

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

## **Steroidní metabolom a vícečetné těhotenství**

Steroid metabolome and multiple pregnancy

**MUDr. Andrej Černý**

Praha, 2024

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Klinika gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN

Školitel: prof. MUDr. Antonín Pařízek, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Klinický význam stanovení a studia steroidního metabolomu</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 Vícečetné těhotenství</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Rozdělení vícečetného těhotenství .....	11
1.2.2 Péče o vícečetné těhotenství .....	12
1.2.3 Komplikace vícečetného těhotenství .....	12
1.2.4 Endokrinologie vícečetného těhotenství .....	13
<b>2 HYPOTÉZA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Cíle</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Pacientky</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Sběr a analýza vzorků</b> .....	<b>17</b>
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	<b>18</b>
<b>5 DISKUSE A ZÁVĚR</b> .....	<b>21</b>
<b>6 ZDROJE</b> .....	<b>25</b>
<b>7 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA</b> .....	<b>30</b>
7.1 Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace .....	30
7.2 Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace .....	31
7.3 Publikace v časopisech s IF bez vztahu k tématu disertace .....	31
7.4 Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace .....	32

## **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

Biosyntéza steroidních hormonů probíhá v tkáních nadledvin, gonád, mozku, jater a v placentě.

Prekurzorem pro jejich syntézu je cholesterol a jeho sulfát. Souhrn všech metabolitů steroidů označujeme jako steroidní metabolom či zkráceně steroidom.

Mechanismus účinku steroidů je trojí:

1. genomový, „klasický“ – po vazbě na intracelulární receptory nebo přímo na DNA. Působí jako transkripční faktory, aktivují nebo potlačují expresi genů. Výsledkem je syntéza bílkovin. Efekt se projeví obvykle až za několik hodin nebo dní.
2. negenomový – steroidy se vážou na neurotransmiterové receptory (iontové kanály) lokalizované na cytoplazmatické membráně a tím ovlivňují neuronální excitabilitu. Nástup účinku je velmi rychlý, projevuje se za řádově sekundy až milisekundy. Negenomovým účinkem působí tzv. neuroaktivní steroidy včetně neurosteroidů (ty jsou syntetizované v nervovém systému).
3. V mozku některé steroidy, a to jak neurosteroidy pronikající do mozku z cirkulace přes hematoencefalickou bariéru, tak neurosteroidy v mozku syntetizované, působí negenomovým účinkem vazbou na membránové receptory (Rupprecht et al., 1993, Tuem, Atey 2017).

Neurosteroidy jsou steroidní hormony syntetizované v tkáních nervového systému.

Neuroaktivní steroidy jsou všechny steroidy s neuroaktivním účinkem bez ohledu na místo jejich syntézy.

Neuroaktivní steroidy se vážou na receptory typu A kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné ( $GABA_A$ -r) a N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA-r). Vazbou na  $GABA_A$ -r se uvolňují chloridové kanály, zatímco vazbou na NDMA-r kanály kalciové. Kromě CNS (centrální nervový systém) se receptory pro neuroaktivní steroidy nacházejí také na děloze, čímž se například vysvětluje možnost ovlivnění děložní kontraktility (Mitchell et al., 2005).

V průběhu těhotenství je endokrinní aktivita fetoplacentární jednotky velmi vysoká. U plodu je primárním místem syntézy neuroaktivních steroidů tzv. fetální zóna fetální nadledviny. Aktivita této zóny je stimulována produkcí placentárního CRH (kortikotropní hormon). Vzhledem k absenci některých enzymů v placentě nebo naopak u plodu je nutný transport hormonů a jejich prekurzorů v rámci fetoplacentární jednotky. Cílem je syntéza dostatečného množství steroidních hormonů pro vývoj plodu (Pasqualini, Chetrite, 2016).

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.

Zkoumáním steroidního metabolomu u těhotenství komplikovaných patologií je nezbytné k pochopení vztahu mezi patologií a změnami vnitřního prostředí. Současně je možné dále těhotenství terapeuticky ovlivňovat.

Dosavadní práce 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 endokrinologický vztah mezi plody a matkou a mezi plody navzájem.

Ke stanovení se kromě rutinních imunoanalytických metod využívají metody chromatografické, jako je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Krone et al., 2010), či kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Podle některých autorů je tato metoda vhodnější ke stanovení metabolitů kortikosteroidů (Haneef et al., 2013, Marcos et al., 2014). Existují i studie, které využívají tuto metodu k analýze steroidního metabolomu u fertilních nebo těhotných žen (Dušková et al., 2020, Yuan et al., 2020).

Pro komplexní kvantifikaci steroidů u těhotných žen a plodů byly také vyvinuty metody plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Tyto metody nabízejí možnost simultánní kvantifikace až 100 endogenních steroidů. Kromě analýzy steroidů v pupečnickové krvi byl tento postup nedávno validován i pro analýzu v krvi těhotných žen a dále v krvi netěhotných žen v obou fázích menstruačního cyklu a v krvi mužů (Hill et al., 2019).

## **1.1 Klinický význam stanovení a studia steroidního metabolomu**

### ***Časování nástupu porodu***

Porucha stability fetoplacentární jednotky může vést k rozvoji celé řady poruch, 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 receptoru pro CRH, které mají více relaxační účinek na myometrium. Těsně před porodem dochází ke konverzi na isoformy, které mají účinek na kontraktilitu myometria pozitivní. Současně studie ukazují, že funkce oxytocinu a prostaglandinu F<sub>2α</sub> 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.



### ***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 metabolitem. 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).

### ***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. PIGF, VEGF, TGF $\beta$ ) 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).

### ***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 blokují 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).

### ***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).

### ***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).

## **1.2 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 1:89<sup>2</sup>, čtyřčata 1:89<sup>3</sup> 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).

### 1.2.1 Rozdělení vícečetného těhotenství

Základní rozdělení vícečetné těhotenství je podle následovných znaků:

- zygotita – 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).

### 1.2.2 Péče o vícečetné těhotenství

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.

### 1.2.3 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.

K nejzávažnějším mateřským komplikacím patří např. změny hemodynamiky u těhotných, gestační hypertenze a preeklampsie, gestační diabetes mellitus.

Mezi nejtěžší fetální komplikace řadíme předčasný porod, nitroděložní úmrtí plodu, růstovou restrikci, respirační distress syndrom (RDS), syndrom mizejícího dvojčete, vyšší riziko vrozených vývojových vad a twin-to-twin transfúzní syndrom (TTTS) včetně jeho variant jako TAPS (twin anemia polycythemia sequence) nebo TRAP (twin reversed arterial perfusion) sekvenci.

#### **1.2.4 Endokrinologie vícečetného těhotenství**

Endokrinologie plodů vícečetného těhotenství byla předmětem výzkumu několika studií. Cílem bylo popsat vliv pohlavních hormonů na jednotlivé plody. Podkladem pro tyto studie byla obvykle tzv. „twin testosteron transfer“ hypotéza. Ta tvrdí, že nadprodukce androgenů mužským plodem ovlivňuje negativně druhý plod a indukuje u něj maskulinní chování, vzhled a kognici. Tento efekt je častý u myšího modelu nebo u některých nižších savců (Tapp et al., 2011).

Nizozemští autoři prokázali, že nedochází k ovlivnění ženských plodů ze smíšeného páru dvojčat testosteronem produkovaným matkou. Někteří autoři tvrdí, že androgeny matky jsou placentou plně konvertovány na estrogeny. Zdroj androgenů je v případě patologického ovlivnění plodu fetální (Cohen-Bendahan et al., 2005). Další studie tuto hypotézu nepotvrzují nebo přímo vyvrací (Tapp et al., 2011, Talia et al., 2020).

Závěry jiných projektů opakovaně prokázaly, že dívky ze smíšeného páru dvojčat nejsou ovlivněny mužským sourozencem více v porovnání se situací, kdy jsou oba sourozenci dívky. Zjistilo se také, že zatímco těhotné ženy s dvojčaty měly vyšší hladiny estrogenů a progesteronu, u dětí byly hladiny v porovnání s jednočetným těhotenstvím nižší. Je to důkaz toho, že tyto děti nejsou exponovány vyšším hladinám pohlavních hormonů (Kuijper et al., 2015, Thomas et al., 1998).

Dosavadní studie prováděné na plodech vícečetného těhotenství stanovovaly pouze omezený počet steroidních metabolitů, a to většinou pouze ze smíšené pupečnickové krve. Náš tým se v minulosti zabýval otázkou rozlišování mezi arteriální a venózní pupečnickovou krví (Pašková et al., 2014). Podrobné hodnocení steroidního metabolomu u vícečetného těhotenství zatím nebylo publikováno.

## 2 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.*

### 2.1 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.

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 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 transfuzní syndrom, těhotné, kterým byly podány kortikosteroidy k indukci maturace plic plodů. Těhotenství po IVF a BMI v pásmu obezity nebyly považovány za exkluzní kritérium. Kontrolní skupinu tvořily ženy s jednočetným těhotenstvím. Tyto ženy měly plánovaný císařský řez z jiné než porodnické indikace. Jedna těhotná z kontrolní skupiny byla současně i ve studijní skupině.

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. 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.



### 3.2 Sběr a analýza 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 podáváním medikace anesteziologem. Bezprostředně po oddělení novorozence od placenty byl proveden separátní odběr arteriální a venózní pupečnickové krve každému z novorozenců. Krev byla odebíraná 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. Tyto byly centrifugovány a odebrané sérum jsme zamražené na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  převezli do laboratoře

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

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

Získaná data jsme následně statisticky zpracovali.

## 4 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 1. 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 1:** 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 jsou v disertační práci předloženy ve formě pozitivních a negativních korelací mezi jednotlivými skupinami.

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

Ve skupině bichoriálních těhotenství v porovnání s kontrolou vykazuje 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.

Pro skupinu monochoriálních těhotenství je základní popis 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.

V poslední části porovnáváme jednotlivé studijní skupiny mezi sebou. 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 projeví vyšší enzymatickou aktivitou a následným rozdílem ve steroidním metabolomu.

V druhé části výsledků nabízíme podrobnější analýzu u některých významných metabolitů.

#### *Pregnenolon:*

Rozdíl v hladinách pregnenolonu (fetálního původu) 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 dán přítomností jedné placenty oproti dvěma. Ta je ale relativně větší než placenta kontrolní skupiny. Nejedná se o steroid, který je závislý na pohlaví plodu, proto zde není statisticky významný rozdíl v souvislosti s počtem mužských plodů

### *Estron, Estriol:*

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

### *Testosteron:*

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. Z výsledků je dále patrné, že rozdíl je tím významnější, čím je vyšší počet mužských plodů. Množství testosteronu nebylo závislé na typu těhotenství, co tuto teorii podporuje.

### *Progesteron:*

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 (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.

## 5 DISKUSE A ZÁVĚR

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  $\Delta^5$  steroidy a většina jejich nekonjugovaných  $\Delta^4$  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  $\Delta^5$  steroidů v těhotenství, zatímco placentární steroidsulfatáza pro C21  $\Delta^4$  steroidy. V placentě dochází k hydrolýze sulfátů C21  $\Delta^5$  steroidů fetálního původu na jejich nekonjugované metabolity a poté pomocí HSD3B1 ke konverzi na jejich  $\Delta^4$  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  $5\alpha$  redukované metabolity a ve fetálních játrech na C21  $5\beta$  redukované metabolity. Tento rozdíl je daný absencí aktivity  $5\beta$ -reduktázy v placentě (na rozdíl od  $5\alpha$ -reduktázy).

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

Menší rozdíl byl pozorován u  $20\alpha$ -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, estrogeny, 11-deoxykortikoidy a 11 $\beta$ -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  $\Delta^5$  steroid pregnenolon sulfát, ale také pro C19  $\Delta^5$  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.

V souvislosti s rozdílem v pohlaví naše výsledky ukazují zvýšení hladiny testosteronu, 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronu a 5-androsten-3 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -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 testech 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.

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 prekursorů 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.



## 6 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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  $\gamma$ -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.
- 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.
- 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.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 prenatalní 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.
- 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.
- 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/>

- Šimják P, Pařízek A, Vítek 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.
- 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 Ca<sup>2+</sup> channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol* 2004, 66: 1223–1235.
- Tuem KB, Atey TM. Neuroactive Steroids: Receptor Interactions and Responses. *Front Neurol*. 2017 Aug 28;8:442.
- 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.

## 7 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### 7.1 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, Vítek 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., Vítek 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**

## **7.2 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.

## **7.3 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**

#### 7.4 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