

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Andrej Černý

Steroidní metabolom a vícečetné těhotenství

Steroid metabolome and multiple pregnancy

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Antonín Pařízek, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29.1.2024

MUDr. Andrej Černý

Identifikační záznam:

ČERNÝ, Andrej. Steroidní metabolom a vícečetné těhotenství. [*Steroid metabolome and multiple pregnancy*]. Praha, 2024. 81 stran, 4 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN, školitel Pařízek, Antonín.

Poděkování

Chtěl bych tímto poděkovat všem, kteří mi v průběhu přípravy práce pomohli svými radami, připomínkami a odbornou prací a přispěli k vypracování disertační práce.

Děkuji zejména prof. MUDr. Antonínu Pařízkovi CSc. za původní myšlenku vedoucí k zahájení projektu a za jeho konzultace, motivační přístup a vedení po dobu celého doktorského studia.

Dále bych chtěl poděkovat panu inženýru Martinu Hillovi, DrSc. za nesmírnou pomoc při zpracování materiálu, statistické zpracování získaných dat a jejich výklad. Současně děkuji celému týmu Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu za podporu a pomoc.

Děkuji také všem spolupracovníkům a členům „bývalého“ a „současného“ vedení Kliniky gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN v Praze, kteří svým přístupem přispěli k realizaci této práce.

Největší poděkování ale patří mojí rodině a nejbližším přátelům.

Disertační práce byla podpořena grantem GIP-21-SL-03-223.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
ABSTRAKT	8
ABSTRACT	9
1 ÚVOD	10
2 STEROIDNÍ METABOLOM	11
2.1 Neuroaktivní steroidy	13
2.2 Steroidní hormony v těhotenství	13
2.3 Přehled steroidogenezy základních hormonů v těhotenství	15
2.3.1 Progesteron	15
2.3.2 Estrogen	15
2.3.3 Androgeny	16
2.3.4 Glukokortikoidy	17
2.4 Mechanismus účinku steroidů	17
2.5 Receptory pro neuroaktivní steroidy	17
2.6 Analýza steroidního metabolomu a neuroaktivních steroidů	18
2.7 Klinický význam stanovení a studia steroidního metabolomu	19
2.7.1 Časování nástupu porodu	19
2.7.2 Poruchy jater v těhotenství	19
2.7.3 Poruchy krevního tlaku v těhotenství	20
2.7.4 Vliv na nervový systém	20
2.7.5 Fetální růstová restrikce	21
2.7.6 Endokannabinoidní systém	21
2.8 Možnosti terapeutického využití	21
3 VÍCEČETNÉ TĚHOTENSTVÍ.....	23
3.1 Rozdělení vícečetného těhotenství.....	23
3.2 Péče o vícečetné těhotenství.....	26
3.3 Komplikace vícečetného těhotenství.....	27
3.3.1 Mateřské komplikace	27
3.3.2 Fetální komplikace	28
3.4 Endokrinologie vícečetného těhotenství.....	30

4 HYPOTÉZA	32
4.1 Cíle.....	32
5 METODY	33
5.1 Pacientky.....	33
5.2 Sběr vzorků.....	34
5.3 Klinická data	35
5.4 Laboratorní analýza.....	36
5.4.1 Chemikálie a reagentie	36
5.4.2 Přístroje	36
5.5 Statistická analýza dat	36
6 VÝSLEDKY	40
7 DISKUSE.....	57
8 ZÁVĚR	61
9 SHRNU TÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE	63
10 ZDROJE.....	64
11 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	77
11.1 Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace	77
11.2 Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace.....	78
11.3 Publikace v časopisech s IF bez vztahu k tématu disertace.....	78
11.4 Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace.....	79
11.5 Ostatní publikace	80
12 PŘÍLOHY	81

SEZNAM ZKRATEK

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AFP – alfa-fetoprotein

BF – body fluid

CNS – centrální nervová soustava

CRH – kortikotropní hormon, kortikoliberin

CYP – cytochrom P450

DHEA – dehydroepiandrosteron

DHEAS – dehydroepiandrosteron sulfát

DHT – dihydrotestosteron

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E1 – estron

E2 – estradiol

E3 – estriol

FDA – Food and Drug Administration

GA – gestační stáří

GABA_A – γ -aminomáselná kyselina

HELLP – Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet syndrom

ICP – Intrahepatální cholestáza těhotných

IUFD – intrauterine fetal demise

IVF – in vitro fertilizace

LLR – log-likelihood ratio

NMDA – N-methyl-D-aspartát

OR – odds ratio

RDS – respiratory distress syndrome

SHBG – steroid hormone binding protein

TAPS – twin anemia polycythemia sequence

TRAP – twin reversed arterial perfusion

TTTS – twin-to-twin transfuzní syndrom

ABSTRAKT

Steroidy mohou být dle místa působení rozděleny do 2 skupin – intracelulární a extracelulární. Intracelulární fungují jako transkripční faktory, ovlivňují expresi genů. Mají tzv. genomový efekt, kterého účinek je pomalý. Extracelulární – negenomové steroidy po vazbě na neurotransmiterové receptory na cytoplazmatické membráně ovlivňují propustnost iontových kanálů. Proto je účinek rychlejší. Označujeme je jako neuroaktivní steroidy (produkované v různých tkáních organismu nebo podávané zevně) nebo neurosteroidy (produkované buňkami nervového systému).

Některé neuroaktivní steroidy a jejich metabolity (např. progesteron) jsou důležitým faktorem v procesu stabilizace těhotenství. Jiné poruchy steroidů se podílejí na vzniku celého spektra těhotenských komplikací, jako například předčasný porod, preeklampsie, Intrahepatální cholestáza v těhotenství apod.

Ve spolupráci s Oddělením steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu v Praze se zaměřujeme na studium vícečetného těhotenství z pohledu steroidního metabolomu.

Dosavadní dostupné práce neposkytly ucelený pohled na steroidom u matek a plodů vícečetného těhotenství. Náš výzkum se snažil objasnit vztah mezi plody a matkou z pohledu metabolismu steroidů.

Klíčová slova: steroidní metabolom, neuroaktivní steroidy, těhotenské komplikace, vícečetné těhotenství

ABSTRACT

Steroid hormones can be divided into 2 groups – intracellular and extracellular, depending on location of their activity. Intracellular ones influence expression of genes while acting as transcription factors. This so-called genomic effect is very slow. Extracellular (non-genomic) steroids bind to neurotransmitter receptors located on the cytoplasmic cell membrane and thus affect ionic channels permeability. Their effect is faster. We refer to them as neuroactive steroids (produced in different body tissues or administered externally) or neurosteroids (synthesized in nervous system cells).

Some neuroactive steroids and their metabolites (e.g. progesterone) are crucial in stabilizing the pregnancy. Other steroid disorders play their role in wide spectre of pregnancy complications, such as preterm labor, preeclampsia, intrahepatic cholestasis in pregnancy etc.

Our scientific interest in collaboration with the Department of Steroids and Proteofactors of the Institute of Endocrinology in Prague is focused on investigation of multiple pregnancies in term of steroid metabolome. Studies conducted so far have not provided a comprehensive analysis of steroidome within mothers and fetuses of multiple pregnancies.

The aim of our research is to clarify the relationship between fetuses and mother from the point of view of steroid metabolism.

Key words: fetomaternal steroidome, neuroactive steroids, pregnancy complication, multiple pregnancy

1 ÚVOD

Komponenty steroidního metabolomu a jejich syntéza v těhotenství byla podnětem pro celou řadu studií. Steroidní metabolom a jeho změny významně ovlivňují průběh těhotenství, načasování porodu a vznik případných těhotenských komplikací. Tyto změny již byly pro případy jednočetného těhotenství popsány (viz dále v textu). Zkoumání steroidního metabolomu u těhotenství komplikovaných patologií je nezbytné k pochopení vztahu mezi patologií a změnami vnitřního prostředí. Současně je možné dále těhotenství terapeuticky ovlivňovat.

Vícečetné těhotenství je u člověka považováno za závažnou porodnickou komplikaci, a je zatíženo vysokým rizikem vzniku těhotenských komplikací.

Dosavadní práce se steroidnímu metabolomu u vícečetného těhotenství věnovaly pouze okrajově, nebo stanovovaly pouze omezený počet metabolitů (Houghton et al., 2019). Také se podrobně nevěnovaly tomu, zda existují rozdíly mezi steroidním metabolomem mezi vícečetným a jednočetným těhotenstvím.

V této práci jsme se proto ve spolupráci s kolegy věnovali podrobnému popisu steroidního metabolomu u vícečetného těhotenství. Současně jsme se s celým výzkumným týmem snažili navázat na naše dosavadní studie matek a plodů jednočetného těhotenství. Zejména se jedná o práce Paškové a Pařízka (Pašková, 2013).

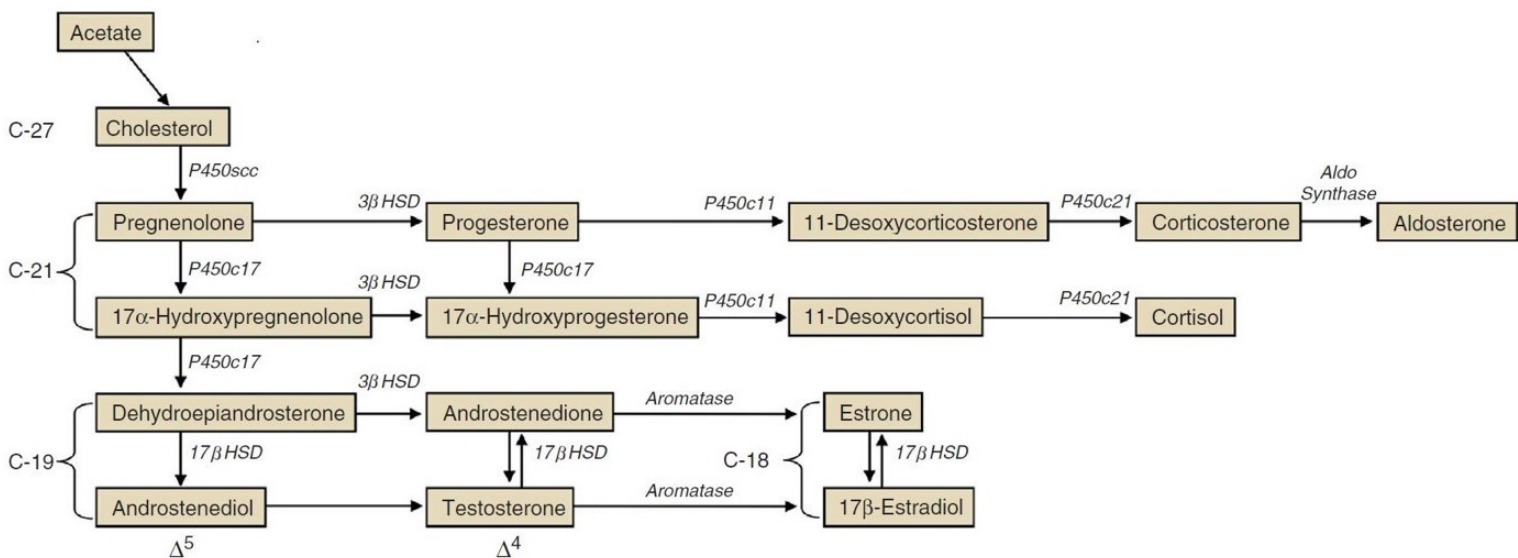
Předpokládáme, že cíleným studiem steroidního metabolomu u vícečetných těhotenství, konkrétně u dvojčat, získáme přesnější pohled na endokrinní vztah mezi plody a matkou a mezi plody navzájem.

2 STEROIDNÍ METABOLOM

Steroidní hormony jsou lipofilní molekuly původem z cholesterolu vznikající procesem steroidogeneze. Syntéza steroidních hormonů probíhá v tkáních kůry nadledvin, mozku, gonád, jater a v placentě. Steroidy nelze ukládat do rezervy, po syntéze jsou vylučovány přímo do oběhu. V případě potřeby jsou proto syntetizovány vždy de novo. Pojmeme steroidní metabolom (také steroidom) označujeme soubor všech metabolitů steroidů.

Základním prvkem pro syntézu steroidů je cholesterol. V reakci katalyzované cytochrom P450 dependentním enzymem vzniká pregnenolon. Pregnenolon společně se jeho sulfátem jsou prekurzory všech steroidních hormonů.

Přehled syntézy steroidních hormonů poskytuje obrázek č. 1 níže (Strauss, Barbieri, 2019). V něm skupina C21 označuje progestiny a adrenální kortikosteroidy, C19 jsou androgeny a C18 estrogeny.



Obr. 1: Přehled syntézy steroidních hormonů (Strauss, Barbieri, 2019).

Podrobnější přehled syntézy steroidních hormonů vypracoval Hill (Hill et al., 2014).

V cirkulaci se steroidní hormony vážou na tzv. binding proteiny. Jde o přenašečové proteiny, jako např. albumin, pohlavní hormony nebo kortikosteroidy vázající globuliny atd. Tato vazba zaručuje relativně dlouhý biologický poločas. Volná frakce steroidů nevázaná na proteiny je metabolicky účinná. Jde obvykle cca 10 % z celkového množství. Molekuly steroidních hormonů jsou lipofilní a jsou tedy schopny snadněji přecházet lipoproteinovými strukturami

Odbourávání steroidních hormonů z oběhu probíhá pomocí tzv. konjugace se sulfátem nebo glukosiduronátem. Proces konjugace probíhá zejména v játrech a ledvinách. Tím klesá lipofilie, zlepšuje se rozpustnost ve vodě a usnadňuje se jejich vylučování. Vylučování probíhá většinou močí (asi 70 %), dále stolicí a kůží.

2.1 Neuroaktivní steroidy

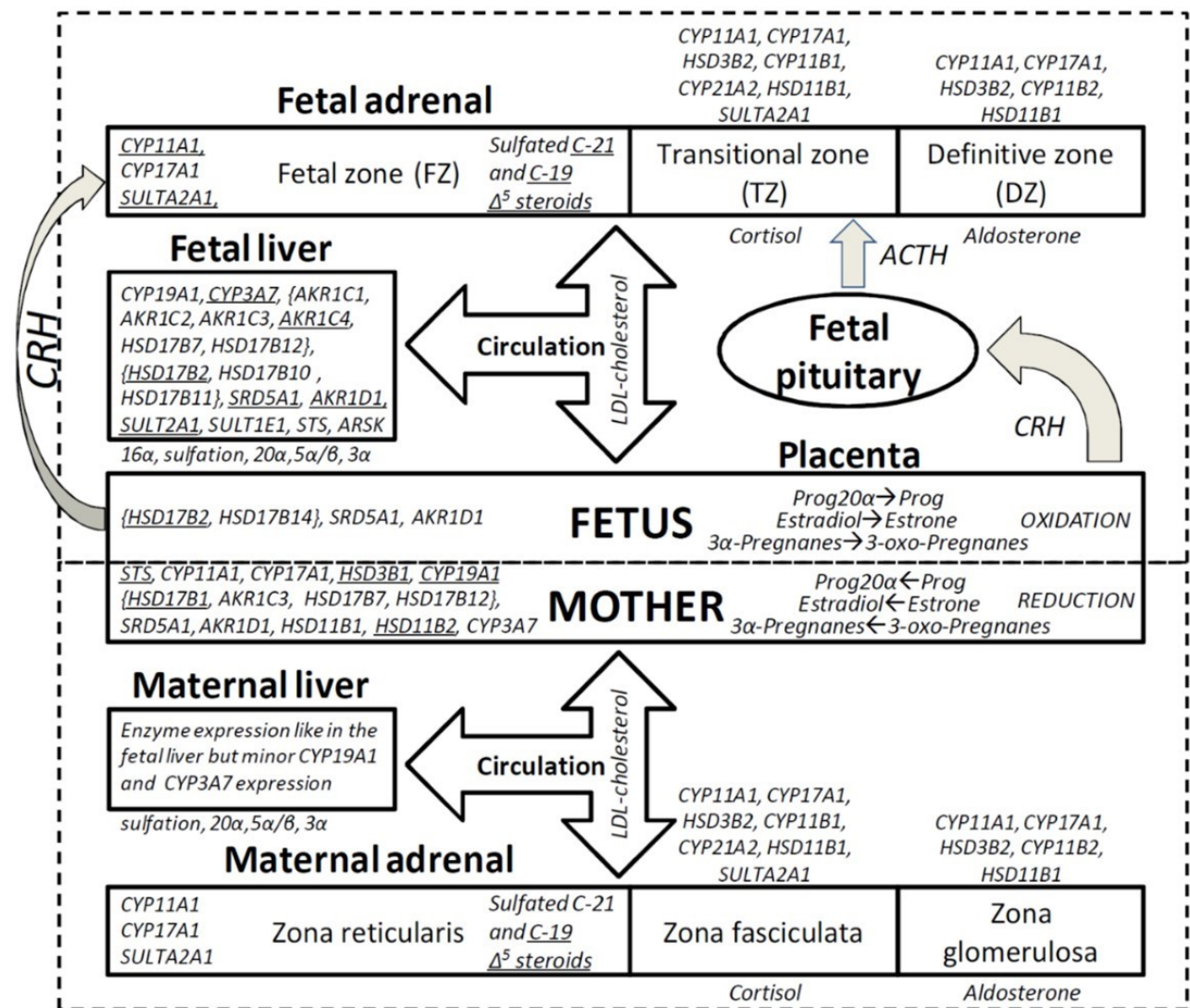
Steroidní hormony, které jsou syntetizované v tkáních nervového systému, označujeme jako neurosteroidy. Neuroaktivní steroidy jsou všechny steroidy s neuroaktivním účinkem bez ohledu na místo jejich syntézy. Do skupiny neuroaktivních steroidů mohou patřit estrogeny, které vedle toho působí i genomově a část nadledvinových androgenů. Kortikosteroidy na rozdíl od nich působí pouze genomově.

2.2 Steroidní hormony v těhotenství

V těhotenství jsou steroidní hormony důležitý faktor již od počátku formování těhotenství, pro jeho udržení a v období kolem porodu. Z neuroaktivních steroidů mají význam zejména progesteron a jeho metabolity (tzv. neuroaktivní steroidy pregnanového typu). Jde konkrétně o allopregnanolon, isopregnanolon, pregnanolon a epipregnanolon.

Endokrinní funkce ve velké míře přebírá tzv. fetoplacentární jednotka, která je v oblasti endokrinního působení nezávislá na mateřském systému. Endokrinní aktivita této jednotky je velmi vysoká. Primárním místem syntézy steroidních hormonů u plodu je tzv. fetální zóna fetální nadledviny. Aktivitu této zóny stimuluje produkce placentárního CRH (kortikotropní hormon). Vzhledem k tomu, že ve tkáních placenty a u plodu chybí některé enzymy, k dostatečné syntéze je v rámci fetoplacentární jednotky nezbytný transport

hormonů a jejich steroidů. Cílem celého procesu je syntéza adekvátního množství steroidních hormonů nezbytných pro vývoj plodu (Pasqualini, Chetrite, 2016). Výstupem našich předchozích studií bylo vytvoření návrhu schématu steroidogenezy ve fetoplacentární jednotce, jak je znázorněno na obrázku 3 (Hill et al., 2010a).



Obr. 3: Přehled steroidogenezy v rámci fetoplacentární jednotky (Hill et al., 2010a).

2.3 Přehled steroidogenezy základních hormonů v těhotenství

Do procesu steroidogenezy v těhotenství je zapojeno množství enzymových systémů. Porucha těchto enzymů může vést ke vzniku celé řady těhotenských patologií. Následovný model syntézy a metabolismu jednotlivých steroidních hormonů je tedy popis fyziologických procesů. V případě vzniku komplikací jsou tyto cesty porušeny (Morel et al., 2016).

2.3.1 Progesteron

Progesteron je hlavním hormonem těhotenství. Je zodpovědný za udržení stability těhotenství snížením kontraktility myometria. Po početí je produkce zabezpečena corpus luteum, žlutým tělískem, které vzniká z folikulu po procesu ovulace. Zhruba mezi 6. a 8. týdnem těhotenství dochází k tzv. „luteal-placental shift“, tedy momentu, při kterém je syntéza progesteronu zabezpečena z větší míry placentou.

Koncentrace cholesterolu v průběhu těhotenství roste, s maximem ve třetím trimestru. Průměrná syntéza činí asi 250mg/den. Zablokování tvorby nebo účinku progesteronu je velmi efektivní metoda ukončení těhotenství (Hinson et al., 2010).

Základním prvkem pro syntézu je cholesterol. Ten pochází z oběhu matky a současně je produkován i fetálními nadledvinami plodu (Hill et al., 2014).

Samotná syntéza placentou se skládá z 2 kroků. V prvním dochází ke konverzi cholesterolu na pregnenolon za přítomnosti cytochromu P450 (CYP11A1). Reakce probíhá v mitochondriích za pomoci reduktázy. Druhým krokem je konverze pregnenolonu na progesteron. Reakce je enzymaticky ovlivněna 3 β -hydroxysteroid reduktázou. Tento enzym je přítomen na membráně mitochondrií a endoplazmatického retikula (Cherradi et al., 1997).

2.3.2 Estrogen

Hlavním zdrojem produkce estrogenů v těhotenství je fetoplacentární jednotka. Následkem toho je ovariální mateřská produkce estrogenů prakticky nepotřebná. Produkce placentárních estrogenů je závislá na fetálních nadledvinách a játrech. Fyziologicky aktivní estrogeny jsou estron (E1), estradiol (E2) a estriol (E3).

Fetální nadledviny produkují velké množství DHEA a DHEAS. Tyto podstupují 16α -hydroxylaci v játrech a následně je meziproduct metabolizován za využití enzymů placentární sulfatáza, 3β -hydroxysteroid dehydrogenáza, 17-hydroxysteroid oxidoreduktáza a aromatáza. Výsledkem je produkce estriolu E3 jako hlavního estrogenu (Pasqualini 2005). V játrech chybí 3β -hydroxysteroid dehydrogenáza a 17α -hydroxyláza/17,20 lyáza, proto je k syntéze estrogenu v játrech jako substrát využít pouze fetální testosteron (Voutilainen, Miller 1986).

Estrogeny uvolňované do oběhu se vážou na AFP a SHBG produkovanými játry, které tak chrání plod před nadměrnou estrogenizací bioaktivními – nevázanými formami (Bader et al., 2004).

Mateřský estriol je přítomen pouze v období těhotenství. Jeho syntéza začíná až v 8. týdnu těhotenství po začátku produkce DHEAS fetálními nadledvinami. Ve 2. a 3. trimestru funguje jako dobrý marker funkce fetálních nadledvin a funkce ACTH (Morel et al., 2016).

2.3.3 Androgeny

Biosyntéza testosteronu a jeho konverze na DHT je v těhotenství nezbytná ke správnému vývoji mužského pohlaví. Produkce testosteronu začíná kolem 9. týdne těhotenství v Leydigových buňkách a označuje ukončení vývoje fetálních varlat (Morel et al., 2014).

Tzv. „klasická“ cesta syntézy testosteronu z cholesterolu cestou DHEA je již dobře popsána (Fluck, Pandey 2014).

Zajímavé je patologické působení testosteronu v případě poruch enzymů způsobujících jeho nadprodukcí. Zvýšené hladiny androgenů za normálních okolností nezpůsobují virilizaci matky, protože placentární aromatáza přeměňuje androgeny na estrogen. Současně je matka chráněna vysokými hladinami SHBG a progesteronu (Kanova, Bicikova 2011).

Pozorováním vzácných případů těhotenských hormonálně aktivních nádorů produkujících androgeny bylo zjištěno, že jejich nadprodukce může způsobit virilizaci plodu i matky. V těchto případech nedošlo k plné ochraně placentou. Dále bylo zjištěno, že po porodu ale obvykle dochází ke spontánní úpravě hladin hormonů (Bulun 2014).

2.3.4 Glukokortikoidy

Kůra nadledvin je u plodů detekovatelná již 33 dní po početí, 52 dní po početí pak lze rozlišit definitivní a fetální zónu (Goto et al., 2002).

Podle dostupných studií je produkce fetálních glukokortikoidů nezbytná mezi 8. a 12. týdnem těhotenství. Biosyntéza kortizolu je v toto období kriticky nezbytná pro normální vývoj mužského genitálu mediovaného androgeny a ochranu ženského plodu citlivého na virilizaci v období předtím, než se plně vyvine protektivní účinek placentárních aromatáz. Důležitost fetální produkce po tomto datu je nejasná (Goto et al., 2006, Hanley, Arlt 2006).

2.4 Mechanismus účinku steroidů

Steroidní hormony mají v organismu trojí mechanismus účinku:

1. genomový, „klasický“ – projevuje se po vazbě na intracelulární receptory nebo na DNA. Tímto mechanismem aktivují nebo potlačují expresi genů, čímž mohou působit jako transkripční faktory. Výsledkem této vazby je syntéza bílkovin. Vzhledem k mechanismu účinku je efekt pomalý, projevuje se s odstupem řádově několika hodin až dní;
2. negenomový – vážou se na neurotransmitterové receptory/iontové kanály na cytoplazmatické membráně buněk. Tím dochází k ovlivnění neuronální excitability. Účinek se projeví rychle, za milisekundy až sekundy. Takto působí tzv. neuroaktivní steroidy a neurosteroidy (steroidy syntetizované v nervovém systému);
3. Negenomovým účinkem vazbou na membránové receptory mohou působit jak neurosteroidy, které pronikají do mozku z krevního oběhu přes hematoencefalickou bariéru, tak neurosteroidy syntetizované přímo v mozku (Rupprecht et al., 1993, Tuem, Atey 2017).

2.5 Receptory pro neuroaktivní steroidy

Neuroaktivní steroidy se vážou na celou řadu receptorů, zejména ale na 2 typy. Prvním typem jsou receptory typu A γ -aminomáselné kyseliny (GABA_A-r). Po vazbě na tento receptor se uvolňují chloridové kanály. Po vazbě nekonjugovaných metabolitů progesteronu pozorujeme efekt endogenně analgetický nebo hypnotický. Konjugované metabolity mají účinek na stejném receptoru opačný.

Druhým typem jsou N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA-r), které vedou k uvolnění kalciových kanálů. V případě, že se na NMDA receptor vážou sulfáty redukovaných progesteronových metabolitů nasycených v poloze 5 α -, pak je účinek vazby endogenně excitační. V případě metabolitů nasycených v poloze 5 β -, je účinek antagonistický.

Receptory pro neuroaktivní receptory jsou kromě jiného také na děloze. Tímto lze vysvětlit jejich účinek na děložní kontraktilitu (Mitchell et al., 2005).

2.6 Analýza steroidního metabolomu a neuroaktivních steroidů

Stanovení hladin neuroaktivních steroidů lze provést několika laboratorními metodami. Obvykle lze využít imunoanalytické nebo chromatografické metody. Z chromatografických například plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (Krone et al., 2010) nebo kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Druhá jmenovaná je dle některých autorů více vhodná ke stanovení metabolitů kortikosteroidů (Haneef et al., 2013, Marcos et al., 2014). Jiní autoři ale využili tuto metodu ve studiích k analýze steroidního metabolomu u těhotných nebo fertálních žen (Dušková et al., 2020, Yuan et al., 2020).

Metody plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí byly také vyvinuty ke kvantifikaci steroidů v krvi těhotných žen a pupečnickové krvi plodu. Hillova metoda (Hill et al., 2019) nabízí možnost simultánní kvantifikace až 100 endogenních steroidů. Tato metoda byla validovaná i pro využití v analýze krvi netěhotných žen v různých fázích menstruačního cyklu a u mužů (Hill et al., 2019).

Hill a kol. ve své studii (Hill et al., 2010b) na základě hladin endogenních steroidů v různých kompartmentech (cirkulace matky, pupečnicková arteriální a venózní krev plodu, plodová voda) navrhl modely pro predikci nástupu porodu. Ty ukázaly, že v mechanismu nástupu porodu se uplatňuje celá řada endogenních steroidů. V této studii se jako nejtěsnější jeví korelace pro pupečnickovou krev. Model založený na steroidu v mateřské krvi byl velmi efektivní a tím i prakticky nejlépe využitelný. Korelace

se steroidy v plodové vodě byly o něco slabší. Vzhledem k technické proveditelnosti a etické otázce celé problematiky se použití mateřské krve jeví jako nejvhodnější (Hill et al., 2010b).

2.7 Klinický význam stanovení a studia steroidního metabolomu

2.7.1 Časování nástupu porodu

Porucha stability fetoplacentární jednotky může vést k rozvoji poruch těhotenství, v tomto případě zejména k rozvoji předčasného porodu. Neuroaktivní steroidy jsou v procesu udržení stability velmi významným faktorem. Práce našeho týmu ukázaly, že změny koncentrací přímo souvisí s časováním nástupu porodu (Pašková, 2013). Jiné práce porovnávaly steroidní metabolom žen po spontánním porodu v porovnání s ženami po císařském řezu (Adamcová et al., 2018).

V mechanismu časování nástupu porodu je velmi důležitý proteohormon kortikoliberin (kortikotropní hormon, CRH). V těhotenství je produkován zejména placentou. Někdy je označován jako tzv. „placental clock“ – jde o jeden z klíčových faktorů ovlivňujících stabilitu fetoplacentární jednotky a tím i trvání těhotenství. Hladiny CRH jsou nejvyšší v době těsně předcházející nástupu porodu. Koncentrace mohou být dle některých studií až deset tisíckrát vyšší, než jsou koncentrace na začátku těhotenství (Ellis et al., 2002, Hill et al., 2010b, McLean, Smith 2001). V průběhu těhotenství je vyšší exprese isoform receptorů pro CRH, které mají více relaxační účinek na myometrium. Těsně před porodem dochází ke konverzi na isoformy, které mají účinek na kontraktilitu myometria pozitivní. Současné studie ukazují, že funkce oxytocinu a prostaglandinu F_{2α} jsou v průběhu porodu ovlivněny vysokými hladinami CRH a tím se potencuje další pozitivní účinek na kontraktilitu myometria (Ravanos et al., 2015, Linton et al., 2001, Grammatopoulos et al., 1995). Celým výše popsaným procesem lze vysvětlit mechanismus endokrinního načasování porodu. Stejný mechanismus se uplatňuje i při předčasném nástupu děložní činnosti.

2.7.2 Poruchy jater v těhotenství

Intrahepatální cholestáza těhotných (ICP) je jednou z nejintenzivněji studovanou patologií v průběhu těhotenství. Práce našeho týmu opakovaně popsaly souvislost mezi vznikem ICP a steroidním metabolomem. Podkladem pro vznik ICP je pravděpodobně

porucha osy hypotalamus – hypofýza. (Pařízek et al., 2015, Pařízek et al., 2016, Šimják et al., 2015). Na poruchu této osy poukazuje zejména fakt, že v případech ICP dochází ke snížení produkce ACTH a kortizonu (Zhu et al., 2010).

2.7.3 Poruchy krevního tlaku v těhotenství

Vztah mezi krevním tlakem a neuroaktivními steroidy je studován již delší dobu. Na regulaci systémového krevního tlaku se podílejí také pregnanové steroidy. V některých studiích byla popsána vyšší sérová hladina allopregnanolonu u těhotných s chronickou hypertenzí než u žen s normálním krevním tlakem. V těch případech, kdy se k chronické hypertenzi přidala preeklampsie, byla hladina allopregnanolonu ještě vyšší. Existují studie, které měřily hladiny steroidních hormonů v plodové vodě. Ty potvrdily, že u žen s pozdní formou preeklampsie (tedy po 34. týdnu těhotenství), byly v plodové vodě hladiny progesteronu vyšší (Parker et al., 1979, Luisi et al., 2000).

Preeklampsie je multifaktoriální onemocnění. Jedním z významných faktorů vzniku je tzv. angiogenní dysbalance v placentě. Podkladem pro tuto dysbalanci je nerovnováha mezi angiogenními faktory (např. PlGF, VEGF, TGF β) a antiangiogenními faktory (sFlt-1, sEng) (Leahomschi, Calda 2016). K poruše angiogenních faktorů vede například porucha tvorby estrogenu. Dysregulace tvorby estrogenů placentou se proto považuje za jeden z faktorů rozvoje preeklampsie (Berkane et al., 2017).

2.7.4 Vliv na nervový systém

Předpokládá se, že aktivita CNS plodu je v průběhu těhotenství potlačena a plod se nachází ve stavu permanentního spánku. Neuroaktivní steroidy zde mají funkci neuroprotektivních faktorů. Při stresu vyvolaném akutní hypoxií rostou koncentrace allopregnanolonu a tím chrání mozek plodu při porodu. Chronická hypoxie tyto obranné mechanismy nevyvolává, proto je ní plod ohrožen více (Hirst et al., 2014, Hirst et al., 2008, Hirst et al., 2006).

Společně s CNS ovlivňují neuroaktivní steroidy také periferní nociceptory. Zde blokuje kalciové kanály a tím přispívají k redukci vnímání bolesti. Tento mechanismus se uplatňuje v přípravě těhotné ke snížení vnímání porodních bolestí (Todorovic et al., 2004).

Nízké hladiny některých neuroaktivních steroidů mohou přispívat ke vzniku depresí v těhotenství i po porodu (Deligiannidis et al., 2016, McEvoy et al., 2018). Přímou souvislost mezi hladinami allopregnanolonu a rozvojem depresí v těhotenství a šestinedělí lze ale pozorovat až ve třetím trimestru (Hellgren et al., 2017).

2.7.5 Fetální růstová restrikce

Růst plodu in utero je rovněž ovlivněn neuroaktivními steroidy. Ukazuje se, že změny steroidů mohou k rozvoji fetální růstové restrikce přispět významnou měrou (Baud et al., 2019).

2.7.6 Endokanabinoidní systém

Mezi neuroaktivními steroidy a endokanabinoidním systémem existuje systém vzájemné signalizace. Progesteron a estrogen se působením transkripčních faktorů podílí na metabolismu (tvorba a degradace) enzymů, které sále udržují hladinu anandamidu. Poruchy jeho metabolismu mají těsnou souvislost s poruchami implantace embrya a předčasným porodem (Karasu et al., 2011, Santoro et al., 2021).

2.8 Možnosti terapeutického využití

Jelikož je řada neuroaktivních steroidů příčinou těhotenských patologií, začalo se přirozeně uvažovat o jejich využití k terapeutickému ovlivnění.

Terapeuticky lze působit u celé řady psychiatrických onemocnění – deprese, migrény, anxiózní poruchy osobnosti, panické ataky, nespavost a jiné.

V roce 2019 bylo v USA agenturou FDA schváleno využití brexanolonu (allopregnanolon) který moduluje GABA_A receptor (Belelli et al., 2019). Efekt na tento receptor lze využít k léčbě anxiózního syndromu a depresí (Zorumski et al., 2019).

Podobně byly neuroaktivní steroidy využity u léčby závislostí na kokainu a nikotinu. Tento postup se ale v běžné klinické praxi nepoužívá (Anker et al., 2010).

V nedávné minulosti proběhla experimentální randomizovaná studie, která sledovala využití brexanolonu při léčbě akutní respirační tísně u pacientů s nemocí COVID-19 (Good

Clinical Practice network). V době přípravy této práce ale zatím nebyly výsledky studie k dispozici.

Derivát allopregnanolonu (ganaxolon) byl experimentálně využit k možnému ovlivnění neurologického deficitu způsobeného předčasným porodem. Tato studie prokázala jeho příznivý vliv, ale pouze na zvířecím modelu (Shaw et al., 2019).

3 VÍCEČETNÉ TĚHOTENSTVÍ

Vícečetným těhotenstvím se rozumí přítomnost více než jednoho plodu v děloze v průběhu těhotenství.

V populaci je četnost vícečetných těhotenství vyjádřena přibližně matematicky pomocí tzv. Hellinova pravidla. Podle tohoto pravidla se v populaci nejčastěji vyskytují dvojčata, a to s četností asi 1:89 (dle různých zdrojů v průměru mezi 1:80-100), trojčata s frekvencí 1:89², čtyřčata 1:89³ atd (Fellman et al., 2009).

Tyto hodnoty vykazují významné regionální odchylky, v rozvinutých krajinách je frekvence vyšší z důvodu lepší dostupnosti metod asistované reprodukce, vyššího věku rodiček, indukci ovulace apod. (Collins et al., 2007).

V České republice byla dle dostupných statistických dat četnost vícečetného těhotenství v roce 2022 1,27% (Sekce perinatologie a fetomaternální medicíny 2023).

Současně lze také říct, že četnost od 80. let minulého století kontinuálně rostla (Khalil 2021). V některých krajinách (Velká Británie, USA) ale lze pozorovat v posledních letech postupný pokles počtu vícečetných těhotenství, zejména např. po redukčních výkonech (např. z trojčat na dvojčata) (Khalil 2021).

3.1 Rozdělení vícečetného těhotenství

Základní rozdělení vícečetné těhotenství je podle následovných znaků:

- zygozita – počet oocytů, ze kterých těhotenství vzniká (např. monozygotické dvojčata jsou tzv. jednovaječné, tedy vznikají rozdělením jednoho oplodněného vajíčka jednou spermií; dizygotické jsou dvojevaječné atd.);
- chorionicita – počet placent v těhotenství;
- amnionicita – počet amniálních vaků.

Pro dvojčata (nejčastější typ) existují varianty:

- bichoriální biamniální – každý ze dvou plodů má vlastní placentu a vlastní plodové obaly. Dvojčata mohou být jednovaječná nebo dvojevaječná.

- monochoriální biamniální – společná placenta pro oba plody, každý z plodů má vlastní amniální vak.
- monochoriální monoamniální – společná placenta i amniální vak pro oba plody.

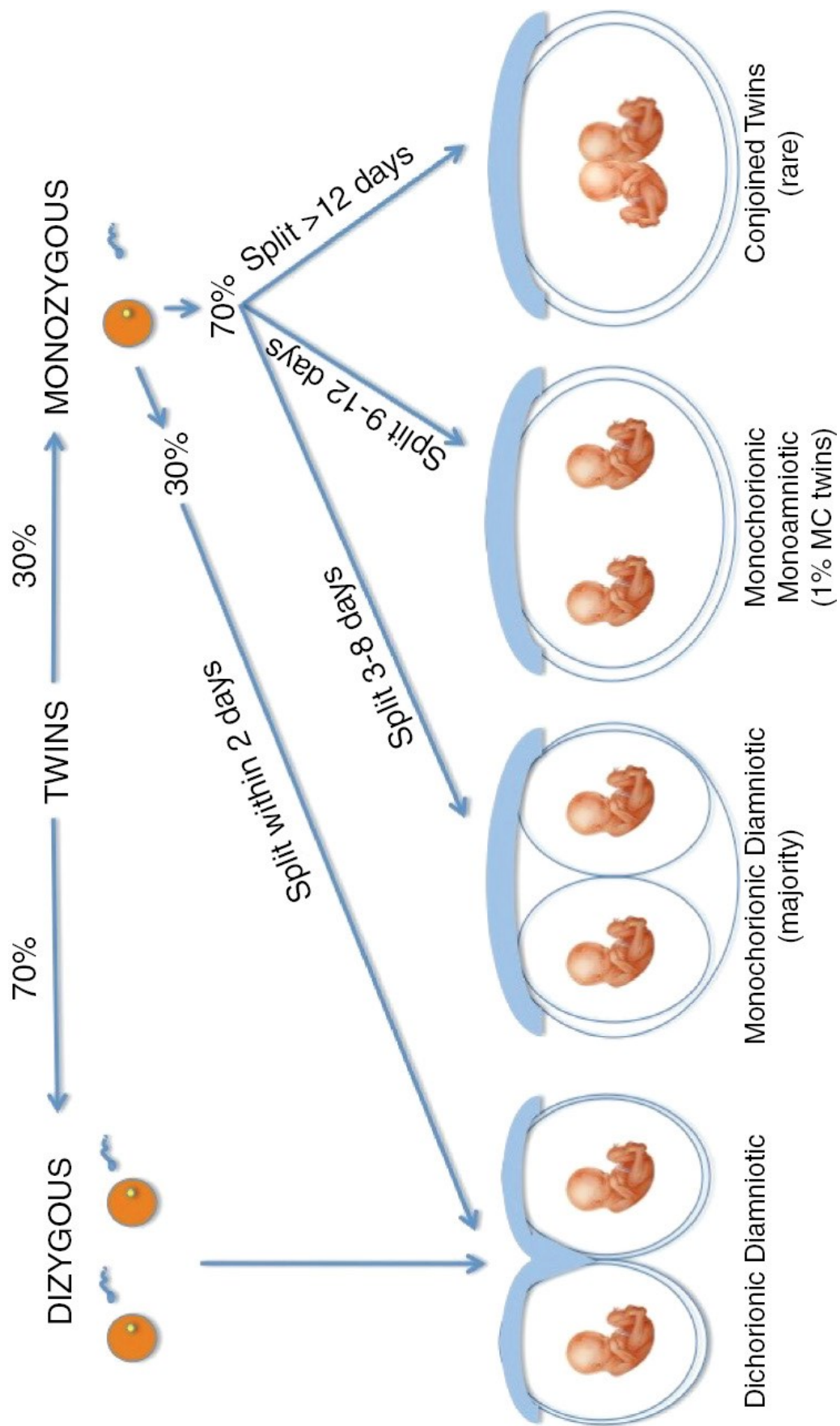
Jednovaječná bichoriální/biamniální a obecně monochoriální dvojčata mají z principu stejnou genetickou informaci a jedná se o geneticky totožné jedince (D'Addario, Rossi, 2014).

Principy vzniku jednotlivých typů dvojčat popisuje tzv. Cornerova teorie. Ta nebyla přímo pozorovaná u člověka, pouze na zvířecím modelu (Blikstein, Keith 2007). Tato teorie tvrdí, že chorionicita je určena dnem, kdy dojde k „mechanickému“ rozdělení zygoty:

- do 3 dnů od oplodnění – bichoriální biamniální dvojčata;
- mezi 4.-7. dnem od oplodnění – monochoriální biamniální dvojčata;
- mezi 8.-12. dnem od oplodnění – monochoriální monoamniální dvojčata.

Pokud dojde k rozdělení později, vznikají tzv. srostlice (siamská dvojčata) (Corner, 1955).

Tyto principy jsou popsány na obrázku 4 (Bricker, 2016).



Obr. 4: Principy vzniku typů dvojčat (převzato z Bricker, 2016).

3.2 Péče o vícečetné těhotenství

Vzhledem k vyššímu riziku vzniku komplikací u plodů i těhotných existují rozdíly v péči o vícečetné těhotenství v porovnání s jednočetnými.

Základní rozdíly v průběhu těhotenství jsou:

- sledování zkušeným porodníkem a odborníkem na ultrazvukovou diagnostiku,
- obvykle častější kontroly v prenatální poradně,
- častější kontroly pomocí ultrazvuku včetně měření biometrických parametrů plodů a délky děložního hrdla (cervikometrie) jako prediktivního faktoru předčasného porodu,
- sledování všech monochoriálních těhotenství by mělo probíhat v perinatologickém centru vyššího stupně.

Principy sledování vícečetného těhotenství upřesňuje doporučený postup vydaný Českou gynekologicko-porodnickou společností (Doporučený postup – Prenatální péče o vícečetná těhotenství).

Nejmarkantnější rozdíly jsou ale v pravidlech pro samotné ukončení těhotenství. Podle národního doporučeného postupu jsou těhotenství ukončována v týdnech těhotenství

- do 38+6 pro bichoriální/biamniální;
- mezi 34+0 až 36+6 pro monochoriální/biamniální;
- mezi 32+0 až 34+6 pro monochoriální/monoamniální;
- do 35+6 dle chorionicity pro trigemini;
- quadrigemini a více dle chorionicity.

Dvojčata bichoriální/biamniální a monochoriální/monoamniální lze za splnění některých podmínek porodit *per vias naturales* (Doporučený postup – Vedení porodu vícečetného těhotenství).

Důvodem pro ukončení těhotenství v časnějších týdnech těhotenství je pozdější prudký nárůst rizika preeklampsie, placentární insuficience a nitroděložního úmrtí plodu (Dudenhausen, Maier, 2010, Cheong-See et al, 2016).

V praxi je z důvodu bezpečnosti častější porod plodů vícečetného těhotenství per sectionem caesaream. Z pohledu analýzy steroidního metabolomu je tento faktor důležitý proto, že se tím obchází přirozený mechanismus nástupu děložní činnosti.

3.3 Komplikace vícečetného těhotenství

Pro vícečetná těhotenství je v porovnání s jednočetným těhotenstvím charakteristické vyšší riziko vzniku těhotenských komplikací. Výjimkou jsou rizika spojená s potermínovým těhotenstvím a makrosomií plodů. Těmi jsou vícečetná těhotenství ohrožena méně. V porovnání s bichoriálním těhotenstvím jsou monochoriální těhotenství z pohledu perinatologa riziková více. Některé studie vykazují vyšší riziko komplikací u těhotenství po metodách IVF. Tyto data ale nejsou konzistentní a mohou být asociovaná s infertilitou a morbiditou žen před snahou o koncepci.

Komplikace lze rozdělit dle původu na mateřské a ze strany plodu.

3.3.1 Mateřské komplikace

Změny hemodynamiky u těhotných

U vícečetných těhotenství jsou změny v hemodynamice vyjádřeny více než u jednočetných. Těhotné s dvojčaty mají až o 20% vyšší srdeční výdej a o 10-20% vyšší nárůst objemu plazmy než s jedním plodem. Tyto faktory zvyšují riziko vzniku edému plic v případě přítomnosti jiných rizikových faktorů. Fyziologická anemie je vyjádřena stejně jako u jednočetných, i když se objem červené krevní řady zvyšuje víc (Kametas et al., 2003, Rao et al., 2004, Kuleva et al., 2011).

Gestační hypertenze a preeklampsie

Studie a metaanalýzy jasně prokazují, že vícečetné těhotenství je rizikovým faktorem pro vznik preeklampsie. Míra relativního rizika oproti jednočetnému těhotenství pro vznik preeklampsie se pohybuje mezi 1,2 – 5,1. Široký rozptyl je daný zejména faktory jako je parita, etnicita apod (Krotz et al., 2002).

Závažné těžké formy preeklampsie jako HELLP syndrom nebo těžká preeklampsie s orgánovým selháním je rovněž u dvojčat častější (Sibai, et al. 2000).

Gestační diabetes mellitus

Práce porovnávající četnost těhotenské cukrovky u vícečetných a jednočetných těhotenství jednoznačně neprokazují vyšší výskyt u těhotných s více plody (Roach et al., 1998, Buhling et al., 2003). Makrosomie plodu u těhotných diabetiček jako komplikace těhotenství je méně častá (Ashwal et al., 2021).

Jiné mateřské komplikace

U vícečetného těhotenství je vyšší výskyt dalších komplikací, jako jsou akutní steatóza jater, těhotenská cholestáza, hyperemesis gravidarum, abrupce placenty, trombembolické příhody nebo dermatitidy (Gonzalez et al., 1989, Campbell, Templeton, 2004).

3.3.2 Fetální komplikace

Předčasný porod

Jedná se o jednu z nejčastějších a nejzávažnějších těhotenských patologií (Chauhan et al., 2010, Sentilhes et al., 2015).

Četnost předčasných porodů před 32. týdnem těhotenství je asi 10x vyšší u vícečetných než u jednočetných těhotenství (1:10 u vícečetných proti 1:100 u jednočetných) (Blondel 2002). V České republice bylo v roce 2022 celkem 6,98 % předčasných porodů (statistické údaje Sekce perinatologie a fetomaternální medicíny 2023).

Velký podíl na míře předčasných porodů mají v tomto případě i jiné těhotenské komplikace, pro které jsou tyto těhotenství ukončovány dříve. Důvodem předčasného porodu je v těchto případech iatrogenní zásah. Rizikovými faktory pro předčasný porod jsou v těchto případech například předčasný porod v anamnéze (OR 3,5) (Berveiller et al., 2020) nebo i těhotenství s 2 plody mužského pohlaví (Tan et al, 2004). Přítomnost plodu ženského pohlaví je dle některých prací považována za ochranný faktor (Melamed et al., 2009). Vyšší četnost spontánních předčasných porodů se vysvětluje výraznější distenzí myometria vedoucí k jeho zvýšené kontraktibilitě (Turton et al., 2013).

Nitroděložní úmrtí plodu (intrauterine fetal demise, IUFD)

Vícečetné těhotenství je rizikovým faktorem pro nitroděložní úmrtí plodu (Townsend, Khalil, 2018). U jednoho z dvou plodů po 14. týdnu těhotenství postihuje 6 %

těhotných. Následné riziko předčasného porodu pro druhý plod je 58,5 % u monochoriálních a 53,7 % u bichoriálních dvojčat (Mackie et al., 2019).

Závažnější je tato komplikace u monochoriálních dvojčat z důvodu přítomnosti vaskulárních anastomóz mezi oběma oběhy. Po úmrtí jednoho z plodů a poklesu tlaku krve v jeho oběhu se u živého objevuje akutní hypotenze, anemie a ischemie tkání. Příčinou je přesun krve od živého plodu do nízkotlakého řečiště mrtvého plodu. Podobný mechanismus není přítomen u bichoriálních dvojčat. Po úmrtí jednoho z bichoriálních dvojčat ale může dojít ke změně nitroděložního prostředí a tím ohrožení zdravého plodu.

Růstová restrikce

Jde o stav, při kterém je odhadovaná hmotnost plodu menší než 10. percentil populační růstové křivky. Zvláštním typem růstové restrikce je tzv. selektivní růstová restrikce, která postihuje pouze jeden z plodů.

Růstová restrikce se u monochoriálních dvojčat vyskytuje podle dostupných zdrojů asi ve 20% případů, resp. 10% u bichoriálních (Coutinho Nunes et al., 2016). Vyšší četnost u monochoriálních dvojčat se vysvětluje přítomností twin-to-twin transfúzním syndromem nebo jinou fetální anomálií.

Twin-to-twin transfúzní syndrom (TTTS)

Postihuje asi 10-15% monochoriálních vícečetných těhotenství. Podkladem jsou cévní spojky mezi placentami plodů, kterými na základě tlakového gradientu proudí krev z jednoho plodu k druhému. Z důvodu přetížení oběhu bez adekvátního zásahu (obvykle laserová ablace cévních spojek) akceptor odumírá. Pokud nedojde k okamžitému zastavení oběhu, je následně nitroděložním úmrtím ohrožen i původní donor (Bamberg, Hecher, 2019).

Variantou TTTS je tzv. *twin anemia polycythemia sequence (TAPS)*. Při této není přítomna jedna masivní cévní spojka ale několik drobných. Na jejich základě dojde k přesunu krve mezi plody. Jeden z nich je anemický a druhý polycytemický.

Při *TRAP (twin reversed arterial perfusion) sekvenci* je jeden z plodů zásobuje krví druhý, neživý, který je tzv. acardius.

Respiratory Distress Syndrome (RDS)

Studie prováděné na dvojčatech dokazují, že tyto plody jsou v porovnání s plody jednočetných těhotenství ohrožené RDS zejména častěji (41% versus 25,3%) (Choi et al., 2009). Současně platí, že více ohrožen je z dvojice plodů ten, kterého poporodní hmotnost je vyšší (Canpolat, Yurdakok, 2006).

Syndrom mizejícího dvojčete

Jde o spontánní redukci dvojčetného na jednočetné těhotenství. V případech těhotenství po metodách IVF je četnost mezi 7-36 % (Seong et al., 2020). U těhotenství po spontánní koncepci je četnost této komplikace neznámá, jelikož tyto jsou obvykle sledovány až od vyšších týdnů těhotenství (Harris et al., 2020).

Jiné fetální komplikace

Vícečetné těhotenství kromě výše uvedeného vykazují relativně vyšší riziko pro vznik vrozených vývojových vad, poruch ve smyslu vzájemného „zauzlení“ pupečnicků u monochoriálních dvojčat. Při poruchách rozdělení embrya v časném embryonálním stádiu dochází ke vzniku srostlic.

3.4 Endokrinologie vícečetného těhotenství

Historicky byla endokrinologie plodů a matek vícečetného těhotenství předmětem výzkumu několika studií. Podstatou těchto studií bylo popsat ovlivnění jednotlivých plodů pohlavními hormony.

Základem pro výzkumy byla ve většině případů tzv. „twin testosteron transfer“ hypotéza. Podle této hypotézy nadprodukce androgenů plodem mužského pohlaví negativně ovlivňuje druhý z plodů. U toho indukuje maskulinní vzhled, chování a kognici. U savců lze tento efekt často pozorovat např. na některých myších modelech (Tapp et al., 2011).

Problematika ovlivnění plodů zejména ženského pohlaví mužským plodem nebo matkou byla studována opakovaně. Jeden z výzkumů prokázal, že k ovlivnění ženských plodů ze smíšeného páru dvojčat matkou produkovaným testosteronem nedochází. Jiní autoři

tvrdí, že testosteron původem od matky je v placentě plně konvertován na estrogény. V případě patologického ovlivnění plodu je zdroj androgenů fetální (Cohen-Bendahan et al., 2005). Jiné studie ale tyto tvrzení odmítají nebo přímo vyvrací (Tapp et al., 2011, Talia et al., 2020).

Závěry jiných autorů opakovaně prokázaly, že plody ženského pohlaví ze smíšeného páru dvojčat nejsou ovlivněny mužským plodem více, než kdyby byl druhý plod rovněž ženského pohlaví. Dalším ze závěrů bylo také to, že i když těhotné s dvojčaty vykazovaly vyšší hladiny estrogenu a progesteronu, děti měly tyto hladiny v porovnání s jednočetným těhotenstvím nižší. Potvrzuje to tedy, že tyto děti nejsou exponovány vyšším hladinám pohlavních hormonů (Kuijper et al., 2015, Thomas et al., 1998).

Tématem stanovení steroidního metabolomu u matek a plodů vícečetného těhotenství se v minulosti zabýval pouze omezený počet studií. Jednalo se většinou o studie, které stanovovaly pouze omezený počet metabolitů steroidů. Současně studie prováděly analýzu pouze ze smíšené krve a nerozlišovaly mezi arteriální a venózní pupečnickovou krví (Houghton et al., 2019).

Náš tým má z minulosti zkušenosti se stanovením steroidů zvláště z arteriální a venózní krve (Pašková et al., 2014).

Hodnocení steroidního metabolomu v rozsahu, v jakém jsme ho prováděli pomocí našich metod nebylo dosud publikováno.

4 HYPOTÉZA

Pro naše účely jsme vyslovili následovnou hypotézu:

Přítomnost 2 plodů jednoho těhotenství resp. 2 placent v případě bichoriálních těhotenství, se projeví na hladinách steroidů v porovnání s jednočetným těhotenstvím.

4.1 Cíle

1. podrobně popsat korelace mezi komponenty steroidního metabolomu u dvojčat;
2. nastínit rozdíl mezi vícečetným a jednočetným těhotenstvím;
3. určit, zda existují rozdíly v metabolismu steroidů mezi dvojčaty různé chorionicity (tedy rozdíl v případě „společné“ a „oddělené“ placenty);
4. popsat, zda existuje rozdíl v arterio-venózní diferenciaci mezi vzorky u vícečetného těhotenství;
5. popsat mezipohlavní rozdíly v metabolomu, jelikož konverze prekurzorů u jednotlivých pohlaví je rozdílná.

5 METODY

5.1 Pacientky

Studijní skupina zahrnovala 2 skupiny pacientek, které v období od listopadu 2019 do listopadu 2021 porodily na naší klinice. Ve skupině bylo 50 žen s vícečetným těhotenstvím (49 dvojčat, 1 trojčata) a 20 žen s jednočetným těhotenstvím v kontrolní skupině.

Do studie jsme oslovily všechny ženy nad 18 let, které splnily inkluzní kritéria.

Inkluzní kritéria byla:

- vícečetné těhotenství (pro studijní skupinu),
- porod na naší klinice,
- porod plánovaným císařským řezem z indikace vícečetné těhotenství,
- souhlas se studií.

Vícečetná těhotenství byly ukončovány ve stáří těhotenství a dle chorionicity dle Doporučeného postupu České gynekologicko-porodnické společnosti. Rozptyl pro gestační stáří ve studijní skupině byl týden těhotenství 32+4 až 39+3. Jednočetné těhotenství jsme ukončovali v týdnu 38+0 až 41+1.

V případě spontánního nástupu porodu jsme pacientku nezařadili. Důvodem bylo riziko interference výsledků vzhledem ke změnám steroidů před spontánním nástupem děložní činnosti.

Z celé kohorty jsme následně vyřadili ty rodičky, u kterých se objevilo exkluzní kritérium s možným ovlivněním metabolismu steroidů:

- diabetes mellitus,
- intrahepatální cholestáza těhotných,
- preeklampsie,
- těhotné, které v průběhu těhotenství užívaly progesteron,
- ženy s akutním maligním procesem,
- těhotné se závažnou patologií – např. twin-to-twin transfúzní syndrom,
- těhotné, kterým byly podány kortikosteroidy k indukci maturace plic plodů.

Těhotenství po IVF nebylo považováno za exkluzní kritérium. Rovněž jsme nevyřadili pacientky s BMI v pásmu obezity. Důvodem byl fakt, že vícečetné těhotenství vykazují vyšší nárůst hmotnosti v průběhu těhotenství a jako obézní bylo možné hodnotit vysoký podíl těhotných.

Kontrolní skupinu tvořily ženy s jednočetným těhotenstvím. Tyto ženy měly plánovaný císařský řez z jiné než porodnické indikace (14x jizva na děloze po císařském řezu, 2x poloha plodu koncem pánevním, 1x primipara vetus, 1x neurologická indikace, 1x oční indikace a 1x ortopedická indikace). Exkluzní kritéria byly stejné jako u dvojčat. Jedna těhotná z kontrolní skupiny byla současně i ve studijní skupině.

Obě skupiny žen měly screening v I. a II. trimestru na naší klinice, oba screeningu s negativním výsledkem.

Z testovací skupiny byla vyřazena pacientka s trojčaty (2 plody s monochoriální komponentou a 1 plod se samostatnou placentou) z důvodu ukončení těhotenství pro preeklampsii.

Po vyřazení pacientek s exkluzním kritériem jsme analyzovali 24 pacientek s bichoriálním/biamniálním vícečetným těhotenstvím, 10 pacientek s monochoriálním/biamniálním těhotenstvím a 19 kontrolních pacientek. Pacientku s monochoriálním/monoamniálním těhotenstvím jsme ve skupině neměli ani jednu. Důvodem bylo velmi malé množství materiálu, které od těchto plodů lze k analýze získat.

Celkem jsme analyzovali 81 vzorků mateřské venózní a fetální arteriální a venózní krve ze skupiny dvojčat. Kontrolních vzorků od matek a plodů jsme analyzovali 47.

5.2 Sběr vzorků

Sběr vzorků probíhal ve dvou fázích. K odběru mateřské krve z kubitální vény došlo v co nejkratší možnou dobu před zahájením plánovaného císařského řezu a před podáním medikace anesteziologem. Bezprostředně po oddělení novorozence od placenty byl proveden separátní odběr arteriální a venózní pupečnickové krve každému z novorozenců.

Krev byla odebírána z části pupečníku, která se upíná na placentu. Novorozenec odběrem ovlivněn nebyl. Pro účely odběrů byl použitý BD Vacutainer® K2EDTA Vacutainer systém (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Objem odebrané krve byl 3ml z každé z pupečnickových cév a 6ml od matky.

Vzorky byly zpracovány nejpozději do 2 hodin od odběru. Po sražení při pokojové teplotě byly centrifugovány při 2400rpm po dobu 10 minut. Získané sérum bylo do doby analýzy zamrazeno na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté převezeno do laboratoře.

Naše zkušenosti z minulých studií dokazují, že takto zpracované vzorky jsou stabilní a koncentrace steroidů se v nich ani po delší době zmražení nemění. To dokazují i studie Kleye (Kley et al., 1984, Kley et al., 1985).

5.3 Klinická data

Z dostupné dokumentace jsme extrahovali údaje o anamnéze a těhotenství rodičky, porodu a novorozenci.

Tyto data obsahovaly:

- základní údaje o rodičce (věk, vzdělání, rasa, výška, hmotnost před těhotenstvím a v době porodu),
- údaje o anamnéze před těhotenstvím,
- gravidita, parita,
- informace o kouření, abusus drog a alkoholu,
- způsob početí (spontánní, metody asistované reprodukce),
- údaje o průběhu těhotenství (jakékoliv komplikace těhotenství),
- výsledky vyšetření z krve matky, pokud byly dostupné (krevní obraz, biochemie, jaterní a renální parametry, hladiny protilátek, krevní skupina),
- výsledky ultrazvukových vyšetření z těhotenství,
- farmakologická anamnéza,
- informace o porodu (hodnoty vitálních funkcí se začátkem porodu, průběh porodu),
- údaje o novorozenci (pohlaví, délka, hmotnost, hodnoty APGAR skóre, výsledky Astrup vyšetření a pH),

- průběh poporodní adaptace,
- informace o kojení.

5.4 Laboratorní analýza

Analýza vzorků byla prováděna v laboratoři Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu. Použita byla metoda plynové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Metodu analýzy vyvinul a popsal Hill (Hill et al., 2019).

Seznam stanovovaných komponentů steroidů touto metodou uvádí Tabulka 1 (převzato z Hill et al., 2019).

5.4.1 Chemikálie a reagenty

Potřebné reagenty a chemikálie pocházely z firmy Steraloids (Newport, RI, USA). Kortizon a trimethylchlorosilan určené k hydrolýze konjugovaných steroidů byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ostatní rozpouštědla byla z firmy Merck (Darmstadt, Německo).

5.4.2 Přístroje

K měření hladin steroidů byl po přípravě vzorků použitý systém GCMS-TQ8040 od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko). Ten se skládá z plynového chromatografu s automatickou kontrolou průtoku, autosamplerem AOC-20s a trojitým kvadrupólovým detektorem s nastavitelným napětím 10-195 V.

Pro účely analýzy sloužila kapilární kolona RESTEK Rtx-50 (průměr 0,25mm, délka 15 m, film o tloušťce 0,1 μm). Pro měření bylo použita ionizace dopadem elektronů ze zdroje o napětí 60 V a emisním proudem 151 μA . Teploty injekčního portu, iontového zdroje a rozhraní byly nastaveny postupně na 220, 300 a 310 $^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly vstříkovány pod tlakem 200kPa po dobu 1 min. Napětí detektoru bylo nastaveno na 2,2 kV.

5.5 Statistická analýza dat

Před další analýzou bylo nezbytné transformovat původně nesymetrická data směrem k symetrii a konstantnímu rozptylu. Poté byly vyhodnoceny rozdíly mezi

jednočetnými a vícečetnými těhotenstvími pro každý ze steroidů. Byl použit lineární model, který bral v potaz typ těhotenství (jednočetné vs. vícečetné) a pohlaví (mužské vs. ženské). Tento model byl upraven pro stáří rodičky a stáří těhotenství v době porodu. Simultánně byly testovány tyto rozdíly parametrů pro mateřskou žilní, arteriální pupečnickovou a venózní pupečnickovou krev za použití vícerozměrného regresního modelu s redukcí dimenzionality (ortogonální projekce do latentní struktury OPLS, regresní analýza OMR).

Ke zpracování byl použit statistický software Statgraphics Centurion v. XVIII od firmy Statgraphics Technologies, Inc. (The Plains, Virginia, USA) a program SIMCA_P v. 12.0 od firmy Umetrics AB (Umeå, Švédsko).

Tabulka 1: Seznam analyzovaných metabolitů a jejich zkratk		
	Zkratka	Název anglicky
1	Preg	Pregnenolone
2	Preg17	17 α -Hydroxypregnenolone
3	Preg16a	16 α -Hydroxypregnenolone
4	Preg20a	20 α -Dihydropregnenolone
5	DHEA	Dehydroepiandrosterone
6	DHEA7a	7 α -Hydroxy-DHEA
7	DHEA7o	7-oxo-DHEA
8	DHEA7b	7 β -Hydroxy-DHEA
9	Adiol	5-Androstene-3 β , 17 β -diol
10	AT7a	5-Androstene-3 β ,7 α ,17 β -triol
11	AT7b	5-Androstene-3 β ,7 β ,17 β -triol
12	AT16a	5-Androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol
13	Prog	Progesterone
14	Prog17	17 α -Hydroxyprogesterone
15	Prog17a20a	17 α ,20 α -Dihydroxy-4-pregnene-3-one
16	Prog16a	16 α -Hydroxyprogesterone
17	Prog20a	20 α -Dihydroprogesterone
18	Adion	Androstenedione
19	T	Testosterone
20	T16a	16 α -Hydroxytestosterone
21	DHT5a	5 α -Dihydrotestosterone
22	E1	Estrone
23	E2	Estradiol
24	E3	Estriol
25	P5a	5 α -Dihydroprogesterone

26	P3a5a	Allopregnanolone
27	P3b5a	Isopregnanolone
28	P5b	5 β -Dihydroprogesterone
29	P3a5b	Pregnanolone
30	P3b5b	Epipregnanolone
31	P5a20a	5 α ,20 α -Tetrahydroprogesterone
32	P3a5a20a	5 α -Pregnane-3 α ,20 α -diol
33	P3b5a20a	5 α -Pregnane-3 β ,20 α -diol
34	P5b20a	5 β ,20 α -Tetrahydroprogesterone
35	P3a5b20a	5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol
36	P3b5b20a	5 β -Pregnane-3 β ,20 α -diol
37	P3a5a17	17 α -Hydroxyallopregnanolone
38	P3a5b17	17 α -Hydroxypregnanolone
39	P3a5a17a20a	5 α -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
40	P3b5a17a20a	5 α -Pregnane-3 β ,17 α ,20 α -triol
41	P3a5b17a20a	5 β -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
42	A5a	5 α -Androstane-3,17-dione
43	A3a5a	Androsterone
44	A3b5a	Epiandrosterone
45	A3a5b	Etiocholanolone
46	A3a5a17b	5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol
47	A3b5a17b	5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol
48	A3a5b17b	5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol
49	F	Cortisol
50	E	Cortisone
51	B	Corticosterone
52	DOF	21-Deoxycortisol

53	DOC	11-Deoxycorticosterone
54	P3a5a11b21	3 α ,5 α -Tetrahydrocorticosterone
55	P3a5b11b21	3 α ,5 β -Tetrahydrocorticosterone
56	A211b	11 β -Hydroxyandrostenedione
57	A3a5a11b	11 β -Hydroxyandrosterone
58	A3b5a11b	11 β -Hydroxyepiandrosterone
59	A3a5b11b	11 β -Hydroxyetiocholanolone
60	PregC	Pregnenolone sulfate
61	Preg17C	17 α -Hydroxypregnenolone sulfate
62	Preg20aC	20 α -Dihydropregnenolone sulfate
63	DHEAC	DHEA sulfate
64	AdiolC	Androstenediol sulfate
65	AT16aC	5-Androstene-3 β ,16 α ,17 β -triol sulfate
66	Prog17a20aC	Conjugated 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one
67	Prog20aC	Conjugated 20 α -dihydroprogesterone
68	TC	Conjugated testosterone
69	EpiTC	Conjugated epitestosterone
70	E1C	Estrone sulfate
71	E2C	Estradiol sulfate
72	E3C	Estriol sulfate
73	P3a5aC	Allopregnanolone sulfate
74	P3b5aC	Isopregnanolone sulfate
75	P3a5bC	Conjugated pregnanolone
76	P3b5bC	Conjugated epipregnanolone
77	P5a20aC	Conjugated 5 α ,20 α -tetrahydroprogesterone
78	P3a5a20aC	Conjugated 5 α -pregnane-3 α ,20 α -diol
79	P3b5a20aC	Conjugated 5 α -pregnane-3 β ,20 α -diol

80	P5b20aC	Conjugated 5 β ,20 α -tetrahydroprogesterone
81	P3a5b20aC	Conjugated 5 β -pregnane-3 α ,20 α -diol
82	P3b5b20aC	Conjugated 5 β -pregnane-3 β ,20 α -diol
83	P3a5a17C	17 α -Hydroxyallopregnanolone sulfate
84	P3a5b17C	Conjugated 17 α -hydroxypregnanolone
85	P3a5a17a20a	5 α -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
86	P3b5a17a20a	5 α -Pregnane-3 β ,17 α ,20 α -triol
87	P3a5b17a20a	5 β -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
88	A3a5aC	Androsterone sulfate
89	A3b5aC	Epiandrosterone sulfate
90	A3a5bC	Etiocholanolone sulfate
91	A3b5bC	Epietiocholanolone sulfate
92	AD3a5a17bC	Conjugated 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol
93	AD3b5a17bC	Conjugated 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol
94	AD3a5b17bC	Conjugated 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol
95	AD3b5b17bC	Conjugated 5 β -androstane-3 β ,17 β -diol
96	P3a5a11b21C	Conjugated 3 α ,5 α -tetrahydrocorticosterone
97	P3a5b11b21C	Conjugated 3 α ,5 β -tetrahydrocorticosterone
98	A3a5a11bC	11 β -Hydroxyandrosterone sulfate
99	A3b5a11bC	11 β -Hydroxyepiandrosterone sulfate
100	A3a5b11bC	11 β -Hydroxyetiocholanolone sulfate

Tabulka 1: Seznam analyzovaných metabolitů, převzato z Hill et al. 2019.

6 VÝSLEDKY

Ve studii jsme se zaměřili na analýzu sto endogenních steroidů a jejich analýzu v arteriální a venózní krvi plodů a matek vícečetného těhotenství, resp. jednočetného těhotenství (kontrola).

V době psaní této práce byla v časopise s IF publikována část výsledků popisující bichoriální těhotenství (Černý et al., 2024).

Složení pacientek ve studijní a kontrolní skupině po očištění od exkluzních kritérií popisuje Tabulka 2. V kohortě není těhotná s trojčetným těhotenstvím. Jedna z pacientek byla v kohortě s dvojčaty a následně jako jednočetná kontrola. Víc podobných pacientek jsme po dobu sledování neměli, proto jsme zvláštní statistickou analýzu pro tento případ neprováděli.

Charakteristika	Typ těhotenství		
	Bichoriální/biamniální	Monochoriální/biamniální	Kontroly
Počet pacientek	24	10	19
Průměrný věk v době porodu	32 (27, 44)	30.3 (22, 42)	36.9 (22, 45)
Parita	0.71 (0, 4)	0.7 (0, 2)	0.79 (0, 1)
Spontánní koncepce	17	9	15
Koncepce po metodě IVF	7	1	4
Průměrná hmotnost před těhotenstvím (kg)	73.9 (53, 112)	63.4 (47, 76)	66.6 (49, 122)
Průměrná hmotnost v době porodu (kg)	94.2 (70, 117)	79.5 (60, 95)	80.1 (65, 118)
Průměrná výška (cm)	164 (155, 186)	168 (150, 180)	165.9 (145, 180)
Gestační stáří v době porodu	37.99 (35+3, 39+3)	36,51 (35+5, 37+3)	38.34 (38+1, 41+1)
Počet novorozenců mužského pohlaví	30	10	9
Počet novorozenců ženského pohlaví	18	10	10
Průměrná hmotnost novorozence (g)	2775.5 (1780, 3570)	2301.25 (1930, 2630)	3391.6 (2780, 4050)
Průměrná délka novorozence (cm)	48.1 (43, 51)	44.45 (44, 48)	49.8 (47, 51)

Tabulka 2: Charakteristika studijní a kontrolní kohorty.

Pozn.: délka novorozence byla měřena pouze v případech naléhání plodu hlavičkou. Měření plodu v poloze podélné koncem pánevním se provádí s časovým odstupem od porodu, proto nebyly tyto plody do průměru počítány.

Kompletní výsledky laboratorní analýzy metabolitů steroidů předkládáme ve formě pozitivních a negativních korelací mezi jednotlivými skupinami. Tabulka 3 ukazuje na korelace mezi bichoriálním a jednočetným těhotenstvím (kontroly). Tabulka 4 ukazuje na korelace mezi

monochoriálním a jednočetným těhotenstvím. Tabulka 5 nabízí porovnání bichoriálních a monochoriálních gravidit mezi sebou.

V tabulkách je pro přehlednost pozitivní korelace označena žlutou barvou a negativní korelace modrou barvou.

Proměnné, které ve statistickém zpracování nebyly relevantní jsme z přehledu odstranili.

Součástí výsledků je korelace ve vztahu k arterio-venózní diferenciaci pupečnickové krve.

Metabolity fetálního původu (arteriální krev) jsou označeny indexem A, metabolity placentárního původu (venózní krev) mají označení V. Mateřská krev má označení M.

Označení * nebo ** označuje významnost daného parametru. Velmi významný parametr se silnou korelací je označen **, významný parametr je označen *.

Podrobnější výklad předkládáme v kapitole *Diskuse*.

Tabulka 3: Korelace bichoriálních dvojčat s jednočetnými kontrolami. Evaluace provedena pomocí OPLS modelu a vícedimenzionální regrese.

Proměnná	OPLS, predictive component						Multiple regression			
	Variable importance	t-statistics		Component loading	t-statistics	R ²	Regression coefficient	t-statistics		
SC spont	0,46	2,60	*	0,033	2,35	0,180	*	0,019	2,44	*
nMalef	1,1967	5,81	**	0,082	5,31	0,488	**	0,093	4,15	**
GA	1,1959	4,87	**	-0,080	-4,80	-0,471	**	-0,027	-1,77	
Preg_A	0,8637	3,10	**	0,060	2,75	0,359	*	0,030	2,05	*
PregC_A	1,0218	4,86	**	-0,067	-3,95	-0,430	**	-0,028	-2,35	*
Preg20a_A	1,1698	4,40	**	0,082	3,80	0,513	**	0,046	5,20	**
Preg20aC_A	0,5182	1,97	*	-0,033	-1,50	-0,213		0,007	0,35	
Preg17_A	0,6186	2,01	*	0,045	1,74	0,296		0,001	0,05	
Preg17C_A	0,5813	5,39	**	-0,039	-4,66	-0,244	**	0,014	0,96	
Preg16a_A	1,1095	2,94	*	0,079	2,59	0,520	*	0,033	2,42	*
DHEAC_A	1,0389	5,26	**	-0,069	-4,01	-0,439	**	-0,037	-2,96	*
DHEA7o_A	0,8805	3,04	**	0,064	2,85	0,415	*	0,022	2,06	*
AT16aC_A	0,6182	2,30	*	-0,040	-1,77	-0,269		0,019	0,83	
Prog20a_A	0,9058	3,72	**	0,064	3,56	0,423	**	-0,023	-1,12	
Prog17_A	0,6119	2,35	*	0,044	2,50	0,269	*	-0,011	-1,58	
Prog17a20a_A	0,6378	4,02	**	0,049	4,36	0,308	**	0,008	0,41	
A2_A	0,4604	4,92	**	0,035	6,36	0,227	**	0,001	0,06	
T16a_A	0,3874	2,32	*	0,028	1,98	0,171	*	-0,006	-0,49	
P5a_A	1,2055	4,66	**	0,086	4,61	0,561	**	-0,019	-0,88	
P3a5a_A	1,0575	4,27	**	0,073	3,76	0,485	**	-0,031	-2,30	*
P3a5aC_A	0,6691	3,88	**	0,050	3,46	0,360	**	0,006	0,91	
P3b5a_A	1,4334	5,95	**	0,100	5,70	0,657	**	0,014	1,15	
P5a20a_A	1,2454	5,20	**	0,087	4,91	0,578	**	-0,027	-2,22	*
P3a5a20a_A	1,0735	4,24	**	0,074	4,11	0,490	**	-0,020	-1,66	
P3a5a20aC_A	0,8328	3,40	**	0,059	3,07	0,400	**	0,009	0,52	
P3b5a20a_A	1,501	6,34	**	0,106	6,47	0,688	**	0,006	0,39	
P3b5a20aC_A	0,9434	4,43	**	0,067	4,49	0,465	**	0,035	2,10	*
P3b5b20aC_A	0,5204	2,44	*	0,038	2,47	0,258	*	0,040	2,49	*
P3a5a17_A	0,7379	2,01	*	0,052	1,93	0,356	*	-0,015	-0,56	
P3a5a17C_A	0,404	1,93	*	0,032	1,97	0,237	*	0,003	0,26	
P3a5b17_A	0,5443	2,02	*	0,036	1,72	0,249		0,013	0,58	
P3a5b17C_A	0,7646	2,86	*	0,056	2,60	0,374	*	0,024	0,87	
A3b5aC_A	0,8891	3,05	**	-0,057	-2,38	-0,356	*	-0,013	-1,73	
A3a5a17bC_A	0,736	2,31	*	0,055	2,38	0,376	*	0,024	1,16	
F_RIA_A	0,5272	2,58	*	-0,037	-2,21	-0,233	*	-0,041	-2,81	*
B_A	0,5507	4,20	**	0,040	3,02	0,265	**	0,013	1,14	
DOF_A	1,0105	5,40	**	0,069	5,12	0,469	**	0,053	3,61	**
DOC_A	0,9325	3,41	**	0,069	3,59	0,438	**	-0,005	-0,18	
T11b_A	0,4818	2,96	*	0,036	2,61	0,220	*	0,011	0,67	
T11bC_A	1,1152	5,35	**	-0,076	-5,18	-0,506	**	-0,018	-1,38	
P3a5b11b21_A	1,7419	11,31	**	0,122	10,08	0,769	**	0,022	1,59	
A3a5a11b_A	0,385	2,18	*	0,031	2,02	0,214	*	-0,027	-2,37	*
A3b5a11b_A	0,6042	3,97	**	0,044	3,91	0,299	**	-0,005	-0,90	
A3b5a11bC_A	0,689	2,69	*	0,050	2,75	0,346	*	0,030	1,66	
Preg_V	0,9234	3,44	**	0,068	3,09	0,403	**	0,040	2,41	*
PregC_V	1,0652	6,19	**	-0,070	-5,18	-0,422	**	-0,038	-1,55	
Preg20a_V	0,7685	4,69	**	0,058	3,52	0,352	**	0,035	2,40	*
Preg20aC_V	0,6872	3,10	**	-0,045	-2,60	-0,268	*	0,013	0,64	
Preg17_V	0,4248	2,19	*	0,033	2,14	0,212	*	0,008	0,62	
Preg17C_V	0,5292	2,48	*	-0,034	-2,23	-0,200	*	0,023	1,28	
Preg16a_V	1,0076	4,60	**	0,074	4,81	0,453	**	0,021	1,16	
DHEAC_V	1,0958	4,88	**	-0,074	-4,17	-0,453	**	-0,034	-2,16	*
AT7b_V	0,6015	2,56	*	0,044	2,34	0,278	*	0,044	1,60	
AT16aC_V	0,8958	6,15	**	-0,062	-4,54	-0,369	**	0,022	1,14	

Relevant predictors (matrix X)

Prog_V	0,5908	1,92	*	0,045	1,92	0,259	*	-0,008	-0,63	
Prog20a_V	0,8653	2,50	*	0,062	2,62	0,363	*	-0,006	-0,59	
Prog17_V	0,5744	2,63	*	0,045	2,40	0,267	*	-0,005	-0,52	
Prog17a20a_V	0,4689	2,01	*	0,036	1,74	0,210		0,015	1,35	
Prog17a20aC_V	0,5023	2,01	*	-0,033	-1,54	-0,194		-0,008	-0,45	
Prog16a_V	0,4554	1,91	*	0,037	1,99	0,219	*	0,023	1,48	
T16a_V	0,3833	2,68	*	0,029	2,33	0,169	*	-0,001	-0,07	
E1_V	0,6219	2,87	*	0,045	2,43	0,278	*	0,014	0,71	
E2_RIA_V	0,831	2,45	*	0,059	2,15	0,355	*	0,023	0,87	
P5a_V	1,42	16,26	**	0,102	13,77	0,616	**	0,015	1,50	
P3a5a_V	1,1707	6,76	**	0,082	6,92	0,502	**	0,012	1,22	
P3b5a_V	1,5318	12,99	**	0,108	13,15	0,649	**	0,032	3,44	**
P5b_V	0,546	2,12	*	0,038	1,81	0,229		0,000	0,02	
P3a5b_V	0,5918	3,05	**	0,038	2,44	0,229	*	-0,001	-0,05	
P3b5b_V	0,7722	2,53	*	0,053	2,17	0,309	*	0,024	1,19	
P5a20a_V	1,4496	7,76	**	0,102	8,14	0,612	**	0,007	0,84	
P3a5a20a_V	1,1255	4,34	**	0,078	4,32	0,471	**	0,001	0,06	
P3b5a20a_V	1,3761	6,06	**	0,097	5,62	0,580	**	0,016	1,14	
P3b5a20aC_V	0,7743	2,27	*	0,055	2,10	0,314	*	0,001	0,04	
P5b20a_V	0,6953	3,27	**	0,045	2,61	0,263	*	0,010	0,63	
P3b5b20a_V	0,4763	2,31	*	0,028	1,95	0,165	*	0,028	1,32	
P3a5a17_V	0,6987	2,21	*	0,050	2,06	0,305	*	-0,001	-0,06	
P3a5b17C_V	0,6581	2,39	*	0,048	2,00	0,286	*	0,001	0,05	
P3a5a17a20a_V	0,4379	2,06	*	0,033	2,15	0,203	*	0,005	0,55	
A3b5aC_V	0,9552	3,09	**	-0,062	-2,38	-0,376	*	-0,024	-1,75	
A3a5a17bC_V	0,6734	2,05	*	0,050	1,95	0,299	*	0,014	0,91	
DOC_V	0,9312	4,25	**	0,070	3,89	0,416	**	0,007	0,34	
T11bC_V	0,6755	2,29	*	-0,044	-1,81	-0,253		-0,019	-1,09	
P3a5b11b21_V	1,5199	6,90	**	0,107	5,93	0,634	**	0,033	4,08	**
A3b5a11b_V	0,8191	3,99	**	0,060	3,70	0,357	**	0,014	1,49	
Preg_M	1,8397	11,76	**	0,128	12,35	0,765	**	0,043	3,06	**
Preg20a_M	1,6328	8,53	**	0,116	9,20	0,689	**	0,031	2,74	*
Preg17_M	1,0466	4,15	**	0,076	4,97	0,440	**	-0,032	-3,15	**
Preg17C_M	0,7306	2,43	*	0,057	2,35	0,341	*	0,021	1,18	
Preg16a_M	1,5417	17,20	**	0,110	18,73	0,650	**	0,000	0,03	
DHEA_M	0,8619	3,30	**	0,063	3,52	0,362	**	-0,003	-0,38	
DHEAC_M	0,7286	1,91	*	-0,047	-1,60	-0,297		-0,064	-3,41	**
DHEA7o_M	1,5198	7,96	**	0,109	8,12	0,634	**	0,030	2,86	*
DHEA7b_M	0,9196	4,32	**	0,065	4,76	0,375	**	-0,004	-0,22	
AT16a_M	1,3685	6,48	**	0,097	6,82	0,576	**	0,012	0,94	
Prog_M	0,883	8,43	**	0,058	7,22	0,338	**	0,016	0,60	
Prog20a_M	1,7198	17,24	**	0,121	15,13	0,710	**	0,019	2,88	*
Prog20aC_M	1,3647	9,79	**	0,099	8,58	0,585	**	0,023	1,46	
Prog17_M	1,334	5,34	**	0,093	5,82	0,549	**	0,005	0,39	
Prog17a20a_M	1,4739	11,96	**	0,104	11,53	0,609	**	-0,002	-0,14	
Prog17a20aC_M	0,6653	1,91	*	0,048	1,84	0,287		0,002	0,08	
Prog16a_M	1,2126	6,82	**	0,087	6,52	0,513	**	0,017	0,99	
A2_M	0,7168	3,49	**	0,051	4,35	0,296	**	-0,014	-1,33	
T_M	0,4165	2,74	*	0,030	3,62	0,180	**	-0,028	-1,84	
T16a_M	1,0434	6,96	**	0,071	6,53	0,424	**	0,005	0,78	
T16aC_M	1,1002	4,24	**	0,081	4,62	0,493	**	0,032	2,26	*
EpiTC_M	0,865	2,60	*	0,061	2,80	0,364	*	-0,019	-1,12	
E1_M	0,7632	2,98	*	0,052	2,85	0,316	*	-0,030	-1,49	
E1C_M	0,7974	2,67	*	0,058	2,62	0,347	*	0,005	0,21	
E2_RIA_M	1,1736	5,64	**	0,080	5,65	0,488	**	0,020	0,99	
E2C_M	1,0471	2,51	*	0,074	2,40	0,439	*	-0,003	-0,24	
E3_M	0,7159	2,61	*	0,045	2,17	0,278	*	0,042	3,06	**
P5a_M	1,327	6,52	**	0,093	7,28	0,547	**	-0,012	-3,49	**
P3a5a_M	1,223	5,97	**	0,085	6,06	0,499	**	-0,016	-3,60	**
P3b5a_M	1,8196	15,05	**	0,127	15,72	0,756	**	0,031	3,13	**
P3b5aC_M	0,6673	3,02	**	0,048	2,85	0,277	*	-0,024	-2,10	*
P5b_M	1,1756	4,67	**	0,080	4,53	0,480	**	0,014	1,03	
P3a5b_M	0,9788	3,26	**	0,066	3,00	0,389	**	0,000	0,01	

P3a5bC_M	0,6118	4,48	**	0,044	4,18	0,252	**	0,000	0,03	
P3b5b_M	0,9673	4,51	**	0,067	4,30	0,399	**	0,008	0,54	
P3b5bC_M	0,7326	3,80	**	0,053	3,88	0,310	**	-0,019	-1,79	
P5a20a_M	1,6589	15,88	**	0,117	16,89	0,688	**	0,004	0,84	
P3a5a20a_M	1,7007	13,03	**	0,119	12,08	0,701	**	0,006	0,75	
P3b5a20a_M	1,9003	15,45	**	0,134	14,87	0,798	**	0,040	11,90	**
P5b20a_M	1,5058	7,59	**	0,104	5,83	0,613	**	0,029	3,23	**
P3a5b20a_M	1,4868	9,97	**	0,102	8,01	0,613	**	0,028	1,73	
P3b5b20a_M	1,11	3,65	**	0,076	3,16	0,450	**	0,031	1,74	
P3a5a17_M	1,1784	4,74	**	0,082	4,47	0,487	**	-0,013	-0,79	
P3a5a17C_M	1,0943	6,33	**	0,079	5,99	0,475	**	0,012	1,54	
P3a5b17_M	1,1816	4,08	**	0,082	4,18	0,491	**	0,032	1,62	
P3a5b17C_M	1,1782	7,23	**	0,085	6,79	0,507	**	0,001	0,05	
P3a5a17a20a_M	1,0582	5,26	**	0,077	5,38	0,456	**	-0,010	-1,28	
P3a5b17a20a_M	0,893	3,95	**	0,061	4,09	0,365	**	0,004	0,26	
P3a5b17a20aC_M	0,6491	2,00	*	0,045	1,62	0,273		0,034	2,41	*
A5a_M	0,687	2,50	*	0,051	2,69	0,300	*	0,000	-0,01	
A3a5a_M	0,61	2,11	*	0,045	2,23	0,270	*	0,003	0,29	
A3b5a_M	1,2932	5,12	**	0,093	5,12	0,552	**	0,023	3,31	**
A3b5a17bC_M	0,5895	1,95	*	0,045	1,94	0,268	*	0,037	1,99	*
A3a5b17bC_M	0,8814	2,95	*	0,061	2,75	0,366	*	0,018	1,10	
S_M	0,928	4,19	**	0,063	4,41	0,360	**	-0,041	-3,14	**
DOF_M	0,8016	2,55	*	0,060	2,72	0,343	*	-0,037	-1,96	*
DOC_M	1,5191	5,80	**	0,108	5,42	0,695	**	-0,005	-0,26	
DOCC_M	0,9889	3,34	**	0,071	4,00	0,428	**	0,052	2,59	*
T11b_M	1,3863	15,18	**	0,097	16,30	0,633	**	0,018	1,69	
T11bC_M	0,893	4,11	**	0,063	3,49	0,383	**	0,001	0,15	
P3a5b11b21_M	1,7041	8,78	**	0,119	7,96	0,738	**	0,019	1,26	
A3a5a11b_M	1,0319	3,32	**	0,074	3,16	0,479	**	0,008	0,35	
A3b5a11b_M	1,4807	7,24	**	0,107	7,13	0,689	**	0,009	0,69	
A3b5a11bC_M	0,6166	3,21	**	0,043	3,04	0,226	**	-0,006	-0,45	
AT16aC_A%V	0,4179	2,21	*	0,030	2,21	0,194	*	-0,033	-0,86	
DHT5a_A%V	0,3383	2,15	*	-0,028	-1,97	-0,184	*	-0,006	-0,31	
E1C_A%V	0,5303	2,06	*	-0,040	-2,00	-0,246	*	-0,008	-0,32	
A3a5b_A%V	0,3905	2,02	*	0,030	2,36	0,190	*	0,001	0,04	
A3b5a17bC_A%V	0,5876	2,60	*	-0,041	-2,21	-0,263	*	-0,075	-2,78	*
A3b5b17bC_A%V	0,6631	3,16	**	0,045	3,06	0,309	**	0,019	0,48	
T11bC_A%V	0,7058	6,96	**	-0,050	-6,78	-0,322	**	-0,004	-0,44	
A3b5a11b_A%V	0,7288	3,47	**	-0,053	-4,21	-0,344	**	-0,016	-0,98	
Preg_V%M	1,3957	8,88	**	-0,095	-6,74	-0,546	**	-0,021	-1,39	
PregC_V%M	0,762	2,25	*	-0,052	-2,08	-0,301	*	0,038	3,17	**
Preg17C_V%M	1,1512	2,83	*	-0,083	-2,87	-0,497	*	0,000	-0,03	
Preg16a_V%M	0,8976	4,44	**	-0,061	-4,32	-0,356	**	0,011	1,12	
DHEA_V%M	0,8232	4,09	**	-0,057	-4,35	-0,308	**	0,006	0,62	
DHEA7o_V%M	1,4526	4,97	**	-0,101	-4,79	-0,592	**	-0,053	-2,57	*
DHEA7b_V%M	0,7417	3,88	**	-0,052	-3,48	-0,300	**	-0,022	-1,96	*
AdiolC_V%M	0,6729	1,95	*	-0,046	-2,07	-0,272	*	0,020	0,99	
AT16a_V%M	0,7886	2,89	*	-0,053	-2,41	-0,318	*	-0,017	-1,99	*
Prog20a_V%M	1,31	4,58	**	-0,091	-4,35	-0,528	**	-0,021	-1,55	
Prog20aC_V%M	1,3533	4,50	**	-0,094	-3,98	-0,561	**	-0,057	-4,10	**
Prog17_V%M	0,8721	3,15	**	-0,057	-2,65	-0,339	*	-0,008	-0,67	
Prog17a20a_V%M	1,2744	4,82	**	-0,087	-3,97	-0,512	**	0,015	1,17	
Prog17a20aC_V%M	1,1284	3,87	**	-0,078	-4,07	-0,464	**	-0,018	-1,90	*
Prog16a_V%M	0,7654	4,62	**	-0,051	-3,45	-0,298	**	0,006	1,26	
T16a_V%M	0,4856	2,51	*	-0,030	-1,79	-0,191		-0,006	-0,66	
T16aC_V%M	1,059	2,75	*	-0,074	-2,63	-0,441	*	0,022	0,79	
EpiTC_V%M	0,9639	4,27	**	-0,066	-4,40	-0,393	**	0,017	1,90	*
E1C_V%M	0,8149	3,33	**	-0,055	-2,49	-0,337	*	-0,041	-2,68	*
E2_RIA_V%M	0,9775	3,26	**	-0,069	-3,31	-0,449	**	-0,013	-0,89	
E2C_V%M	0,7047	2,55	*	-0,050	-2,32	-0,307	*	-0,012	-0,74	
P3b5a_V%M	1,2791	6,46	**	-0,088	-5,75	-0,517	**	-0,034	-2,67	*
P3b5aC_V%M	1,0023	3,22	**	-0,067	-2,79	-0,397	*	0,003	0,30	
P5b_V%M	1,1003	3,38	**	-0,075	-3,31	-0,454	**	-0,018	-1,54	

P3b5bC_V%M	0,9127	2,72	*	-0,062	-2,43	-0,369	*	-0,004	-0,30
P5a20a_V%M	1,3326	6,73	**	-0,094	-7,24	-0,544	**	-0,009	-0,83
P3a5a20a_V%M	0,8928	2,93	*	-0,062	-2,98	-0,350	*	-0,017	-0,63
P3b5a20a_V%M	1,2435	5,31	**	-0,087	-4,60	-0,511	**	-0,041	-2,99 *
P5b20a_V%M	1,1629	3,81	**	-0,084	-4,23	-0,493	**	-0,029	-1,86
P3a5b20a_V%M	1,0165	2,99	*	-0,078	-3,49	-0,466	**	-0,024	-1,26
P3b5b20a_V%M	0,9379	2,84	*	-0,067	-2,61	-0,386	*	-0,019	-0,94
P3a5a17_V%M	0,8297	2,71	*	-0,056	-2,35	-0,325	*	0,011	0,68
P3a5a17C_V%M	0,8667	2,41	*	-0,059	-2,20	-0,358	*	-0,001	-0,03
P3a5b17_V%M	0,9616	2,66	*	-0,072	-2,47	-0,437	*	-0,039	-2,08 *
P3a5a17a20a_V%M	1,1328	6,15	**	-0,081	-5,85	-0,473	**	0,027	3,17 **
P3a5b17a20a_V%M	0,9783	4,11	**	-0,070	-4,13	-0,414	**	-0,010	-0,68
P3a5b17a20aC_V%M	0,8178	3,08	**	-0,058	-2,88	-0,344	*	-0,034	-1,38
A3a5a_V%M	0,8526	2,08	*	-0,061	-2,08	-0,369	*	-0,044	-1,84
A3b5a_V%M	0,8903	3,35	**	-0,061	-2,78	-0,344	*	-0,020	-1,57
A3a5b_V%M	0,7605	2,85	*	-0,057	-3,36	-0,343	**	-0,033	-1,61
A3a5b17bC_V%M	0,8571	2,51	*	-0,057	-2,16	-0,347	*	0,002	0,09
S_V%M	1,081	3,38	**	-0,072	-2,83	-0,423	*	0,033	2,29 *
DOC_V%M	0,9969	3,24	**	-0,068	-2,79	-0,435	*	-0,001	-0,07
T11b_V%M	0,8975	4,85	**	-0,061	-3,83	-0,425	**	-0,022	-1,70
T11bC_V%M	1,0356	6,40	**	-0,071	-5,40	-0,418	**	-0,013	-1,29
P3a5b11b21_V%M	1,0202	2,34	*	-0,072	-2,20	-0,438	*	-0,003	-0,10
A3a5a11b_V%M	0,7945	2,74	*	-0,060	-2,63	-0,322	*	-0,053	-3,72 **
(matrix Y) con_LL				-0,707	-59,55	-0,988	**		
bi_bi_LL				0,707	59,55	0,988	**		
Explained variability								97,6% (83,8% after cross-validation)	

^aR...Korelační koeficient s prediktivní komponentou, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Zkratky: V - venózní krev, A - arteriální krev, M - mateřská krev, GA - gestační stáří; LLR - log-likelihood ratio

Tabulka 3 výše popisuje korelace mezi skupinou bichoriálních těhotenství a jednočetnou kontrolou.

V této skupině gestační stáří (GA) vykazuje negativní korelaci ve vztahu k jednočetným, protože se dvojčata rodily dříve než kontroly. Pro větší počet mužských plodů je zde vyjádřena pozitivní korelace (nMalef). Tato je ale dána pouze složením kohorty, na které jsme neměli vliv.

Tabulka 4: Korelace monochoriálních dvojčat s jednočetnými kontrolami. Evaluace provedena pomocí OPLS modelu a vícedimenzionální regrese.

Proměnná	OPLS, predictive component						Multiple regression			
	Variable importance	t-statistics		Component loading	t-statistics	R ²	Regression coefficient	t-statistics		
nMalef	0,623	3,67	**	0,049	2,46	0,338	*	0,008	0,94	
GA	1,8084	8,08	**	-0,133	-7,08	-0,923	**	-0,033	-4,83	**
Age	0,6093	3,75	**	-0,033	-3,24	-0,227	**	-0,011	-1,56	
PregC_A	1,2912	5,06	**	-0,097	-5,26	-0,682	**	-0,011	-1,60	
Preg20a_A	0,5746	3,82	**	0,047	3,32	0,333	**	0,010	1,41	
Preg20aC_A	1,301	7,98	**	-0,099	-7,04	-0,693	**	-0,013	-1,58	
Preg17C_A	1,0691	7,20	**	-0,088	-7,21	-0,618	**	-0,004	-0,58	
Preg16a_A	0,6378	2,23	*	0,048	2,21	0,334	*	0,010	0,78	
DHEAC_A	1,3221	6,62	**	-0,099	-7,56	-0,692	**	-0,014	-1,95	*
DHEA7o_A	0,6781	2,13	*	0,054	1,74	0,357		-0,002	-0,25	
AdiolC_A	0,8408	3,56	**	-0,062	-3,42	-0,436	**	-0,004	-0,42	
AT16aC_A	1,2496	6,07	**	-0,093	-6,75	-0,650	**	-0,008	-1,40	
Prog_A	0,6556	1,95	*	0,051	1,87	0,355		0,002	0,30	
Prog20a_A	0,905	3,49	**	0,074	3,54	0,517	**	0,004	0,38	
Prog17_A	0,5849	2,20	*	0,041	1,88	0,280		0,000	0,03	
Prog17a20a_A	0,5569	3,18	**	0,039	3,04	0,261	**	0,006	0,72	
Prog17a20aC_A	0,6793	2,40	*	-0,057	-2,81	-0,402	*	-0,010	-0,97	
T16aC_A	0,6412	2,34	*	-0,059	-2,96	-0,420	*	-0,003	-0,30	
EpiTC_A	0,7178	2,36	*	-0,057	-2,85	-0,400	*	-0,005	-0,58	
E2_RIA_A	0,6703	2,32	*	0,048	2,81	0,333	*	0,013	1,31	
E3C_A	0,5132	2,48	*	-0,038	-1,86	-0,271		-0,011	-1,70	
P5a_A	0,9654	3,11	**	0,071	2,92	0,484	*	0,000	-0,05	
P3a5a_A	0,9675	4,10	**	0,070	4,18	0,479	**	-0,002	-0,28	
P3a5aC_A	0,9503	5,21	**	0,069	4,14	0,479	**	0,003	0,43	
P3b5a_A	1,053	4,74	**	0,076	4,46	0,525	**	0,005	0,59	
P3b5aC_A	0,659	2,20	*	-0,050	-2,15	-0,360	*	-0,015	-1,78	
P5a20a_A	1,1382	5,94	**	0,086	6,90	0,593	**	0,001	0,18	
P3a5a20a_A	0,8986	3,04	**	0,064	2,97	0,444	*	0,011	1,32	
P3a5a20aC_A	0,9966	3,12	**	0,076	2,86	0,538	*	0,010	0,99	
P3b5a20a_A	1,2089	5,63	**	0,091	5,90	0,629	**	0,005	0,66	
P3a5b17a20aC_A	0,6882	3,96	**	-0,058	-4,04	-0,407	**	-0,018	-2,70	*
A5a_A	0,7161	3,40	**	-0,060	-3,19	-0,423	**	-0,021	-2,80	*
A3a5a_A	0,4988	2,20	*	-0,044	-2,52	-0,316	*	-0,016	-2,00	*
A3b5aC_A	1,1658	3,66	**	-0,087	-3,90	-0,617	**	-0,017	-3,90	**
A3a5bC_A	0,8307	2,39	*	-0,064	-2,50	-0,450	*	-0,009	-1,64	
A3a5a17bC_A	0,9871	3,19	**	0,062	2,72	0,434	*	0,019	2,07	*
A3a5b17bC_A	0,977	3,79	**	-0,077	-4,39	-0,542	**	-0,004	-0,49	
F_RIA_A	1,0213	2,90	*	-0,079	-3,49	-0,551	**	-0,012	-1,41	
F_A	0,6776	4,80	**	-0,051	-6,50	-0,350	**	-0,009	-2,06	*
DOCC_A	0,7903	1,92	*	-0,056	-1,81	-0,388		-0,010	-2,36	*
T11bC_A	1,529	10,94	**	-0,108	-10,33	-0,757	**	-0,023	-3,36	**
P3a5b11b21_A	1,3162	12,30	**	0,099	9,58	0,671	**	0,017	2,74	*
A3b5a11b_A	1,0392	4,68	**	0,075	3,93	0,486	**	-0,004	-0,73	
A3b5a11bC_A	0,7288	2,80	*	0,051	2,94	0,331	*	-0,005	-0,78	
A3a5b11bC_A	0,885	2,87	*	-0,061	-2,13	-0,427	*	-0,017	-1,77	
PregC_V	1,3442	5,53	**	-0,097	-5,70	-0,675	**	-0,013	-1,27	
Preg20a_V	0,7344	2,58	*	0,055	2,00	0,385	*	0,008	0,95	
Preg20aC_V	1,3307	8,00	**	-0,100	-7,62	-0,694	**	-0,011	-1,69	
Preg17C_V	0,9274	5,63	**	-0,073	-6,99	-0,506	**	-0,005	-0,59	
Preg16a_V	0,9592	3,90	**	0,067	3,36	0,486	**	0,003	0,38	
DHEAC_V	1,3577	5,26	**	-0,098	-6,22	-0,681	**	-0,018	-2,30	*
DHEA7o_V	0,6158	2,64	*	0,042	2,11	0,308	*	0,002	0,31	
AdiolC_V	1,0021	2,94	*	-0,074	-2,94	-0,515	*	-0,006	-0,43	
AT16aC_V	1,198	5,15	**	-0,086	-5,63	-0,594	**	-0,008	-1,28	

Relevant predictors (matrix X)

Prog20a_V	0,8906	3,23	**	0,066	3,11	0,472	**	0,005	0,73	
Prog17_V	0,7203	3,81	**	0,047	2,78	0,330	*	0,012	1,63	
T16aC_V	0,7466	2,51	*	-0,060	-2,80	-0,417	*	-0,002	-0,25	
EpiTC_V	0,7732	1,96	*	-0,053	-1,87	-0,371		-0,007	-0,63	
E2_RIA_V	1,0681	4,36	**	0,073	4,16	0,498	**	0,027	2,97	*
P5a_V	1,2572	4,28	**	0,087	3,67	0,632	**	0,004	0,58	
P3a5a_V	0,9501	2,85	*	0,063	2,58	0,470	*	-0,002	-0,50	
P3a5aC_V	0,8381	2,53	*	0,062	2,07	0,429	*	0,005	0,40	
P3b5a_V	1,1405	3,51	**	0,076	2,86	0,553	*	0,005	0,71	
P3b5aC_V	0,7569	2,80	*	-0,053	-1,90	-0,373	*	-0,017	-1,44	
P5b_V	0,8138	2,50	*	0,058	2,22	0,415	*	0,005	0,41	
P3a5b_V	0,678	2,26	*	0,048	2,46	0,365	*	-0,008	-1,33	
P5a20a_V	1,2771	6,29	**	0,089	6,35	0,646	**	0,005	1,05	
P3a5a20a_V	0,9188	5,38	**	0,064	5,84	0,460	**	0,009	1,81	
P3a5a20aC_V	0,7674	2,29	*	0,059	2,03	0,411	*	0,009	0,65	
P3b5a20a_V	1,1691	4,46	**	0,081	3,95	0,589	**	0,005	0,82	
P5b20aC_V	0,718	2,21	*	-0,049	-1,55	-0,342		-0,012	-0,97	
P3a5a17_V	0,7938	4,62	**	0,052	3,42	0,363	**	0,001	0,07	
A3a5a_V	0,416	2,11	*	-0,036	-2,49	-0,224	*	-0,022	-3,21	**
A3b5aC_V	1,3127	4,36	**	-0,092	-4,01	-0,640	**	-0,024	-2,78	*
A3a5b_V	0,5845	2,72	*	-0,047	-2,13	-0,318	*	-0,014	-1,50	
A3a5bC_V	0,8222	2,21	*	-0,056	-1,77	-0,391		-0,010	-0,94	
A3a5b17bC_V	0,8551	2,23	*	-0,063	-2,41	-0,434	*	-0,001	-0,12	
F_RIA_V	0,9009	2,54	*	-0,071	-3,00	-0,499	**	-0,023	-2,31	*
F_V	1,0734	3,67	**	-0,075	-3,82	-0,523	**	-0,025	-2,14	*
DOC_V	0,8305	2,01	*	0,060	1,92	0,419	*	0,023	2,17	*
T11bC_V	1,0511	4,19	**	-0,073	-3,15	-0,496	**	-0,007	-0,68	
P3a5b11b21_V	1,5192	8,70	**	0,107	6,56	0,728	**	0,022	4,12	**
A3b5a11b_V	1,1378	6,22	**	0,077	4,19	0,534	**	0,005	0,86	
A3a5b11bC_V	0,8113	2,69	*	-0,055	-2,07	-0,384	*	-0,011	-1,45	
Preg_M	1,6374	7,02	**	0,114	5,73	0,791	**	0,021	3,38	**
Preg20a_M	1,2298	3,15	**	0,094	3,51	0,656	**	0,035	3,32	**
Preg20aC_M	0,794	2,15	*	-0,051	-1,99	-0,356	*	0,004	0,50	
Preg16a_M	1,6533	5,57	**	0,124	5,87	0,860	**	0,022	3,82	**
DHEA7o_M	1,5096	5,73	**	0,107	5,10	0,745	**	0,027	4,69	**
DHEA7b_M	0,8729	2,14	*	0,068	2,22	0,473	*	0,017	1,54	
AT16a_M	0,8907	4,25	**	0,073	5,07	0,511	**	0,030	3,60	**
Prog_M	1,495	13,32	**	0,113	14,62	0,786	**	0,008	2,31	*
Prog20a_M	1,5798	16,74	**	0,117	13,06	0,814	**	0,013	4,87	**
Prog20aC_M	0,9656	3,57	**	0,077	3,59	0,537	**	0,016	3,20	**
Prog17_M	1,4347	8,43	**	0,103	8,87	0,719	**	0,012	2,06	*
Prog17a20a_M	1,5114	9,14	**	0,107	8,76	0,741	**	0,019	2,83	*
Prog16a_M	1,0171	2,60	*	0,079	2,79	0,548	*	0,019	2,05	*
A2_M	1,1048	3,19	**	0,078	3,15	0,545	**	0,010	1,00	
T_M	0,8785	3,40	**	0,062	3,11	0,427	**	0,001	0,06	
T16a_M	0,9466	2,92	*	0,073	3,64	0,506	**	0,014	2,68	*
E1C_M	0,8361	2,64	*	0,066	2,20	0,447	*	0,018	1,40	
E2_RIA_M	0,9628	3,53	**	0,072	3,30	0,500	**	0,006	1,36	
P5a_M	1,1029	5,51	**	0,079	5,31	0,549	**	-0,010	-5,09	**
P3a5a_M	0,9324	3,39	**	0,067	3,49	0,466	**	-0,014	-3,71	**
P3a5aC_M	0,8655	2,16	*	0,072	2,25	0,502	*	-0,001	-0,06	
P3b5a_M	1,3599	6,34	**	0,092	5,12	0,639	**	0,004	1,27	
P5b_M	0,971	5,51	**	0,064	5,37	0,442	**	0,003	0,39	
P3a5b_M	0,814	2,46	*	0,059	2,53	0,408	*	-0,013	-2,40	*
P3b5b_M	0,725	2,47	*	0,045	1,88	0,313		-0,005	-0,95	
P5a20a_M	1,3056	11,85	**	0,093	11,63	0,646	**	-0,002	-1,88	
P3a5a20a_M	1,2392	6,66	**	0,094	8,65	0,656	**	-0,003	-0,56	
P3b5a20a_M	1,5705	6,33	**	0,109	5,49	0,757	**	0,021	2,92	*
P5b20a_M	1,2578	5,76	**	0,082	4,51	0,571	**	0,010	1,07	
P3a5b20a_M	1,2265	6,61	**	0,089	5,06	0,618	**	0,008	1,48	
P3b5b20a_M	1,1666	4,02	**	0,075	3,57	0,523	**	0,024	3,27	**
P3a5a17_M	1,1635	7,05	**	0,082	6,54	0,568	**	0,000	0,01	
P3a5a17C_M	1,1765	6,75	**	0,085	6,47	0,593	**	0,000	-0,10	

P3a5b17_M	0,7627	5,39	**	0,054	5,35	0,373	**	-0,004	-0,55	
P3a5a17a20a_M	0,9343	3,78	**	0,063	3,16	0,436	**	-0,007	-1,09	
P3a5b17a20a_M	0,7894	3,59	**	0,056	4,10	0,389	**	0,004	0,70	
A3a5aC_M	0,571	1,92	*	0,043	2,34	0,300	*	0,017	2,03	*
A3b5a_M	1,0184	2,01	*	0,073	2,20	0,504	*	0,028	2,37	*
A3b5b17bC_M	0,2956	3,23	**	-0,026	-2,27	-0,182	*	-0,004	-0,50	
B_M	0,6755	2,01	*	0,057	2,37	0,393	*	0,002	0,19	
S_M	1,3842	12,07	**	0,097	8,82	0,675	**	0,022	4,41	**
DOC_M	1,3198	3,89	**	0,099	4,49	0,690	**	0,009	0,95	
A211b_M	0,9245	2,75	*	0,075	3,37	0,518	**	0,010	0,87	
T11b_M	0,8585	2,57	*	0,071	3,12	0,491	**	0,008	1,01	
P3a5b11b21_M	1,4876	10,76	**	0,107	13,25	0,722	**	0,011	2,32	*
A3a5a11b_M	0,8812	2,52	*	0,068	3,03	0,474	**	-0,003	-0,25	
A3b5a11b_M	1,4878	7,05	**	0,106	6,71	0,739	**	0,014	3,48	**
A3a5b11bC_M	1,1172	4,22	**	-0,075	-3,15	-0,518	**	-0,017	-2,77	*
DHT5a_A%V	0,8885	4,39	**	-0,062	-4,32	-0,439	**	-0,028	-5,03	**
P3a5a_A%V	0,5023	2,14	*	-0,036	-2,19	-0,258	*	-0,003	-0,37	
P3b5a_A%V	0,8003	3,86	**	-0,057	-3,51	-0,398	**	-0,012	-2,40	*
P5a20a_A%V	0,7538	4,58	**	-0,051	-3,90	-0,361	**	-0,010	-1,44	
P3b5a20a_A%V	0,424	2,51	*	-0,028	-2,02	-0,193	*	-0,009	-1,29	
P3a5a17_A%V	0,8557	3,47	**	-0,060	-2,80	-0,408	*	-0,009	-1,19	
A5a_A%V	0,6553	2,31	*	-0,056	-2,79	-0,395	*	-0,002	-0,28	
A3a5b_A%V	1,3195	8,19	**	0,094	6,47	0,652	**	0,025	9,04	**
A3b5b17bC_A%V	0,6682	3,40	**	0,047	2,39	0,331	*	0,008	0,69	
E_A%V	0,3279	2,43	*	-0,024	-2,75	-0,167	*	-0,005	-1,15	
DOCC_A%V	0,6665	2,51	*	-0,054	-2,01	-0,383	*	-0,022	-2,17	*
T11bC_A%V	0,7815	5,45	**	-0,056	-3,29	-0,416	**	-0,022	-3,41	**
P3a5b11b21_A%V	0,8	2,29	*	-0,051	-2,13	-0,349	*	-0,019	-2,05	*
A3b5a11b_A%V	0,7976	3,68	**	-0,054	-3,67	-0,368	**	-0,015	-2,85	*
Preg_V%M	1,0582	3,34	**	-0,075	-3,02	-0,527	**	-0,014	-1,21	
PregC_V%M	0,9473	3,36	**	-0,084	-3,91	-0,586	**	0,001	0,13	
Preg17C_V%M	0,949	2,31	*	-0,085	-2,76	-0,594	*	-0,008	-1,17	
DHEA7o_V%M	1,2822	2,42	*	-0,098	-2,71	-0,662	*	-0,030	-5,30	**
DHEA7b_V%M	1,1384	2,72	*	-0,086	-3,04	-0,573	**	-0,036	-3,93	**
AdiolC_V%M	0,9303	2,88	*	-0,074	-2,66	-0,517	*	-0,016	-2,05	*
AT16a_V%M	0,8099	2,85	*	-0,062	-2,28	-0,402	*	-0,031	-3,51	**
Prog_V%M	0,7072	2,29	*	-0,054	-1,95	-0,372	*	-0,012	-0,73	
Prog20a_V%M	0,9909	3,92	**	-0,073	-3,86	-0,521	**	-0,007	-0,85	
Prog20aC_V%M	1,1343	4,57	**	-0,090	-4,20	-0,624	**	-0,014	-1,81	
Prog17_V%M	0,9811	3,38	**	-0,077	-3,59	-0,549	**	-0,002	-0,24	
Prog17a20a_V%M	1,3164	4,94	**	-0,098	-5,13	-0,678	**	-0,011	-1,54	
A2_V%M	1,0065	2,73	*	-0,072	-2,51	-0,497	*	-0,019	-1,42	
TC_V%M	0,8415	2,64	*	-0,072	-2,88	-0,499	*	0,001	0,08	
T16a_V%M	0,8246	3,11	**	-0,064	-3,54	-0,451	**	-0,007	-1,07	
T16aC_V%M	0,8681	3,05	**	-0,072	-3,33	-0,504	**	0,003	0,29	
P3b5a_V%M	0,6504	3,28	**	-0,045	-2,79	-0,330	*	0,001	0,08	
P3b5aC_V%M	0,9707	3,98	**	-0,076	-4,01	-0,528	**	0,007	1,38	
P5b_V%M	0,8049	3,29	**	-0,051	-3,64	-0,383	**	-0,001	-0,16	
P3b5bC_V%M	0,9272	3,25	**	-0,073	-3,64	-0,511	**	0,006	0,93	
P5a20a_V%M	0,6895	6,67	**	-0,053	-10,01	-0,400	**	0,014	2,21	*
P5b20a_V%M	1,0198	2,62	*	-0,061	-2,40	-0,441	*	-0,016	-2,21	*
P3a5b20a_V%M	0,6548	2,43	*	-0,046	-2,00	-0,324	*	-0,010	-1,24	
P3b5b20a_V%M	0,8812	3,16	**	-0,061	-3,33	-0,415	**	-0,022	-2,51	*
P3a5a17_V%M	0,9208	3,75	**	-0,070	-2,91	-0,486	*	-0,001	-0,05	
P3a5a17C_V%M	0,8483	2,02	*	-0,063	-2,09	-0,442	*	0,001	0,08	
P3a5a17a20a_V%M	1,1025	4,78	**	-0,085	-4,08	-0,590	**	-0,008	-1,14	
P3a5b17a20a_V%M	1,1524	5,85	**	-0,089	-5,76	-0,619	**	-0,017	-2,19	*
A3a5a_V%M	0,7991	2,29	*	-0,059	-2,64	-0,423	*	-0,003	-0,34	
A3b5aC_V%M	0,9886	4,37	**	-0,076	-5,23	-0,532	**	-0,016	-2,82	*
F_V%M	0,7584	3,65	**	-0,059	-4,64	-0,410	**	-0,018	-2,19	*
E_V%M	0,8896	2,84	*	-0,064	-2,78	-0,444	*	-0,024	-2,46	*
B_V%M	0,6453	3,65	**	-0,057	-4,43	-0,399	**	-0,001	-0,12	
S_V%M	1,3223	3,84	**	-0,095	-3,90	-0,661	**	-0,018	-1,73	

	DOC_V%M	0,9319	3,90	**	-0,070	-3,61	-0,487	**	0,004	0,43	
	A211b_V%M	1,4643	8,09	**	-0,111	-9,48	-0,766	**	-0,024	-3,69	
	T11b_V%M	0,8407	3,26	**	-0,069	-3,61	-0,480	**	-0,008	-0,93	
	T11bC_V%M	0,8019	3,36	**	-0,063	-3,36	-0,423	**	0,001	0,16	
	A3a5a11b_V%M	1,2046	2,98	*	-0,092	-3,31	-0,623	**	-0,027	-3,67	
	A3a5b11bC_V%M	0,8758	2,95	*	0,060	2,27	0,416	*	0,014	1,49	
(matrix Y)	con_LL				-0,707	-50,90	-0,966	**			
	mo_bi_LL				0,707	50,90	0,966	**			
Explained variability							93,3% (79,4% after cross-validation)				

^aR...Korelační koeficient s prediktivní komponentou, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Zkratky: V - venózní krev, A - arteriální krev, M - mateřská krev, GA - gestační stáří; LLR - log-likelihood ratio

Tabulka 4 výše popisuje korelace mezi skupinou monochoriálních těhotenství a jednočetnou kontrolou.

Základní popis je obdobný jako pro skupinu bichoriálních dvojčat. Gestační stáří (GA) vykazuje výraznější negativní korelaci ve vztahu k jednočetným. Dvojčata se společnou placentou se dle doporučení rodí ještě dříve než bichoriální. Mužské plody jsou rovněž v pozitivní korelaci (nMalef). Významně zde vychází věk rodiček. Ten ovlivnit nelze, ale rozdíl mezi studijní a kontrolní skupinou je zde výraznější.

V této skupině je viditelný významný rozdíl ve skupině metabolitů popsané jako V%M. Jedná se o poměry mezi hladinami ve fetální venózní krvi a arteriální krvi matky. Ten je dán zejména přítomností jedné placenty a tím nižší koncentrací konvertovaných metabolitů směrem od placenty k plodu.

Tabulka 5: Korelace mezi skupinami monochoriálních a bichoriálních dvojčat. Evaluace provedena pomocí OPLS modelu a vícedimenzionální regrese.

Variable	OPLS, predictive component					Multiple regression				
	Variable importance	t-statistics	Component loading	t-statistics	R ²	Regression coefficient	t-statistics			
GA	1,8446	5,36	**	-0,182	-6,68	-0,685	**	-0,058	-3,63	**
Preg20aC_A	1,279	4,47	**	-0,137	-3,62	-0,498	**	-0,027	-3,26	**
Preg17C_A	0,7013	2,23	*	-0,083	-2,92	-0,291	*	0,001	0,11	
DHEAC_A	1,0338	2,56	*	-0,111	-2,58	-0,393	*	-0,011	-1,22	
DHEA7a_A	1,2029	4,15	**	-0,150	-4,27	-0,559	**	-0,022	-2,16	*
DHEA7b_A	0,7522	2,29	*	-0,108	-3,03	-0,409	**	-0,010	-1,09	
AT7a_A	1,0387	4,31	**	-0,116	-3,27	-0,438	**	-0,031	-3,96	**
AT16aC_A	1,4487	3,92	**	-0,133	-4,11	-0,488	**	-0,047	-3,16	**
T16a_A	0,8528	3,47	**	-0,098	-3,12	-0,363	**	-0,019	-1,22	
E3C_A	0,8017	3,06	**	-0,056	-1,71	-0,196		-0,026	-3,35	**
P3b5aC_A	0,8423	4,16	**	-0,087	-5,97	-0,295	**	0,003	0,35	
P3a5bC_A	0,9124	5,78	**	-0,084	-6,48	-0,286	**	-0,001	-0,27	
P3b5a20aC_A	0,9495	3,33	**	-0,095	-4,45	-0,341	**	-0,014	-1,07	
P3a5a17_A	0,943	3,59	**	-0,071	-1,93	-0,243	*	-0,022	-1,76	
P3a5b17C_A	1,1762	6,41	**	-0,115	-6,90	-0,406	**	-0,016	-1,86	
P3a5a17a20a_A	0,7075	5,66	**	-0,081	-5,63	-0,284	**	0,001	0,17	
P3a5b17a20a_A	1,005	4,49	**	-0,092	-3,79	-0,324	**	-0,020	-1,90	*
P3a5b17a20aC_A	1,5732	5,23	**	-0,153	-5,54	-0,551	**	-0,034	-2,99	*
A5a_A	0,9695	3,40	**	-0,105	-5,25	-0,373	**	-0,009	-0,83	
A3b5aC_A	1,124	2,66	*	-0,131	-3,18	-0,472	**	-0,009	-0,98	
A3a5bC_A	1,0148	3,33	**	-0,116	-3,25	-0,420	**	-0,012	-1,30	
A3a5b17bC_A	1,5729	4,67	**	-0,170	-4,64	-0,624	**	-0,036	-4,20	**
DOF_A	1,0754	6,39	**	-0,102	-4,52	-0,367	**	-0,023	-2,37	*
A211b_A	0,8964	3,38	**	-0,111	-4,61	-0,407	**	-0,013	-0,86	
T11b_A	0,8707	3,39	**	-0,102	-3,29	-0,376	**	-0,016	-1,16	
T11bC_A	1,2299	5,60	**	-0,139	-7,89	-0,528	**	-0,041	-3,10	**
A3a5a11b_A	1,0866	4,82	**	-0,131	-4,95	-0,471	**	-0,006	-0,37	
A3a5a11bC_A	0,9053	5,44	**	-0,092	-4,31	-0,321	**	-0,002	-0,23	
Preg20aC_V	1,0234	3,39	**	-0,111	-2,78	-0,419	*	-0,028	-2,90	*
Preg17C_V	0,7023	2,54	*	-0,080	-3,38	-0,302	**	-0,012	-1,49	
DHEA7a_V	0,8706	3,34	**	-0,117	-4,78	-0,441	**	-0,008	-0,51	
AT16aC_V	0,8743	3,36	**	-0,077	-2,71	-0,287	*	-0,036	-8,00	**
E2_RIA_V	1,0914	4,55	**	0,117	4,44	0,467	**	0,046	3,39	**
P3a5bC_V	0,5853	2,68	*	-0,058	-2,17	-0,221	*	0,006	0,47	
P3a5b17C_V	0,6652	4,64	**	-0,065	-3,34	-0,246	**	-0,002	-0,19	
A3b5aC_V	0,778	2,90	*	-0,091	-2,70	-0,340	*	-0,014	-2,43	*
A3a5b17bC_V	0,952	2,77	*	-0,105	-2,39	-0,397	*	-0,019	-2,50	*
F_V	0,8065	2,39	*	-0,106	-2,67	-0,400	*	-0,012	-0,77	
S_V	0,7483	2,52	*	0,104	3,77	0,392	**	0,039	3,57	**
A3a5a11b_V	0,8695	3,21	**	-0,091	-3,41	-0,347	**	-0,005	-0,35	
Preg17_M	1,0338	5,11	**	-0,100	-5,04	-0,378	**	-0,042	-4,55	**
Preg16a_M	0,7823	3,85	**	-0,086	-3,37	-0,329	**	-0,002	-0,19	
AT7a_M	0,8501	3,80	**	-0,087	-3,48	-0,327	**	-0,029	-4,23	**
Prog20aC_M	0,7579	2,20	*	-0,063	-1,59	-0,237		-0,014	-0,88	
Prog17a20aC_M	1,5059	6,35	**	-0,149	-7,19	-0,561	**	-0,028	-2,23	*
Prog16a_M	0,832	4,49	**	-0,086	-4,11	-0,329	**	-0,001	-0,08	
T16aC_M	1,3224	7,30	**	-0,139	-6,28	-0,524	**	-0,020	-1,64	
EpiTC_M	1,2788	8,32	**	-0,108	-13,11	-0,409	**	-0,026	-3,20	**
E3C_M	0,7702	3,46	**	-0,059	-3,20	-0,224	**	-0,016	-1,06	
P3a5bC_M	1,1763	4,64	**	-0,114	-4,35	-0,433	**	-0,018	-1,56	
P5a20aC_M	0,7642	3,04	**	-0,080	-2,14	-0,303	*	-0,010	-1,27	
P3a5a20a_M	0,9224	2,16	*	-0,078	-1,58	-0,293		-0,022	-1,86	
P3b5a20a_M	0,9357	5,52	**	-0,115	-5,38	-0,437	**	-0,024	-4,36	**
P5b20aC_M	0,9099	3,06	**	-0,095	-2,34	-0,359	*	-0,021	-2,14	*

Relevant predictors (matrix X)

P3a5b17C_M	1,3959	10,26	**	-0,136	-8,22	-0,518	**	-0,030	-5,99	**
P3a5b17a20aC_M	1,5034	4,76	**	-0,137	-5,32	-0,520	**	-0,043	-4,34	**
A3a5b17bC_M	1,5091	6,69	**	-0,151	-4,72	-0,570	**	-0,048	-7,52	**
S_M	0,8476	5,15	**	0,098	5,22	0,364	**	0,048	6,16	**
DOCC_M	0,7677	3,25	**	-0,082	-4,27	-0,309	**	-0,008	-0,66	
T11b_M	1,1833	3,12	**	-0,107	-2,35	-0,430	*	-0,029	-1,43	
T11bC_M	0,79	2,63	*	-0,067	-2,32	-0,285	*	-0,013	-1,34	
A3a5a11bC_M	0,9674	2,23	*	-0,118	-2,78	-0,449	*	-0,002	-0,08	
A3a5b11bC_M	0,9671	2,05	*	-0,096	-1,96	-0,363	*	-0,030	-2,37	*
Preg_A%V	0,602	3,82	**	-0,079	-4,00	-0,320	**	-0,035	-3,96	**
Preg20a_A%V	0,4968	2,76	*	-0,069	-3,11	-0,287	**	-0,036	-5,69	**
DHEA7o_A%V	0,7816	3,50	**	-0,107	-4,65	-0,421	**	-0,033	-2,97	*
Prog20a_A%V	1,0321	3,04	**	-0,127	-3,36	-0,488	**	-0,037	-3,74	**
T16a_A%V	0,6459	1,94	*	-0,089	-2,55	-0,358	*	-0,035	-2,12	*
DHT5a_A%V	0,6477	5,62	**	-0,079	-3,30	-0,317	**	-0,035	-4,23	**
E1_A%V	0,7725	2,55	*	0,067	1,98	0,246	*	0,028	2,15	*
P3b5a20a_A%V	0,6483	3,64	**	-0,091	-4,65	-0,361	**	-0,033	-2,78	*
P3a5a17_A%V	1,1356	3,12	**	-0,122	-2,83	-0,475	*	-0,055	-3,43	**
P3a5a17a20aC_A%V	0,9134	3,71	**	-0,103	-3,74	-0,380	**	-0,019	-3,07	**
A3a5b_A%V	0,7752	4,05	**	0,082	2,10	0,308	*	0,027	3,29	**
DOF_A%V	1,0019	3,47	**	-0,113	-3,68	-0,422	**	-0,025	-2,25	*
T11bC_A%V	0,6601	3,13	**	-0,078	-3,91	-0,291	**	-0,028	-3,96	**
P3a5b11b21_A%V	0,9934	2,43	*	-0,100	-1,96	-0,423	*	-0,056	-3,85	**
DHEA7o_V%M	0,8892	3,80	**	0,117	4,25	0,444	**	0,030	2,68	*
Prog17a20aC_V%M	1,1622	3,73	**	0,097	3,00	0,368	**	0,040	5,31	**
DHT5a_V%M	0,5697	3,73	**	-0,022	-1,17	-0,077		-0,043	-3,48	**
P3b5a_V%M	1,0889	3,57	**	0,150	3,48	0,565	**	0,027	2,20	*
P5a20a_V%M	0,8666	2,97	*	0,105	3,23	0,399	**	0,014	1,03	
P3a5a20a_V%M	0,8316	2,20	*	0,089	2,30	0,337	*	0,021	1,35	
P3b5a20a_V%M	1,1412	3,27	**	0,148	3,71	0,557	**	0,040	4,98	**
P3a5a17a20aC_V%M	0,7766	3,32	**	0,072	2,65	0,275	*	0,018	1,71	
P3a5b17a20aC_V%M	1,1332	3,41	**	0,109	3,09	0,413	**	0,040	1,98	*
A211b_V%M	1,1079	3,98	**	-0,116	-3,02	-0,435	**	-0,044	-2,95	*
T11b_V%M	0,6974	5,25	**	0,076	4,83	0,285	**	0,027	2,48	*
A3b5a11b_V%M	1,0797	4,39	**	0,139	4,60	0,511	**	0,045	5,97	**
A3b5a11bC_V%M	1,0512	3,69	**	0,092	3,17	0,342	**	0,032	2,79	*
(matrix Y) bi_bi_LL				-0,707	-36,40	-0,887	**			
mo_bi_LL				0,707	36,40	0,887	**			

Explained variability

78,6% (69,9% after cross-validation)

^aR... Component loadings expressed as a correlation coefficients with predictive component, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

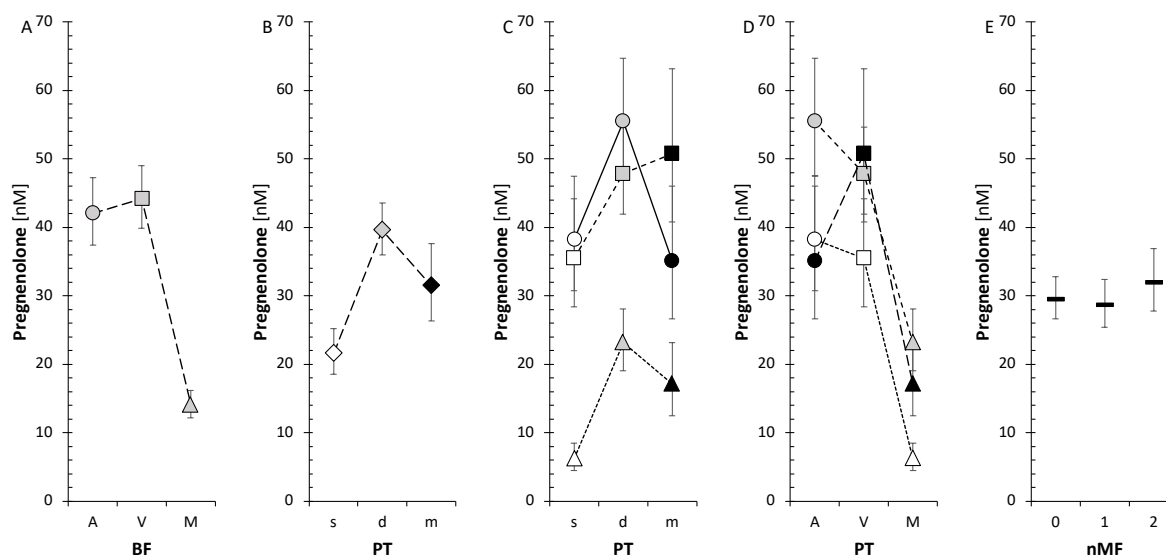
Zkratky: V - venózní krev, A - arteriální krev, M - mateřská krev, GA - gestační stáří; LLR - log-likelihood ratio

V Tabulce 5 popisujeme korelace mezi jednotlivými studijními skupinami. Negativní korelace je vyjádřena směrem k monochoriálním dvojčatům.

Tato analýza poukazuje na rozdíl mezi těhotenstvími s jednou a dvěma placentami. Počet plodů je přitom totožný. Více placent (u bichoriálních) se projevují vyšší enzymatickou aktivitou a následným rozdílem ve steroidním metabolomu.

V druhé části výsledků nabízíme podrobnější analýzu u některých významných metabolitů. Přiložené grafy jasněji ukazují rozdíly vyplývající z rozdílného množství placent, plodů, enzymatické placentární aktivity a arterio-venózní diferenciace.

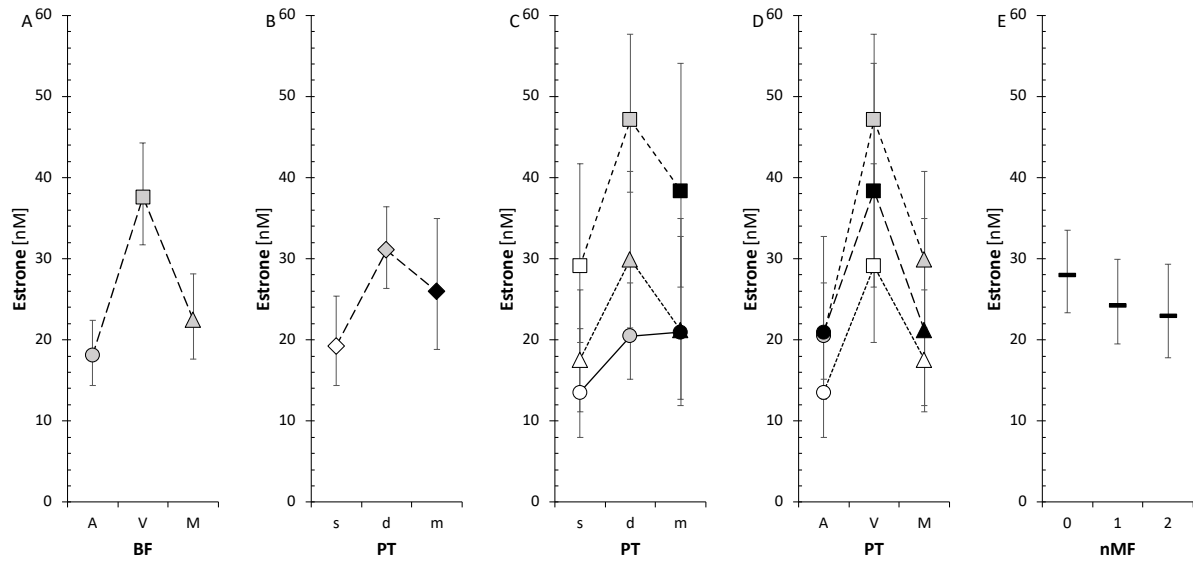
Tabulka 6: Podrobná analýza pregnenolonu



BF: $F=80$, $p<0.001$, $\eta^2=0,51$; PT: $F=17,5$, $p<0.001$, $\eta^2=0,185$; BF \times PT: $F=6,1$, $p<0.001$, $\eta^2=0,137$; nMF: $F=0,5$, $p=0,591$, $\eta^2=0,0068$;
GA: $F=0,1$, $p=0,779$, $\eta^2=0,000514$;
, $M<V$, $M<A$, $d>s$, $m>s$, $Ad>Ac$, $Am<Ad$, $Md>Ms$, $Mm>Ms$, $Ms<Vs$, $Md<Vd$, $Mm<Vm$, $Ms<As$, $Md<Ad$, $Mm<Am$
BF=body fluid, A=umbilical artery, V=umbilical vein, M=maternal venous blood, PT=pregnancy type, s=singleton pregnancy, d=twin diamniotic-dichorionic pregnancy, m=twin diamniotic-monochorionic pregnancy; M=male gender, F=female gender, nMF=number of male fetuses

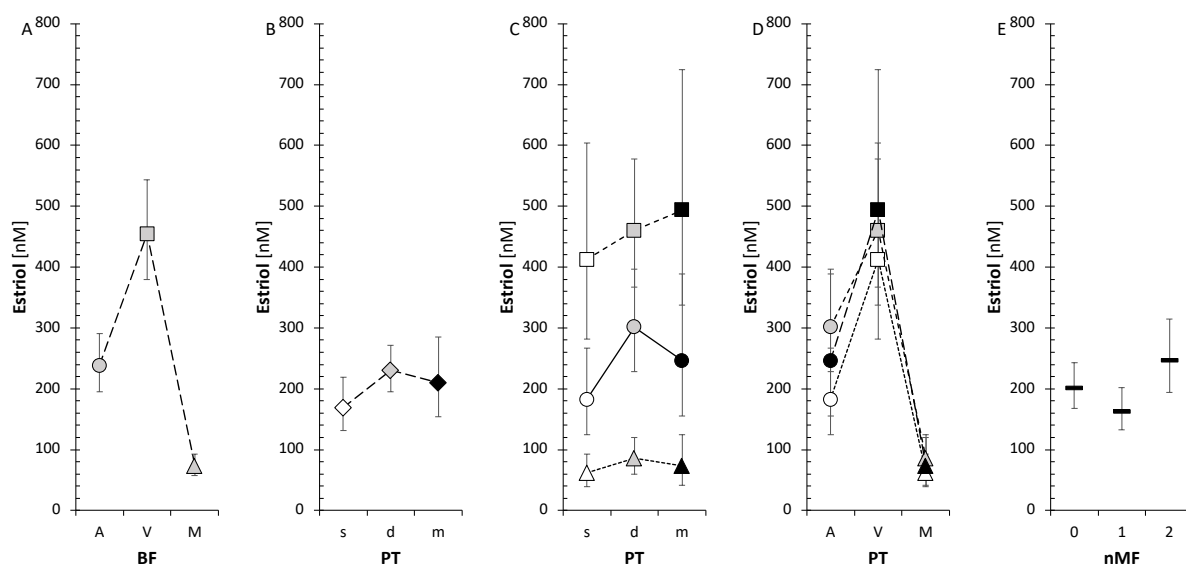
Graf v tabulce 6 popisuje hladiny pregnenolonu, který je fetálního původu. Rozdíl v hladinách u plodu a v mateřské cirkulaci je velmi významný (BF). Dále je patrný statisticky významný rozdíl mezi jednočetným a vícečetným těhotenstvím. Ačkoliv statisticky nevýznamný, pozorujeme rozdíl v hladinách mezi bichoriálním a monochoriálním těhotenstvím. Tento fakt je daný přítomností jedné placenty oproti dvěma. Ta je ale relativně větší než placenta kontrolní skupiny. Poslední část grafu vyjadřuje vztah k počtu mužských plodů. Nejedná se o steroid, který je závislý na pohlaví plodu, proto zde není statisticky významný rozdíl.

Tabulka 7A: Podrobná analýza estronu



BF: $F=11,9$, $p<0,001$, $\eta p^2=0,133$; PT: $F=3,5$, $p=0,033$, $\eta p^2=0,0429$; BF \times PT: $F=0,2$, $p=0,932$, $\eta p^2=0,0054$; nMF: $F=0,7$, $p=0,511$, $\eta p^2=0,00863$; GA: $F=0,1$, $p=0,805$, $\eta p^2=0,000393$;
 , $V>A$, $M<V$, $d>s$, $Vd>Ad$
 BF=body fluid, A=umbilical artery, V=umbilical vein, M=maternal venous blood, PT=pregnancy type, s=singleton pregnancy, d=twin diamniotic-dichorionic pregnancy, m=twin diamniotic-monochorionic pregnancy; M=male gender, F=female gender, nMF=number of male fetuses

Tabulka 7B: Podrobná analýza estriolu



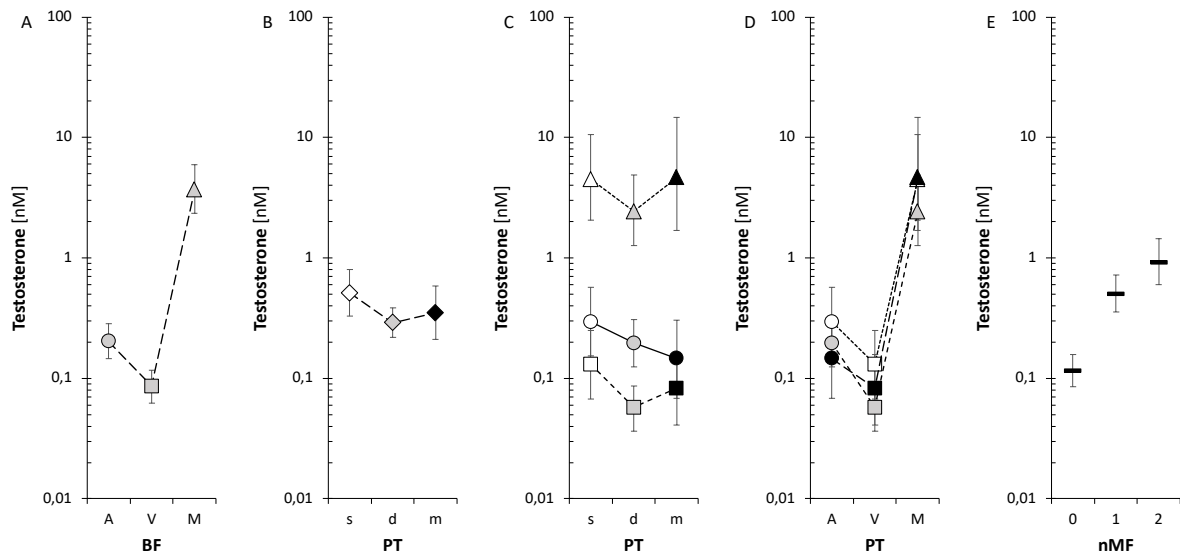
BF: $F=60,2$, $p<0,001$, $\eta^2=0,439$; PT: $F=1,5$, $p=0,234$, $\eta^2=0,0187$; BF \times PT: $F=0,4$, $p=0,832$, $\eta^2=0,00944$; nMF: $F=2,4$, $p=0,095$, $\eta^2=0,0302$; GA: $F=0$, $p=0,919$, $\eta^2=0,0000677$;

, $V>A$, $M<V$, $M<A$, $V_c>A_c$, $M_s<V_s$, $M_d<V_d$, $M_m<V_m$, $M_s<A_s$, $M_d<A_d$, $M_m<A_m$

BF=body fluid, A=umbilical artery, V=umbilical vein, M=maternal venous blood, PT=pregnancy type, s=singleton pregnancy, d=twin diamniotic-dichorionic pregnancy, m=twin diamniotic-monochorionic pregnancy; M=male gender, F=female gender, nMF=number of male fetuses

Některé publikované práce (Kuijper et al., 2015) v minulosti prokázaly vyšší hladiny estronu a estriolu v mateřském séru u vícečetného těhotenství (Tabulky 7A, 7B). Pro pupečnickovou krev se nám ale výsledky předchozí studie zopakovat výsledky nepovedlo.

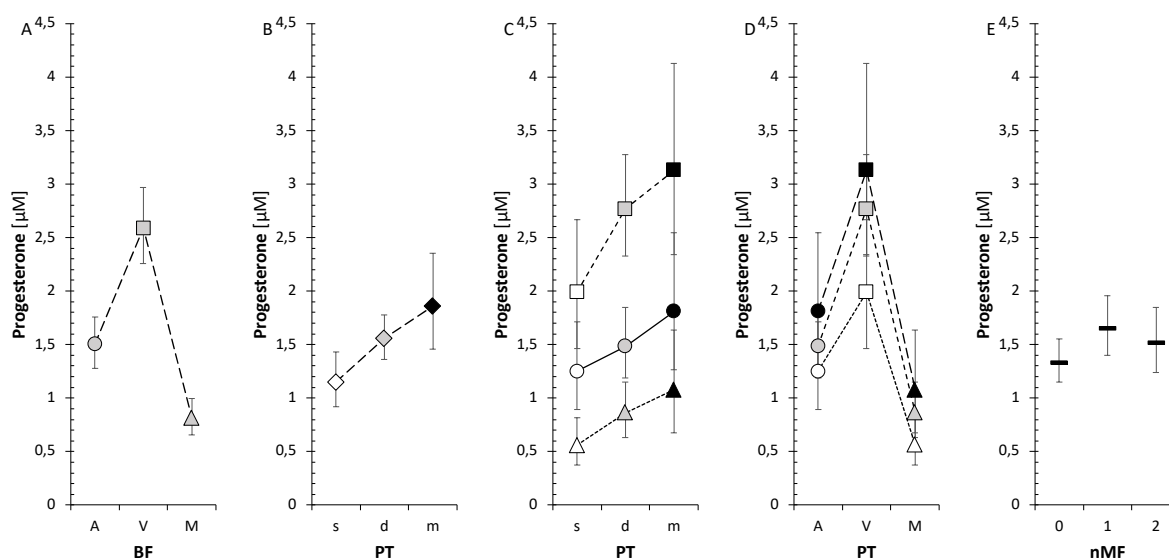
Tabulka 8: Podrobná analýza testosteronu



BF: $F=83,6$, $p<0,001$, $\eta^2=0,519$; PT: $F=1,8$, $p=0,168$, $\eta^2=0,0228$; BF \times PT: $F=0,5$, $p=0,735$, $\eta^2=0,0128$; nMF: $F=26$, $p<0,001$, $\eta^2=0,251$; GA: $F=0,1$, $p=0,726$, $\eta^2=0,000793$;
 , $V<A$, $M>V$, $M>A$, $Vd<Ad$, $Ms>Vs$, $Md>Vd$, $Mm>Vm$, $Ms>As$, $Md>Ad$, $Mm>Am$, $M1>M0$, $M2>M0$
 BF=body fluid, A=umbilical artery, V=umbilical vein, M=maternal venous blood, PT=pregnancy type, s=singleton pregnancy, d=twin diamniotic-dichorionic pregnancy, m=twin diamniotic-monochorionic pregnancy; M=male gender, F=female gender, nMF=number of male fetuses

Některé ze steroidních hormonů jsou závislé na pohlaví plodu. V případech, kdy je plod mužský, lze pozorovat statisticky významný nárůst hladin testosteronu v mateřské krvi. Důvodem je steroidogeneze v testes plodu. V poslední části grafu v tabulce (nMF) je patrné, že rozdíl je tím významnější, čím je vyšší počet mužských plodů. Množství testosteronu nebylo závislé na typu těhotenství, co tuto teorii podporuje.

Tabulka 8: Podrobná analýza progesteronu



BF: $F=36,6$, $p<0,001$, $\eta^2=0,321$; PT: $F=2,7$, $p=0,069$, $\eta^2=0,0338$; BF \times PT: $F=0,2$, $p=0,96$, $\eta^2=0,00401$; nMF: $F=1,3$, $p=0,274$, $\eta^2=0,0165$; GA: $F=1,3$, $p=0,262$, $\eta^2=0,00812$;

, $V>A$, $M<V$, $M<A$, $m>s$, $Vd>Ad$, $Ms<Vs$, $Md<Vd$, $Mm<Vm$, $Ms<As$, $Md<Ad$

BF=body fluid, A=umbilical artery, V=umbilical vein, M=maternal venous blood, PT=pregnancy type, s=singleton pregnancy, d=twin diamniotic-dichorionic pregnancy, m=twin diamniotic-monochorionic pregnancy; M=male gender, F=female gender, nMF=number of male fetuses

U progesteronu, jako u jednoho z nejdůležitějších steroidních hormonů, není statisticky významný rozdíl v hladinách mezi bichoriálním a monochoriálním těhotenstvím. Rozdíl je významný mezi jednočetným a vícečetným těhotenstvím. Důvodem je taktéž přítomnost dvou plodů (dva původci prekurzorů) a dvou, resp. jedné objemově větší placenty. Statistický význam má i arterio-venózní rozdíl – venózní krev z placenty má hladiny pochopitelně výrazně vyšší. Mezipohlavní rozdíly v tomto případě nepozorujeme.

7 DISKUSE

Vzhledem k významné roli placenty v metabolismu steroidů jsme považovali za nezbytné rozlišovat mezi arteriální a venózní krví plodu. Naše studie proto analyzovala tyto krevní vzorky odděleně. Takto podrobná analýza na takto velkém souboru metabolitů dosud nikdy nebyla popsána.

Steroidogeneze a transport steroidů ve fetoplacentární jednotce jsou podrobně popsány v dostupné literatuře (Pasqualini, Chetrite, 2016, Pašková, 2013). Podrobnějším zkoumáním výsledků vidíme, že nekonjugované C21 Δ^5 steroidy a většina jejich nekonjugovaných Δ^4 a $5\alpha/\beta$ -redukovaných metabolitů, podobně jako $5\alpha/\beta$ -redukovaných steroidů a estradiolu, vykazují vyšší pozitivní korelaci v pupečnickové venózní a arteriální krvi dvojčat a zejména v krvi jejich matek. Důvodem tohoto pozorování je to, že bichoriální biamniální dvojčata mají dvě fetální nadledviny a dvě placenty. Podobný efekt je patrný u monochoriálních dvojčat. Rozdíl je zde v enzymatické aktivitě jedné placenty.

Fetální nadledvina je primární zdroj C21 Δ^5 steroidů v těhotenství, zatímco placentární steroidsulfatáza pro C21 Δ^4 steroidy. V placentě dochází k hydrolýze sulfátů C21 Δ^5 steroidů fetálního původu na jejich nekonjugované metabolity a poté pomocí HSD3B1 ke konverzi na jejich Δ^4 metabolity. Hlavním produktem těchto pochodů je progesteron. Současně placenta konvertuje cholesterol a cholesterolsulfát (mateřského původu) na pregnenolon, který je následně přeměňován na progesteron. Kromě toho je cholesterol a jeho sulfát fetálního původu konvertován na pregnenolon a znovu na progesteron. Ten je následně v placentě, mateřském a fetálním kompartmentu metabolizován na C21 5α redukované metabolity a ve fetálních játrech na C21 5β redukované metabolity. Tento rozdíl je daný absencí aktivity 5β -reduktázy v placentě (na rozdíl od 5α -reduktázy).

Z C21 Δ^5 steroidů je rozdíl nejvíce vyjádřen u 16α -hydroxypregnenolonu, vzhledem k vysoké aktivitě 16α -hydroxylázy CYP3A7 ve fetálních játrech.

Menší rozdíl byl pozorován u 20α -dihydrometabolitů C21 steroidů v pupečnickové krvi. Tento byl ovlivněn tendencí k jejich konverzi na 20 -oxo analoga ve směru placenta-

plod. Více je vyjádřen rozdíl v mateřské krvi z důvodu opačné tendence ve směru placenta-matka. Tento fenomén jsme popsali v jedné z dřívějších prací (Pašková, 2013).

V rámci analýzy testosteronu se hladiny mezi jednočetným a vícečetným těhotenstvím významně neliší. Tyto data jsou v souladu se studií Houghtona (Houghton et al., 2019). Obdobně nevidíme rozdíly ani pro androstendion. Pro estradiol jsme, stejně jako autoři popisované studie, pozorovali vyšší hladiny v mateřském séru, ale současně jsme tento rozdíl viděli i v pupečnickové venózní krvi. Pro estron a estriol v mateřském séru se naše výsledky shodují s prací Kuijpera. Tito popisují vyšší hladiny v mateřské krvi u vícečetných těhotenství v porovnání s jednočetnými (Kuijper et al., 2015). Výsledky z pupečnickové krve se s předchozí studií neshodují.

Hlavní důvod absence rozdílů v pupečnickové krvi u 17-hydroxymetabolitů C21 steroidů může souviset se zanedbatelnou aktivitou CYP17A1 v placentě v porovnání s plody a matkou, efekt 2 placent zde není přítomný. U matek dvojčat jsou rozdíly pozorovatelné nejvíc – dochází k aditivnímu efektu za přispění obou plodů.

Pro mnohé volné androgeny, estrogy, 11-deoxykortikoidy a 11 β -hydroxyandrogeny a kortikosteron pozorujeme jasný trend směrem k vyšším hladinám u dvojčat a zejména u jejich matek.

U bichoriálních dvojčat mají nekonjugované steroidy na rozdíl od konjugovaných tendenci ke zvýšeným hladinám u dvojčat a zejména u jejich matek. Tento fenomén může být vysvětlen efektem dvou placent a tím celkově vyšší aktivitou placentární sulfatázy. Tato aktivita vede k nižším hladinám konjugovaných steroidů ale jejich zvýšení jejich volných analogů u vícečetných těhotenství. Popisovaný trend je zdůrazněn nejen pro C21 Δ^5 steroid pregnenolon sulfát, ale také pro C19 Δ^5 steroid DHEA sulfát. V některých případech se projevuje i u jiných konjugátů steroidů.

Závěry OPLS analýzy ukazují efektivní selektivitu mezi jednočetným a vícečetným těhotenstvím u arteriální pupečnickové krve (senzitivita = 0.962(0.888-1, jako průměr s 95% konfidenčním intervalem), specificita = 1(1-1)), dobrou selektivitu pro venózní pupečnickovou krev (senzitivita = 0.943(0.866-1), specificita = 0.8(0.598-1)) a absolutní selektivitu pro mateřskou krev (senzitivita = 1(1-1), specificita = 1(1-1)). Výsledky ukazují, že celkové zdvojení efektu fetální a placentární tkáně je nejvíce patrné v mateřské krvi, i když některé

ze steroidů jsou v mateřské krvi se signifikantně nižší hladinou v porovnání s pupečnickovou krví.

Rozdílné hladiny steroidů (často bioaktivních) v jednočetném a vícečetném těhotenství ovlivňují celou řadu fyziologických a patofyziologických procesů. Steroidy působí na množství iontových receptorů a receptorů v jádře buňky. Mohou pozitivně či negativně ovlivňovat aktivitu detoxikačních enzymů (Honcu et al., 2019) a tím ovlivňovat množství těhotenských patologií, jako například intrahepatální cholestázu v těhotenství (Pařízek et al., 2016), gestační diabetes (Shin et al., 2021), preeklampsii (Luisi et al., 2000, Parker et al., 1979, Berkane et al., 2017), fetální růstovou restrikci (Baud, Berkane, 2019), akutní hypoxii plodu (Hirst et al., 2006, Hirst et al., 2008, Hirst et al., 2014) a postpartální depresi (McEvoy et al., 2018). Souvislost mezi depresí a hladinami allopregnanolonu pozorujeme ve třetím trimestru a později (Deligiannidis et al., 2016), u změn transmise a percepce bolesti (Todorovic et al., 2004, Honcu et al., 2019), poruchou délky těhotenství (Pašková, 2013), změnou v imunitní odpovědi (Honcu et al., 2019, Solano, Arck, 2019) a pravděpodobně také v programování individuálního vývoje dětství a dospělosti (Vo, Hardy, 2012).

V souvislosti s rozdílem v pohlaví naše výsledky ukazují zvýšení hladiny testosteronu, 5 α -dihydrotestosteronu a 5-androsten-3 β , 16 α , 17 β -triol sulfátu. Ten je metabolitem jednoho z prekurzorů testosteronu androstendiolu. Současně jsme pozorovali snížení hladin jiného prekurzoru testosteronu androstendionu v arteriální a venózní pupečnickové krvi. Tyto mohou souviset se steroidogenezí v testes mužských plodů. Literární zdroje poukazují na nezávislost mezi steroidy v mateřské krvi a pohlavím plodu (Cohen-Bendahan et al., 2005). Interpretace snížených hladin ostatních steroidů v pupečnickové krvi mužských plodů a signifikantní rozdíly v mateřské krvi zůstávají předmětem diskuse budoucích studií.

Při zaměření se na rozdíly mezi analyty v rozličných tělních tekutinách jsme prokázali méně patrné rozdíly mezi arteriální a venózní krví. Velmi významné rozdíly jsme ale pozorovali mezi pupečnickovou venózní a mateřskou krví. Tyto jsou v souladu s našimi předchozími výzkumy.

Steroidní metabolom je velmi úzce spjat s časováním porodu. V naší kohortě jsme rozdíly spjaté se změnami v souvislosti s nástupem porodu nepopisovali. Důvodem bylo

plánování císařského řezu u všech těhotných. Tak mohou být vysvětleny také některé z negativních korelací hladin steroidů s gestačním stářím. Gestační stáří bylo v našem modelu zahrnuto jako jedna z proměnných. Většina porodů císařským řezem se plánuje před vypočítaným termínem porodu. Stejně výsledky byly pozorovány v kontrolní skupině (47 plodů).

Jelikož jsme z kohorty vyloučili všechny ženy s faktory, které mohly ovlivnit výsledky, naše data nejsou asociované s těhotenskými patologiemi. Tyto rovněž zůstávají předmětem zaměření budoucích prací.

Limitace studie

Práce byla limitována faktory, které zde zmiňujeme. Jedním z nich byla relativně široká variabilita gestačního stáří v době porodu v rámci skupiny a mezi skupinami navzájem. Tato byla výrazně ovlivněna doporučením České gynekologicko-porodnické společnosti.

V některých případech menších plodů jsme byli omezeni objemem vzorku krve – pupečnickové cévy u těchto plodů jsou významně křehčí. Ke srážení krve v nich dochází prakticky okamžitě po oddělení plodu od placenty. Pro správnou analýzu jsou potřeba alespoň 3 ml arteriální, resp. venózní krve. Odebrání tohoto objemu je v těchto případech technicky velmi obtížné.

V případech, kdy dojde k rozdělení embrya časně po splynutí spermie s vajíčkem, vznikne monozygotické bichoriální biamniální těhotenství. Tyto plody jsou v průběhu těhotenství považována za oddělené jednotky, ale mají identickou genetickou výbavu. Podíl genetických vlivů, zejména enzymatické aktivity, proto můžeme hodnotit pouze teoreticky.

8 ZÁVĚR

Tato disertační práce se soustředila na popis steroidního metabolomu u vícečetného těhotenství (dvojčata).

Záměrem práce bylo odpovědět na vyslovenou hypotézu a splnit stanovené cíle. Pomocí použitých metod a analýzou získaných výsledků jsme jednoznačně **potvrdili** vyslovenou hypotézu. Přítomnost dvou plodů jednoho těhotenství, resp. dvou placent v případě bichoriálního těhotenství **se projeví** na hladinách steroidů.

Dílčí cíle práce byly:

1. *podrobně popsat korelace mezi komponenty steroidního metabolomu u dvojčat:*

Korelace mezi komponenty steroidního metabolomu jsme popsali. Pro jednotlivé skupiny (bichoriální, monochoriální, jednočetné kontroly) jsme vytvořili řadu pozitivních a negativních korelací, které popisují vztahy mezi nimi a kontrolami a mezi studijními skupinami navzájem.

2. *nastínit rozdíl mezi vícečetným a jednočetným těhotenstvím:*

Tento cíl se nám splnit povedlo. Zásadním rozdílem mezi studijní a kontrolní skupinou je přítomnost dvou plodů jako původců prekursorů. Zároveň je v případech vícečetných těhotenství výrazně zvýšena enzymatická aktivita v případě dvou oddělených (bichoriální) nebo jedné, obvykle větší (monochoriální), placenty.

3. *určit, zda existují rozdíly v metabolismu steroidů mezi dvojčaty různé chorionicity (tedy rozdíl v případě „společné“ a „oddělené“ placenty):*

Pro tento případ jsme sestavili model porovnávající monochoriální a bichoriální těhotenství. Počet původců prekursorů (plodů) je v tomto případě stejný a proto předpokládáme, že podkladem pro přítomné rozdíly v metabolomu je odlišný počet placent.

4. *popsat, zda existuje rozdíl v arterio-venózní diferenciaci mezi vzorky u vícečetného těhotenství:*

Pro tzv. arterio-venózní diferenciaci jsme prokázali méně patrné rozdíly mezi arteriální a venózní krví. Velmi významné rozdíly jsme pozorovali mezi pupečnickovou venózní a mateřskou krví. Tyto poznatky jsou ale v souladu se závěry předchozích výzkumů členů našeho týmu. Podle zjištění má význam rozlišovat mezi arteriální a venózní pupečnickovou krví.

5. *popsat mezipohlavní rozdíly v metabolomu, jelikož konverze prekurzorů u jednotlivých pohlaví je rozdílná:*

Mezipohlavní rozdíly jsou pozorovatelné zejména v těch případech, ve kterých jsou plody mužského pohlaví. Tento efekt má souvislost se steroidogenezí v testes mužských plodů. U ostatních hormonů nepozorujeme významnou závislost na pohlaví.

Tato práce poukazuje na možnost dalšího studia vícečetného těhotenství. Následujícím krokem by měla být analýza steroidního metabolomu u vícečetných těhotenství se spontánním začátkem porodu, dále s patologiemi jako například preeklampsie nebo s příznaky předčasného porodu. K pochopení patofyziologie zmíněných patologií by mohla pomoci analýza založená na naší studii.

9 SHRNU TÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE

Výsledky prezentované v této práci přinesly unikátní zobrazení steroidního metabolomu u vícečetného těhotenství. Sledovali jsme hladiny steroidů v období porodu u bichoriálních a monochoriálních dvojčat u plodů a matek. Změny hladin u vícečetných v porovnání s jednočetným těhotenstvím jasně poukazují na metabolický význam přítomnosti dvou plodů a 2 placent. Další studium vztahu matky a plodů vícečetného těhotenství by vedlo k pochopení patofyziologie těhotenských komplikací.

10 ZDROJE

Adamcová K, Kolátorová L, Škodová T et al. Steroid hormone levels in the peripartum period – differences caused by fetal sex and delivery type. *Physiol Res*. 2018 Nov 28;67(Suppl 3):S489-S497.

Anker JJ, Carroll ME. The role of progestins in the behavioral effects of cocaine and other drugs of abuse: human and animal research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Nov;35(2):315-33.

Ashwal E, Berger H, Hirsch L, et al. Gestational diabetes and fetal growth in twin compared with singleton pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2021; 225:420.e1.

Bader D, Riskin A, Vafsi O et al. Alpha-fetoprotein in the early neonatal period—a large study and review of the literature. *Clin Chim Acta*, 349 (2004), pp. 15-23).

Bamberg C, Hecher K. Update on twin-to-twin transfusion syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019 Jul;58:55-65.

Baud O, Berkane N. Hormonal Changes Associated With Intra-Uterine Growth Restriction: Impact on the Developing Brain and Future Neurodevelopment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Mar 26;10:179.

Belelli D, Hogenkamp D, Gee KW et al. Realising the therapeutic potential of neuroactive steroid modulators of the GABA_A receptor. *Neurobiol Stress*. 2019 Dec 23;12:100207.

Berkane N, Liere P, Oudinet JP et al. From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens. *Endocr Rev*. 2017 Apr 1;38(2):123-144.

Berveiller P, Rousseau A, Rousseau M et al. Risk of preterm birth in a twin pregnancy after an early-term birth in the preceding singleton pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG*. 2020 Apr;127(5):591-598.

Blikstein, L.G. Keith. On the possible cause of monozygotic twinning: lessons from the 9-banded armadillo and from assisted reproduction. *Twins Res Hum Genet*, 10 (2007), pp. 394-399.

Blondel B, Kogan MD, Alexander GR et al. The impact of the increasing number of multiple births on the rates of preterm birth and low birthweight: an international study. *Am J Public Health*. 2002 Aug;92(8):1323-30.

Bricker L. Multiple pregnancy: pathology and epidemiology. In: Kumar B, Alfirevic Z, eds. *Fetal Medicine*. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Advanced Skills. Cambridge: Cambridge University Press; 2016:297-301.

Buhling KJ, Henrich W, Starr E, et al. Risk for gestational diabetes and hypertension for women with twin pregnancy compared to singleton pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 269:33.

Bulun SE. Aromatase and estrogen receptor alpha deficiency. *Fertil Steril*, 101 (2014), pp. 323-329.

Campbell DM, Templeton A. Maternal complications of twin pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 84:71.

Canpolat FE, Yurdakok M: Birthweight discordance in twins and the risk of being heavier for respiratory distress syndrome. *Twin Res Hum Genet* 2006; 9: 659–63.

Cohen-Bendahan CC, van Goozen SH, Buitelaar JK et al. Maternal serum steroid levels are unrelated to fetal sex: a study in twin pregnancies. *Twin Res Hum Genet*. 2005 Apr;8(2):173-7.

Collins J. Global epidemiology of multiple birth. *Reprod Biomed Online*. 2007;15 Suppl 3:45-52.

Corner GW. The observed embryology of human single-ovum twins and other multiple births. *Am J Obstet Gynecol*, 70 (1955), pp. 933-951.

Coutinho Nunes F, Domingues AP, Vide Tavares M et al. Monochorionic versus dichorionic twins: are obstetric outcomes always different? *J Obstet Gynaecol (Lahore)*, 36 (5) (2016 Jul 3), pp. 598-601.

Černý, A.; Hill, M.; Vosátková, M.; Laštůvka, Z.; Pařízek, A. Steroid Metabolome Analysis in Dichorionic Diamniotic Twin Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1591.

D'Addario V., Rossi C. Diagnosis of chorionicity: The role of ultrasound. *Diagn Prenat.* 2014;25(2):58-64.

Deligiannidis KM, Kroll-Desrosiers AR, Mo S et al. Peripartum neuroactive steroid and γ -aminobutyric acid profiles in women at-risk for postpartum depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Aug;70:98-107.

Doporučený postup České gynekologicko-porodnické společnosti. Vedení porodu vícečetného těhotenství. [online] Dostupné z: <https://www.lekaridnes.cz/wp-content/uploads/2016/08/p-2013-vedeni-porodu-vicecetneho-tehotenstvi.pdf>

Doporučený postup České gynekologicko-porodnické společnosti. Prenatální péče o vícečetná těhotenství. [online] Dostupné z: <https://www.lekaridnes.cz/wp-content/uploads/2016/08/p-2013-prenatalni-pece-o-vicecetna-tehotenstvi.pdf>

Dudenhausen JW, Maier RF. Perinatal problems in multiple births. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Sep;107(38):663-8.

Dušková M, Kolátorová L, Šimková M et al. Steroid diagnostics of 21st century in the light of their new roles and analytical tools. *Physiol Res*. 2020 Sep 30;69(Suppl 2):S193-S203.

Ellis, MJ., Livesey, JH., Inder, WJ et al. Plasma corticotropin-releasing hormone and unconjugated estriol in human pregnancy: gestational patterns and ability to predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186: 94-99.

Fellman J, Eriksson AW. On the history of Hellin's law. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Apr;12(2):183-90.

Fluck CE, Pandey AV. Steroidogenesis of the testis—new genes and pathways. *Ann Endocrinol (Paris)*, 75 (2014), pp. 40-47.

Gonzalez MC, Reyes H, Arrese M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol* 1989; 9:84.

Good clinical practice network. Studie brexanolonu pro akutní syndrom respirační tísně v důsledku covid-19. [online] Dostupné z: <https://ichgcp.net/cs/clinical-trials-registry/NCT04537806>

Goto M, Brickwood S, Wilson DI et al. Hanley. Steroidogenic enzyme expression within the adrenal cortex during early human gestation. *Endocr Res*, 28 (2002), pp. 641-645.

Goto M, Piper Hanley K, Marcos J et al. Postle, et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest*, 116 (2006), pp. 953-960.

Grammatopoulos D, Thompson S, Hillhouse EW. The human myometrium expresses multiple isoforms of the corticotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2388–93.

Hanley NA, Arlt W. The human fetal adrenal cortex and the window of sexual differentiation. *Trends Endocrinol Metab*, 17 (2006), pp. 391-397.

Haneef J, Shaharyar M, Husain A et al. Application of LC-MS/MS for quantitative analysis of glucocorticoids and stimulants in biological fluids. *J Pharm Anal* 3: 341-348, 2013.

Harris AL, Sacha CR, Basnet KM et al. Vanishing Twins Conceived Through Fresh In Vitro Fertilization: Obstetric Outcomes and Placental Pathology. *Obstet Gynecol*. 2020 Jun;135(6):1426-1433.

Hellgren C, Comasco E, Skalkidou A et al. Allopregnanolone levels and depressive symptoms during pregnancy in relation to single nucleotide polymorphisms in the allopregnanolone synthesis pathway. *Horm Behav*. 2017 Aug;94:106-113.

Hill M, Hána V Jr, Velíková M et al. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Physiol Res*. 2019 Apr 30;68(2):179-207.

Hill M, Parizek A, Cibula D et al. Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010a, 122(4): 114–32.

Hill, M, Parizek, A, Kancheva, R et al. Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010b, 121(3–5): 594–610.

Hill M, Pašková A, Kančeva R et al. Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Jan;139:201-22.

Hinson J, Raven P, Chew S. 9 - HORMONAL CONTROL OF REPRODUCTION PART II: FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM. *The Endocrine System (Second Edition)*, Churchill Livingstone, 2010, Pages 99-113, ISBN 9780702033728.

Hirst JJ, Kelleher MA, Walker DW et al. Neuroactive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Jan;139:144-53.

Hirst JJ, Palliser HK, Yates DM et al. Neurosteroids in the fetus and neonate: potential protective role in compromised pregnancies. *Neurochem Int.* 2008 Mar-Apr;52(4-5):602-10.

Hirst JJ, Yawno T, Nguyen P et al. Stress in pregnancy activates neurosteroid production in the fetal brain. *Neuroendocrinology.* 2006;84(4):264-74.

Honcu, P.; Hill, M.; Bicikova, M.; Jandova, D.; Velikova, M.; Kajzar, J.; Kolatorova, L.; Bestak, J.; Macova, L.; Kancheva, R.; et al. Activation of Adrenal Steroidogenesis and an Improvement of Mood Balance in Postmenopausal Females after Spa Treatment Based on Physical Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3687.

Houghton LC, Lauria M, Maas P et al. Circulating maternal and umbilical cord steroid hormone and insulin-like growth factor concentrations in twin and singleton pregnancies. *J Dev Orig Health Dis.* 2019 Apr;10(2):232-236.

Chauhan et al. Twins: prevalence, problems, and preterm births. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Oct;203(4):305-15.

Cheong-See F, Schuit E, Arroyo-Manzano D et al. Prospective risk of stillbirth and neonatal complications in twin pregnancies: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2016 Sep 6;354:i4353.

Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB et al. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem,* 272 (1997), pp. 7899-7907).

Choi SJ, Song SE, Seo ES et al. The effect of single or multiple courses of antenatal corticosteroid therapy on neonatal respiratory distress syndrome in singleton versus twin pregnancies. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009 Apr;49(2):173-9.

Kametas NA, McAuliffe F, Krampf E, et al. Maternal cardiac function in twin pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003; 102:806.

Kanova N, Bicikova M. Hyperandrogenic states in pregnancy. *Physiol Res*, 60 (2011), pp. 243-252

Karasu T, Marczylo TH, Maccarrone M et al. The role of sex steroid hormones, cytokines and the endocannabinoid system in female fertility. *Hum Reprod Update* 2011; 17(3): 347-61.

Khalil A. Continuing decline in twin births since 2014. *Hum Reprod.* 2021 Jun 18;36(7):2062-2063.

Kley HK, Rick W. Einfluss von Lagerung und Temperatur auf die Analyse von Steroiden in Plasma und Blut [The effect of storage and temperature on the analysis of steroids in plasma and blood]. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1984 May;22(5):371-8.

Kley HK, Schlaghecke R, Krüskemper HL. Stabilität von Steroiden im Plasma über einen Zeitraum von 10 Jahren [Stability of steroids in plasma over a 10-year period]. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1985 Dec;23(12):875-8.

Krone N, Hughes BA, Lavery GG et al. Gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:496-504, 2010.

Krotz S, Fajardo J, Ghandi S, Patel A, Keith LG. Hypertensive disease in twin pregnancies: a review. *Twin Res.* 2002 Feb;5(1):8-14.

Kuijper EA, Twisk JW, Korsen T et al. Mid-pregnancy, perinatal, and neonatal reproductive endocrinology: a prospective cohort study in twins and singleton control subjects. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1527-34.

Kuleva M, Youssef A, Maroni E, et al. Maternal cardiac function in normal twin pregnancy: a longitudinal study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 38:575.

Leahomschi S, Calda P. Klinické využití nových biomarkerů preeklampsie. *Actual Gyn*. 2016;8:29-33

Linton EA, Woodman JR, Asboth G, et al. Corticotrophin releasing hormone: its potential for a role in human myometrium. *Exp Physiol* 2001;86:273–81.

Luisi S, Petraglia F, Benedetto C et al. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul;85(7):2429-33.

Mackie FL, Rigby A, Morris RK et al. Prognosis of the co-twin following spontaneous single intrauterine fetal death in twin pregnancies: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2019 Apr;126(5):569-578.)

Marcos J, Renau N, Casals G et al. Investigation of endogenous corticosteroids profiles in human urine based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 812: 92-104, 2014.

McEvoy K., Payne JL, Osborne LM. Neuroactive Steroids and Perinatal Depression: a Review of Recent Literature. *Curr Psychiatry Rep*. 2018 Aug 9;20(9):78.

McLean, M., Smith, R. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction* 2001, 121: 493–501.

Melamed N, Yogev Y, Glezerman M. Effect of fetal sex on pregnancy outcome in twin pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2009 Nov;114(5):1085-1092.)

Mitchell BF, Mitchell JM, Chowdhury J et al. Metabolites of progesterone and the pregnane X receptor: a novel pathway regulating uterine contractility in pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* 2005, 192, 1304–13, discussion 1313–5.

Morel Y, Roucher F, Mallet D et al. Genetic of gonadal determination. *Ann Endocrinol (Paris)*, 75 (2014), pp. 32-39).

Morel Y, Roucher F, Plotton I et al. Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016 Jun;77(2):82-9.

Parker CR Jr, Everett RB, Quirk JG Jr et al. Hormone production during pregnancy in the primigravid patient. I. Plasma levels of progesterone and 5-alpha-pregnane-3,20-dione throughout pregnancy of normal women and women who developed pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Nov 15;135(6):778-82.

Pařízek A, Dušková M, Vitek L et al. The role of steroid hormones in the development of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Physiol Res.* 2015;64(Suppl 2):S203-9.

Pařízek A, Hill M, Dušková M et al. A Comprehensive Evaluation of Steroid Metabolism in Women with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *PLoS One.* 2016 Aug 5;11(8):e0159203.

Pasqualini JR, Chetrite GS. The formation and transformation of hormones in maternal, placental and fetal compartments: biological implications. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2016; 27(1):11-28.

Pasqualini JR. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97 (2005), pp. 401-415.

Pašková A, Pařízek A, Hill M et al. Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res*. 2014;63(1):115-26.

Pašková A. Úloha neuroaktivních steroidů v těhotenství a jejich význam v prenatální diagnostice. [The role of neuroactive steroids in pregnancy and their importance in prenatal diagnostics]. Praha, 2013. 100, 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika 1. LFUK a VFN, školitel Pařízek Antonín.

Rao A, Sairam S, Shehata H. Obstetric complications of twin pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:557.

Ravanos K, Dagklis T, Petousis S et al. Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review, *Gynecol Endocrinol*, 2015;31(9):679-83.

Roach VJ, Lau TK, Wilson D, Rogers MS. The incidence of gestational diabetes in multiple pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1998; 38:56.

Rupprecht R, Reul JM, Trapp T et al. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* (1993) 11:523–30.

Santoro A, Mele E, Marino M et al. The Complex Interplay between Endocannabinoid System and the Estrogen System in Central Nervous System and Periphery. *Int J Mol Sci* 2021; 22(2).

Sekce perinatologie a fetomaternální medicíny 2023. <https://www.perinatologie.eu/cr-statisticke-ukazatele/>

Sentilhes et al. Neonatal outcome of very preterm twins: policy of planned vaginal or cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Jul;213(1):73.e1-73.e7.

Seong JS, Han YJ, Kim MH et al. The risk of preterm birth in vanishing twin: A multicenter prospective cohort study. *PLoS One*. 2020 May 29;15(5):e0233097.

Shaw JC, Dyson RM, Palliser HK et al. Neurosteroid replacement therapy using the allopregnanolone-analogue ganaxolone following preterm birth in male guinea pigs. *Pediatr Res.* 2019 Jan;85(1):86-96.

Shin, Y.Y.; An, S.M.; Jeong, J.S.; Yang, S.Y.; Lee, G.S.; Hong, E.J.; Jeung, E.B.; Kim, S.C.; An, B.S. Comparison of steroid hormones in three different preeclamptic models. *Mol. Med. Rep.* 2021, 23, 252.

Sibai BM, Hauth J, Caritis S, et al. Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:938.

Solano, M.E.; Arck, P.C. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Front. Immunol.* 2019, 10, 3017.

Strauss JF, Barbieri RB. Yen Jaffe's Reproductive Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 8th Edition, Elsevier 2019: 367.

Šimják P, Pařízek A, Vitek L et al. Fetal complications due to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Perinat Med.* 2015 Mar;43(2):133-9.

Talia C, Raja EA, Bhattacharya S et al. Testing the twin testosterone transfer hypothesis- intergenerational analysis of 317 dizygotic twins born in Aberdeen, Scotland. *Hum Reprod.* 2020 Jul 1;35(7):1702-1710.

Tan H, Wen SW, Walker M et al. The association between fetal sex and preterm birth in twin pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2004 Feb;103(2):327-32.

Tapp AL, Maybery MT, Whitehouse AJ. Evaluating the twin testosterone transfer hypothesis: a review of the empirical evidence. *Horm Behav.* 2011 Nov;60(5):713-22.

Thomas HV, Murphy MF, Key TJ et al. Pregnancy and menstrual hormone levels in mothers of twins compared to mothers of singletons. *Ann Hum Biol.* 1998 Jan-Feb;25(1):69-75.

Todorovic SM, Pathirathna S, Brimelow BC et al. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol* 2004, 66: 1223–1235.

Townsend R, Khalil A. Fetal growth restriction in twins. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 May;49:79-88.

Tuem KB, Atey TM. Neuroactive Steroids: Receptor Interactions and Responses. *Front Neurol.* 2017 Aug 28;8:442.

Turton P, Arrowsmith S, Prescott J, et al. A comparison of the contractile properties of myometrium from singleton and twin pregnancies. *PLoS One* 2013; 8:e63800.

Sekce perinatologie a fetomaternální medicíny. *Perinatologická statistika 2020.* [online] Dostupné z: <https://www.perinatologie.eu/cr-statisticke-ukazatele/>

Vo, T.; Hardy, D.B. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *J. Cell Commun. Signal.* 2012, 6, 139–153.

Voutilainen R, Miller WL. Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450cc (20,22 desmolase), P450c17 (17 alpha hydroxylase/17,20 lyase) and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 63 (1986), pp. 1145-1150).

Yuan TF, Le J, Wang ST et al. An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples. *J Lipid Res.* 2020 Apr;61(4):580-586.

Zhu P, Tao FB, Jiang XM et al. Effect of intrahepatic cholestasis of pregnancy on the functions of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and adrenal cortex in normal neonates. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2010 Jan, 12(1): 5–8.

Zorumski CF, Paul SM, Covey DF et al. Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond. *Neurobiol Stress*. 2019 Sep 27;11:100196.

11 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

11.1 Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace

Černý, A.; Hill, M.; Vosátková, M.; Laštůvka, Z.; Pařízek, A. Steroid Metabolome Analysis in Dichorionic Diamniotic Twin Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1591. **IF 5,6**

Hill M, Hána V Jr, Velíková M, Pařízek A, Kolátorová L, Vítků J, Škodová T, Šimková M, Šimják P, Kancheva R, Koucký M, Kokrdová Z, Adamcová K, **Černý A**, Hájek Z, Dušková M, Bulant J, Stárka L. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Physiol Res.* 2019 Apr 30;68(2):179-207. **IF 1,655**

Hill M, Pařízek A, Šimják P, Koucký M, Anderlová K, Krejčí H, Vejražková D, Ondřejíková L, **Černý A**, Kancheva R. Steroids, steroid associated substances and gestational diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2021 Dec 30;70(Suppl4):S617-S634. **IF 2,139**

Šimják P, Hill M, Pařízek A, Vitek L, Velíková M, Dušková M, Kancheva R, Bulant J, Koucký M, Kokrdová Z, Adamcová K, **Černý A**, Hájek Z, Stárka L. May circulating steroids reveal a predisposition to intrahepatic cholestasis of pregnancy in non-pregnant women? *Physiol Res.* 2018 Nov 28;67(Suppl 3):S499-S510. **IF 1,701**

Pašková, A., Pařízek, A., Hill, M. Velíková, M., Kubátová, J., Dušková, M., Adamcová, K., Koucký, M., Šimják, P., **Černý, A.**, Stárka, L. Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res.* 2014 Mar 25, p 115-125. **IF 1,293**

Pařízek A., Hill M., Dušková M., Vitek L., Velíková M., Kancheva R., Šimják P., Koucký M., Kokrdová Z., Adamcová K., **Černý A.**, Hájek Z., Stárka L. A Comprehensive Evaluation of Steroid Metabolism in Women with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *PLoS One.* 2016 Aug 5;11(8):e0159203. **IF 2,806**

Pařízek A., Šimják P., **Černý A.**, Šestinová A., Zdeňková A., Hill M., Dušková M., Vlk R., Kokrdová Z., Koucký M., Vítek L. Efficacy and safety of ursodeoxycholic acid in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann Hepatol.* 2016 Sep-Oct;15(5):757-61. **IF 1,678**

Šimják P, Pařízek A, Vítek L, **Černý A**, Adamcová K, Koucký M, Hill M, Dušková M, Stárka L. Fetal complications due to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Perinat Med.* 2015 Mar;43(2):133-9. **IF 1,798**

Pařízek, A., Dušková, M., Vítek, L., Šrámková, M., Hill, M., Adamcová, K., Šimják, P., **Černý, A.**, Kokrdová, Z., Vráblíková, H., Boudová B., Koucký, M., Malíčková, K., Stárka, L. The Role of Steroid Hormones in the Development of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Physiol. Res.* 64 (Suppl. 2): S203-S209, 2015. **IF 1,643**

11.2 Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace

Černý, A., Laštůvka, Z., Hill, M., Pařízek, A. Steroidní metabolom a vícečetné těhotenství – přehledový článek. *Ceska Gynekol* 2022; 87(3): 217-223.

11.3 Publikace v časopisech s IF bez vztahu k tématu disertace

Mylrea-Foley B., Thornton J., Mullins E., Marlow N., Hecher K., Ammari C., Arabin B., Berger A., Bergman E., Bhide A., Bilardo C., Binder J., Breeze A., Brodzski J., **Černý A.**, et al. Perinatal and 2-year neurodevelopmental outcome in late preterm fetal compromise: the TRUFFLE 2 randomised trial protocol. *BMJ Open [online]*, 2022, vol. 12. ISSN 204. **IF 2,9**

Dostalek L, **Cerny A**, Saskova P, Pavlista D. Selective Extirpation of Tattooed Lymph Node in Combination with Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Node-Positive Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Systemic Therapy. *Breast Care (Basel).* 2021 Dec;16(6):623-629. **IF 2,268**

Koucký M, Malíčková K, Kopřivová H, Cindrová-Davies T, Hrbáčková H, **Černý A**, Šimják P, Pařízek A, Zima T. Low maternal serum concentrations of mannose-binding lectin (MBL) are associated with the risk of shorter duration of pregnancy and lower birth weight. *Scand J Immunol.* 2018 May 14:e12675. **IF 2,563**

Sláma J., **Černý A.**, Dušek L., Fischerová D., Zikán M., Kocián R., Germanová A., Cibula D. Results of less radical fertility-sparing procedures with omitted parametrectomy for cervical cancer: 5years of experience. *Gynecol Oncol.* 2016 Sep;142(3):401-4. **IF 4,959**

Koucký M., Malíčková K., Cindrová-Davies T., Smíšek J., Vráblíková H., **Černý A.**, Šimják P., Slováčková M., Pařízek A., Zima T. Prolonged progesterone administration is associated with less frequent cervicovaginal colonization by *Ureaplasma urealyticum* during pregnancy - Results of a pilot study. *J Reprod Immunol.* 2016 Aug;116:35-41. **IF 2,798**

11.4 Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace

Černý, A., Pařízek, A., Šimják, P Patofyziologie a diagnostika anafylaktoidního těhotenského syndromu. *Anest. intenziv. Med.*, 26, 2015, č. 5, s. 291-296.

Černý, A., Pařízek, A., Šimják, P. Embolie plodovou vodou - přehledový článek. *Čes. Gynek.*, 2014, 79, č. 4, s. 255-259.

Hrbáčková, H., Malíčková, K., Koucký, M., **Černý, A.** Poruchy funkce komplementu v pozadí vybraných těhotenských patologií. *Gynekolog.* 2018, 27(4), 141-144.

Hrbáčková H, Koucký M, Malíčková K, **Černý A**, Gáborová E, Kopřivová H, Hindoš M. The role of T-regulatory lymphocytes in pathogenesis of preterm delivery. *Ceska Gynekol.* 2017 Winter;82(6):487-490.

Koucký M, Malíčková K, Hrdý J, **Černý A**, Hrbáčková H, Šimják P, Pařízek A. The role of maternal immunity and woman's microbiome in the pathogenesis of preterm labor. *Ceska Gynekol.* 2017 Fall;82(5):407-410.

Koucký M, Vráblíková H, **Černý A**, Calda P. Současný management abnormálně invazivní placenty – placenta accreta/increta/percreta. Actual Gyn. 2016;8:42-47

11.5 Ostatní publikace

Kapitoly v monografiích:

Daneš J. et al. Screening a diagnostika karcinomu prsu. Praha: Grada, 2021, 208 s. ISBN 978-80-271-1239-5.

Kapitoly: Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu; Samovyšetření, klinické vyšetření prsu; Vývoj prsu a hormony; Benigní změny a změny s vyšším rizikem karcinomu prsu

Fait T. et al. Moderní farmakoterapie v gynekologii a porodnictví. Praha: Maxdorf, 3. aktualizované vydání, 2019 (předtím také vydání 2014 a 2017), 620 s. ISBN 978-80-7345-607-8.

Kapitoly: Analgezie v rukou porodníka; Diseminovaná intravaskulární koagulopatie

Pařízek A. et al. Kniha o těhotenství, porodu a dítěti. Sv. 1. Těhotenství . Praha: Galén, 2015, 481 s. ISBN 978-80-7492-214-5.

Pařízek A. et al. Kniha o těhotenství, porodu a dítěti. Sv. 2. Porod . Praha: Galén, 2015, 397 s. ISBN 978-80-7492-215-2.

Ostatní publikace:

Výuková pomůcka – skripta pro studenty gynekologie a porodnictví „*Diferenciální diagnostika v gynekologii a porodnictví*“, dostupné z odkazu gynpo.lf1.cuni.cz/studium

12 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

1. Informovaný souhlas pro pacientky
2. Článek Černý, A.; Hill, M.; Vosátková, M.; Laštůvka, Z.; Pařízek, A. *Steroid Metabolome Analysis in Dichorionic Diamniotic Twin Pregnancy. Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1591.
3. Článek Černý, A., Laštůvka, Z., Hill, M., Pařízek, A. *Steroidní metabolom a vícečetné těhotenství – přehledový článek. Ceska Gynekol* 2022; 87(3): 217-223.
4. Článek Hill M, Hána V Jr, Velíková M, Pařízek A, Kolátorová L, Vítků J, Škodová T, Šimková M, Šimják P, Kancheva R, Koucký M, Kokrdová Z, Adamcová K, Černý A, Hájek Z, Dušková M, Bulant J, Stárka L. *A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Physiol Res.* 2019 Apr 30;68(2):179-207.