Hansson SR. Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertility and Sterility*. 2008; 90(5): 1834–43.
- Coolman M, de Groot CJ, Steegers EA, Geurts-Moespot A, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP, Sweep FC. Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2006; 128(1-2): 22–28.
- Crevel G, Bates H, Huikeshoven H, Cotterill S. The Drosophila Dpit47 protein ss a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *Journal of Cell Science*. 2001; 114(Pt 11): 2015–25.
- Crisp F, Domínguez C, Llurba E, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006; 195(1): 201–7.
- Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, Borzychowski A, et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*. 2003; 126(2): 149–60.
- Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998; 179(5): 1359–75.
- Dekker G, Robillard PY. The birth interval hypothesis - does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis. *Journal of Reproductive Immunology*. 2003; 59(2): 245–51.
- Dowling P, Walsh N, Clynes M. Membrane and membrane-associated proteins involved in the aggressive phenotype displayed by highly invasive cancer cells. *Proteomics* 2008; 8(19): 4054–65.
- Duckitt K, Harrington D. Risk Factors for Pre-Eclampsia at Antenatal Booking: Systematic Review of Controlled Studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*. 2005; 330(7491): 565.
- Dukát A, Korbel M, Sirotiaková J, Kriška M. Hypertenzia a gravidita. Ústav Farmakológie LF UK Bratislava. 2003; 548–51.

- Dvořáková, L., 2013. Význam proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Hromadníková, I.
- Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003; 188(5): 1241–43.
- Fisher SJ. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004; 2: 53.
- Foidart JM, Munaut C, Chantraine F, Akolekar R, Nicolaides KH. Maternal plasma soluble endoglin at 11-13 weeks' gestation in preeclampsia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2010; 35(6): 680–87.
- Fukushima A, Kawahara H, Isurugi C, Syoji T, Oyama R, Sugiyama T, Horiuchi S. Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2005; 31 (1): 72–77.
- Garovic VD. Hypertension in pregnancy: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. Mayo Clinic. 2000; 75(10): 1071–76. Review.
- Gorman AM, Szegezdi E, Quigney DJ, Samali A. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2005; 327(3): 801–810.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18): 3995–4021.
- Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*. 2003; 22(43): 6669–78.
- Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, Nielsen MN, Eiberg H, Børghlum AD, Mogensen J, Kristiansen K, Bolund L, Gregersen N. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Human Genetics*. 2003; 112(1): 71–77.
- Hawle P, Siepmann M, Harst A, Siderius M, Reusch HP, Obermann WMJ. The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2006; 26(22): 8385–95.
- Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta*. 2001; 22(5): 399–404.
- Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Molecular Human Reproduction*. 2004; 10(4): 237–46.
- Chappell S, Morgan L. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clinical Science (London, England : 1979)*. 2006; 110(4): 443–58.

- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*. 2005; 86(6): 627–37.
- Ilbert M, Horst J, Ahrens S, Winter J, Graf PC, Lilie H, Jakob U. The redox-switch domain of Hsp33 function as dual stress sensor. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2007; 14(6): 556–63.
- Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002; 186(1): 158–66.
- Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada KI, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *European Journal of Biochemistry*. 2002; 269(23): 5931–38.
- Jauniaux E, Watson L, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *The American Journal of Pathology*. 2000; 157(6): 2111–22.
- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *The American Journal of Pathology*. 2003; 162(1): 115–25.
- Jo SK, Ko GJ, Boo CS, Cho WY, Kim HK Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury. *Journal of the American Society and Nephrology*. 2006; 17(11): 3082–3092.
- Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota A, Nicolaidis KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2008; 31(6): 618–24.
- [Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61\(4\): 310–8. Review.](#)
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*. 2009; 14(1): 105–11.
- Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 2003; 163(3): 457–61.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of Reproduction*. 2003; 69(1): 1–7.
- Kenny LC, Broadhurst DI, Dunn W, Brown M, North RA, McCowan L, et al. Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. *Hypertension*. 2010; 56(4): 741–49.

- Khalil A, Cowans NJ, Spencer K, Goichman KS, Meiri H, Harrington K. First-trimester markers for the prediction of preeclampsia in women with a-priori high risk. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2010; 35(6): 671–79.
- Khalil RA, Granger JP. Vascular mechanism of increased arterial pressure in preeclampsia: lesson from animal models. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002; 283(1): 29-45. Review.
- Kingdom JCP, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*. 1997; 18 (8): 613–21.
- Koll H, Guiard B, Rassow J, Ostermann J, Horwich L, Neupert W, Hartl FU. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*. 1992; 68(6): 1163–75.
- Kristensen K, Wide-Swensson D, Schmidt C, Blirup-Jensen S, Lindström V, Strevens H, et al. Cystatin C, beta-2-microglobulin and beta-trace protein in pre-eclampsia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2007; 86(8): 921–26.
- Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*. 2005; 157(3): 175–88.
- Lackman F, Capewell V, Richardson B, DaSilva O, Gagnon R. The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001; 184(5): 946–53.
- Laivouri H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Häivä-Mällinen L, Sundström H, et al. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *American Journal of Human Genetics*. 2003; 72(1): 168–77
- Lenfant C. National Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Working Group report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000; 3(2): 75–88.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355(10): 992–1005.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Kai F Yu, Enrique F Schisterman, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*. 2004; 350(7): 672–83.
- Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2000; 278(5): C982–88.
- Liu Y, Li N, You L, Liu X, Li H, Wang X. HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Molecular Medicine*. 2008; 14(9-10): 561–66.

- Lou HC, Nordentoft M, Jensen F, Pryds O, Nim J, Hemmingsen R. Psychosocial stress and severe prematurity. *Lancet*. 1992; 340(8810): 54.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2001; 25 (4): 402–8.
- de Luca Brunori I, Battini L, Simonelli M, Clemente F, Brunori E, Mariotti ML, Genazzani AR. Increased HLA-DR homozygosity associated with pre-eclampsia. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2000; 15(8): 1807–12.
- Madách K, Molvarec A, Rigó J, Nagy B, Péntes I, Karádi I, et al. Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2008; 139(2): 133–38.
- Martin J, Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *BioEssays. News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 1994; 16(9): 689–92.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 58(9): 564–81.
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*. 2007; 131(1): 121–35.
- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews. Immunology*. 2002; 2(9): 656–63. Review.
- Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, I Karádi I, et al. Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *Journal of Human Hypertension*. 2006; 20(10): 780–86.
- Molvarec A, Rigó J, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, et al. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress and Chaperones*. 2009; 14(2): 151–59.
- Molvarec A, Rigó J, Nagy B, Walentin S, Szalay J, Füst G, et al. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2007; 74(1-2): 163–69.
- Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, et al. Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412(21-22): 1957–62.

- Molvarec A, Tamási L, Losonczy G, Madách K, Prohászka Z, Rigó J. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress and Chaperones*. 2010; 15(3): 237–47.
- Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacological targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology*. 1998; 16(9): 833–8.
- Nicolaidis KH, Bindra R, Turan OM, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, et al. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2006; 27(1): 13–17.
- Nilsson E, Ros HS, Cnattingius S, Lichtenstein P. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2004; 111(3): 200–206.
- Odibo AO, Zhong Y, Goetzinger KR, Odibo L, Bick JL, Bower CR, et al. First-trimester placental protein 13, PAPP-A, uterine artery Doppler and maternal characteristics in the prediction of pre-eclampsia. *Placenta*. 2011; 32(8). Elsevier Ltd: 598–602.
- Olsson MG, Centlow M, Rutardóttir S, Stenfors I, Larsson J, Hosseini-Maaf B, et al. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger α 1-microglobulin in preeclampsia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48(2): 284–91.
- Orozco AF, Bischoff FZ, Horne C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE. Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1075: 57–62.
- 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. *Molecular Human Reproduction*. 2004; 10: 589–98.
- Padmini E, Geetha BV. Placental heat shock protein 70 overexpression confers resistance against oxidative stress in preeclampsia. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2008. 38(1): 27–34.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO Journal*. 2000; 19(16): 4310–22.
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaB α proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23(16): 5790–5802.
- Parra-Cordero M, Lees C, Missfelder-Lobos H, Seed P, Harris C. Fetal arterial and venous Doppler pulsatility index and time averaged velocity ranges. *Prenatal Diagnosis*. 2007; 27(13): 1251–57.
- Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2008; 33(2): 71–79.
- Poon LC, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet*. 2000; 356(9244): 1819–20.

- Poon LC, Maiz N, Valencia C, Plasencia W, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2009; 33(1): 23–33.
- Ranford JC, Coates R, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2000; 2(8): 1–17. Review.
- Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2011; 157(1): 48–52.
- Raynes DA, Guerriero V. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(49): 32883–88.
- Reddy A, Suri S, Sargent IL, Redman CWG, Muttukrishna S. Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia. *PLoS One*. 2009; 4(2): 4453.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1999; 180 (2 Pt 1): 499–506.
- Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21(7): 597–602.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Seminars in Nephrology*. 2004; 24(6): 565–70.
- Resnik MD. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics & Gynecology*. 2002; 99(3): 490–496. Review.
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress / tumor necrosis factor A by phosphorylation regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protectiv. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(27): 18947–56.
- Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, et al. The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Human Reproduction*. 1999; 14(9): 2268–73.
- Salminen A, Paimela T, Suuronen T, Kaarniranta K. Innate immunity meets with cellular stress at the IKK complex: regulation of the IKK complex by HSP70 and HSP90. *Immunology Letters*. 2008; 117(1): 9–15.
- Samuelsen GB, Pakkenberg B, Bogdanović N, Gundersen HJ, Larsen JF, Græm N, et al. Severe cell reduction in the future brain cortex in human growth-restricted fetuses and infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007; 197(1): 1-7.
- Sarto C, Binz P, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*. 2000; 21(6): 1218–26.

- Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64(5-6): 993–998.
- Shah M, Stanek J, Handwerger S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochemical Journal*. 1998; 30(7): 509–518.
- Shapiro K, Daniel B, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006; 26(4): 697–705.
- Shimp SK, Parson CD, Regna NL, Thomas AN, Chafin CB, Reilly CM. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-kappa;B pathways. *Inflammation Research*. 2012; 61(5): 521–533.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81(1): 15–27. Review.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365(9461): 785–799. Review.
- Smith GCS, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM, et al. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth. *Online*. 2002; 87(7): 1762–1767.
- Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaidis KH. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free β -hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenatal Diagnosis*. 2005; 25(10): 949–953.
- Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity*. 1998; 8(6): 657–665.
- Strevens H, Wide-Swensson D, Grubb A. Serum cystatin C is a better marker for preeclampsia than serum creatinine or serum urate. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2001; 61(7): 575–580.
- Terasawa K, Yoshimatsu K, Iemura SI, Natsume T, Tanaka K, Minami Y. Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26(9): 3378–3389.
- Than NG, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, et al. Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271(6): 1065–1078.
- Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(22): 23463–23471.
- Thilaganathan B, Wormald B, Zanardini C, Sheldon J, Ralph E, Papageorghiou AT. Early-pregnancy multiple serum markers and second-trimester uterine artery Doppler in predicting preeclampsia. *Obstetrics and gynecology*. 2010; 115(6): 1233–1238.

- Tsemakhovich VA, Bamm VV, Shaklai M, Shaklai N. Vascular damage by unstable hemoglobins: The role of heme-depleted globin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005; 436(2): 307–315.
- Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2010; 202(2): 161.1–161.11.
- Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegi B, Than GN, Bohn H. Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein engineering*. 2001; 14(11): 875–880.
- de Vivo A, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, D'anna R. Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2008; 87(8): 837–42.
- Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene*. 1999; 18(24): 3648–3651.
- Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. *Lancet*. 2002; 359(9307): 673–674.
- Wong HR. Heat shock proteins. facts, thoughts, and dreams. *Shock*. 1999; 12(4): 323-5. Review.
- Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1641(1): 35–41.
- Zafarmand MH, Franx A, Sabour S, van der Schouw YT, Grobbee DE, de Leeuw PW, et al. The M235T variant of the angiotensinogen gene is related to development of self-reported hypertension during pregnancy: the prospect-EPIC cohort study. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2008; 31(7): 1299–1305.
- Zheng Z, Kim JY, Ma H, Lee JE, Yenari MA. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 28(1): 53–63.
- Zhou X, Robinson DJ, Harrison BD. Types of variation in DNA-A among isolates of East African cassava mosaic virus from Kenya, Malawi and Tanzania. *Journal of General Virology*. 1998; 79(11): 2835–40.
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99(9): 2152–2164.