

**Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni**

Gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice v Plzni

# **Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory**

**Doktorská dizertační práce**

**Plzeň 2010**

**Vědní obor: Gynekologie a porodnictví**

**MUDr. Libor Hradecký**



## Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory

Předložená doktorandská dizertační práce byla vypracována v rámci dizertačního postgraduálního vědeckého studia na Gynekologicko-porodnické klinice Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni.

Doktorand: MUDr. Libor Hradecký  
Gynekologicko-porodnická klinika  
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni  
Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň

Školitel: Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová-Gallová, DrSc.  
Gynekologicko-porodnická klinika  
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni  
Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň

Oponenti: MUDr.

MUDr.

Stanovisko k doktorské dizertační práci vzpracovala Gynekologicko-porodnická klinika Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:

V knihovně Gynekologicko-porodnické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni, Alej Svobody 80, 304 60 Plzeň před komisí pro obhajoby doktorských dizertačních prací v oboru gynekologie a porodnictví. Doktorandská dizertační práce je k dispozici na Děkanátu LF UK v Plzni.

Doc. MUDr. Zdeněk Novotný, CSc  
předseda komise pro obhajoby  
doktorských dizertačních prací  
v oboru gynekologie a porodnictví

# Obsah

1 Úvod .....	1
1.1 Definice preeklampsie .....	1
1.2 Epidemiologie a rizikové faktory preeklampsie.....	3
1.3 Patofyziologie preeklampsie .....	5
1.3.1 Placentace a imunologická teorie preeklampsie.....	6
1.3.2 Toll - like receptory a preeklampsie .....	9
1.3.3 Hypotéza placentární drti - odlučování syncytiotrofoblastu.....	10
1.3.4 Endoteliální aktivace a zánět .....	12
1.3.5 Úloha angiogeneze při preeklampsii .....	13
1.3.6 Úloha oxidativního stressu v preeklampsii .....	14
1.3.7 Autoimunita k angiotensinovému receptoru .....	20
1.3.8 Antifosfolipidové protilátky a preeklampsie .....	21
1.3.9 Trombofilní stavy a preeklampsie .....	22
1.3.10 Genetická teorie preeklampsie .....	23
1.4 Predikce preeklampsie .....	24
1.5 Prevence preeklampsie .....	25
1.5.1 Suplementace kalcia .....	25
1.5.2 Aspirin a další protidestičkové léky .....	26
1.6 Léčba preeklampsie.....	27
1.6.1 Expektační postup při závažné preeklampsii.....	27
1.6.2 Antihypertenzivní léčba.....	28
1.6.3 Užití kortikosteroidů ke zlepšení těhotenských výsledků u žen těžkou preeklampsií nebo HELLP syndromem.....	28
1.6.4 Léčba volumoexpandéry.....	29
1.6.5 Prevence křečí a kontrola akutních křečí .....	29
1.7 Atypické formy preeklampsie.....	30
1.7.1 Gestační hypertenze bez proteinurie .....	30
1.7.2 Capillary leak syndrom - syndrom kapilárního úniku .....	31
1.7.3 Preeklampsie- eklampsie před 20. týdnem gravidity .....	31
1.7.4 Pozdní postpartální preeklampsie- eklampsie a HELLP syndrom.....	32
2 Cíl práce .....	34
3 Materiál a metodika .....	35
3.1 Soubor .....	35

3.2	Protokol studie .....	35
3.3	Metodika studie.....	36
3.3.1	Stanovení hladin antifosfolipidových protilátek .....	36
3.3.2	Stanovení trombofilních stavů.....	38
3.3.3	Ostatní biochemická vyšetření .....	39
3.4	Statistika .....	40
4	Výsledky .....	41
4.1	Výsledky vyšetření jednotlivých antifosfolipidových protilátek.....	43
4.1.1	Antifosfolipidové protilátky proti kyselině fosfatidové .....	43
4.1.2	Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylethanolaminu .....	44
4.1.3	Antifosfolipidové protilátky proti D- fosfatidylglycerolu.....	46
4.1.4	Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylinositolu .....	48
4.1.5	Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylserinu .....	50
4.1.6	Antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu .....	52
4.1.7	Antifosfolipidové protilátky proti annexinu V .....	54
4.1.8	Antifosfolipidové protilátky proti $\beta$ 2- glykoproteinu-I .....	56
4.2	Korelační analýza.....	58
4.3	Výsledky vyšetření trombofilních stavů .....	62
5	Diskuze.....	63
5.1	Vyšetření jednotlivých typů antifosfolipidových protilátek .....	63
5.2	Vyšetření trombofilních stavů .....	66
6	Závěry .....	69
6.1	Závěry vyšetření antifosfolipidových protilátek.....	69
6.2	Závěry výsledků sledování genetických trombofilních faktorů .....	70
7	Souhrn .....	71
8	Summary.....	72
9	Poděkování .....	73
10	Literatura .....	74
11	Publikační činnost.....	94
11.1	Články v časopisech .....	94
11.2	Postery.....	95
11.3	Přednášky .....	95

## Seznam zkratek :

<b>ACLA</b>	antikardiolipinové protilátky (anticardiolipin antibodies)
<b>AIDS</b>	syndrom získaného lidského imunodeficitu
<b>APA</b>	antifosfolipidové protilátky
<b>APC</b>	aktivovaný protein C
<b>APS</b>	antifosfolipidový syndrom
<b>AT</b>	antitrombin
<b>AT1-AA</b>	autoprottilátky proti angiotensinovému receptoru
<b>BMI</b>	body mass index
<b>β2 GPI</b>	β 2 glykoprotein I
<b>CRP</b>	C reaktivní protein
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>dsRNA</b>	double stranded RNA- dvouvláknová RNA
<b>EDTA</b>	kyselina ethylen-diaminotetraoctová
<b>ELISA</b>	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
<b>F</b>	faktor
<b>sFlt-1</b>	solubilní fms-like tyrozinkináza-1
<b>FVL</b>	Leidenská mutace FV
<b>hCG</b>	lidský choriový gonadotropin.
<b>HELLP</b>	„hemolysis - elevated liver enzymes - low platelet count“
<b>HIV</b>	virus získaného lidského imunodeficitu (human imunodeficiency virus)
<b>HLA</b>	histokompatibilní leukocytární antigen
<b>HBsAg</b>	antigen proti povrchovému viru hepatitidy B, Hepatitis B Surface Antigen
<b>ICSI</b>	intracytoplasmatická injekce spermií
<b>IL</b>	interleukin
<b>IFN γ</b>	interferon gamma
<b>IUGR</b>	intrauterinní růstová retardace
<b>IVF</b>	in vitro fertilizace
<b>KIR</b>	killer imunoglobulin-like receptor
<b>LA</b>	lupus antikoagulans
<b>MTHFR</b>	methylen-tetrahydrofolát-reduktáza
<b>MgSO4</b>	síran hořečnatý

<b>mRNA</b>	messenger ribonukleová kyselina
<b>N</b>	počet (number)
<b>NADPH</b>	oxidáza- nikotinamid adenin dinukleotid fosfát-oxidáza
<b>OS</b>	oxidativní stress
<b>NO</b>	kyslíčnick dusnatý
<b>PAMP</b>	molekulární znaky patogenů (PAMP= pathogen associated molecular pattern)
<b>PK</b>	prekalikrein
<b>PC</b>	protein C
<b>PS</b>	protein S
<b>PIGF</b>	placentární růstový faktor
<b>ROS</b>	reaktivní oxidační látka
<b>SLE</b>	systemový lupus erythematoses
<b>SOD</b>	superoxid dismutáza
<b>TGF</b>	transformující růstový faktor
<b>TLR</b>	Toll like receptory
<b>TNF</b>	tumorózní nekrotizující faktor
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor
<b>XOR</b>	xantioxidoreduktáza
<b>XDH</b>	xantindehydrogenázy
<b>XO</b>	xantioxidáza

# Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory

## 1 Úvod

Preeklampsie představuje multisystémové onemocnění dosud nejasné příčiny, které se vyskytuje jen u těhotných žen a pouze v lidské populaci. Nemoc je charakterizována abnormální cévní odpovědí na placentaci, která je spojena se zvýšeným cévním odporem, endoteliální dysfunkcí, zvýšenou agregací destiček a aktivací koagulačního systému (1).

Samotná hypertenze představuje nejčastější onemocnění v průběhu těhotenství. Název gestační hypertenze je používán k popisu širokého spektra onemocnění pacientek od mírného vzestupu krevního tlaku až po závažnou hypertenzi spojenou s orgánovými změnami, které zahrnují akutní gestační hypertenzi, preeklampsii, eklampsii a HELLP syndrom (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count).

### ***1.1 Definice preeklampsie***

Preeklampsie je definována jako výskyt hypertenze spojené s proteinurií. Klasickou triádu příznaků doplňuje přítomnost edémů. Přesto v současné době existuje názor, že edém by neměl být považován za součást diagnózy tohoto onemocnění, neboť bývá běžným nálezem i v normální graviditě a naopak u třetiny žen s preeklampsií se edém nikdy nevyskytuje (2-4). Dle WHO se za hypertenzi považuje krevní tlak (TK) 140/90 a vyšší při dvou měřeních v rozmezí 6 hodin (neplatí pro těžké hypertenze) nebo zvýší - li se systolický TK o 30 mm Hg a diastolický TK o 15 mm Hg. Tato dvě měření krevního tlaku by neměla být v delším časovém intervalu než 7 dní (5). Hypertenze je považována za závažnou, pokud trvá zvýšení systolického tlaku na 160 mm Hg nebo diastolického tlaku nad 110 mm Hg nebo jsou zvýšeny oba parametry nad uvedené hodnoty. Správná diagnostika preeklampsie závisí na přesném měření krevního tlaku (na velikosti manžety, na umístění na paži ve výši srdce a správné kalibraci přístroje), což je důležité především u obézních žen.

Proteinurie je definována jako exkrece bílkoviny do moče v množství nad 300 mg za 24 hodin. Pokud nejsou k dispozici 24 hodinové sběry moče, je proteinurie definována jako

koncentrace bílkoviny v moči v množství 300 mg / l nebo klasifikována pozitivitou jednoho či více testovacích polí na detekčním papírku. Pozitivita testovacích polí na detekčním papírku má být nalezena v nejméně dvou vzorcích moči v rozmezí do 4-6 hodin v období nepřesahujícím 7 dní (1, 2, 5). Mnohé studie poukázaly na fakt, že kontroly moči papírkovou metodou jen málo korelují s množstvím bílkoviny, které je stanoveno z 24 hodinových sběrů moči u žen s gestační hypertenzí (7). Preeklampsii je možné diagnostikovat i bez výskytu proteinurie, pokud je hypertenze spojena s přetrvávajícími cerebrálními symptomy, epigastrickou bolestí nebo bolestí v pravém horním kvadrantu břicha s nauseou nebo vomitem nebo s trombocytopenií a abnormálními jaterními enzymy (2,3).

Preeklampsie je považována za těžkou, pokud je závažná hypertenze spojena s proteinurií nebo pokud hypertenze je spojena se závažnou proteinurií  $> 5 \text{ g}/24 \text{ hodin/den}$  (2,7). Současně je možné považovat preeklampsii za závažnou při výskytu multiorgánového postižení: plicní edém, oligurie (méně než 500 ml moči / den), trombocytopenie (méně než 100 000 trombocytů/ ul, abnormální jaterní enzymy spojené s perzistentní epigastrickou bolestí nebo bolestí v pravém horním kvadrantu nebo těžkými přetrvávajícími symptomy centrálního nervového systému - alterované vědomí, bolesti hlavy, rozmazané vidění nebo slepota (2,3).

Tradiční kritéria k potvrzení diagnózy preeklampsie, tzn. průkaz hypertenze a proteinurie po 20. týdnu gestace, nacházíme nejčastěji u nullipar. U některých těhotných žen má onemocnění závažnější průběh, spojený s vyšší mateřskou a perinatální morbiditou, přestože se může manifestovat jen těžkou gestační hypertenzí bez průkazu proteinurie (5,8). Hypertenze nebo proteinurie nemusí být přítomna u 10-15% žen, u kterých se vyvine HELLP syndrom a u 38 % žen, u kterých dojde k rozvoji eklampsie (9,10). Na základě těchto poznatků bychom měli být velmi obezřetní při hledání rizikových faktorů pro diagnostiku tohoto onemocnění. Zmíněná pravidla však neplatí u žen s hypertenzí či proteinurií před 20. týdnem gestace a zejména u žen, které již jsou léčeny antihypertenzivy (11,12). Tyto ženy již mohou mít vytvořené mikrovaskulární orgánové změny a tudíž se markery k predikci a prevenci onemocnění u těchto žen budou lišit od žen s mírnou formou preeklampsie. Rozsah rizika záleží na gestačním stáří v době porodu, závažnosti procesu a přítomnosti dalších onemocnění. Zmíněná kritéria, vydaná Americkou porodnickou a gynekologickou společností, jsou v různých zemích dále modifikována (3,6).



## Tabulka 1

### **Mateřské komplikace u těžké preeklampsie**

	<b>výskyt</b>
Abrupce placenty	1 - 4 %
diseminovaná koagulopatie / HELLP syndrom	10 -20 %
akutní renální selhání	1 - 5 %
eklampsie	pod 1 %
jaterní selhání nebo krvácení	pod 1 %
Iktus	ojediněle
dlouhodobá kardiovaskulární morbidita	ojediněle
smrt	ojediněle

## Tabulka 2

### **Fetální a neonatální komplikace u těžké preeklampsie**

	<b>výskyt</b>
fetální růstová retardace	10 -25 %
předčasný porod	15- 67 %
perinatální úmrtí	1 – 2 %
hypoxicko - neurologické postižení	pod 1 %

## **1.2 Epidemiologie a rizikové faktory preeklampsie**

Preeklampsii nacházíme u 2-7% zdravých primipar. U těchto žen má onemocnění většinou mírný průběh a prezentuje se až ke konci těhotenství nebo za porodu a představuje tak jen mírně zvýšené riziko pro dané těhotenství (2,5,13). Mnohem vyšší riziko a závažnost onemocnění je u žen s vícečetnou graviditou, chronickou hypertenzí (11,12,14), předchozí preeklampsí, pregestačním diabetem melitem a preexistujícími trombofilními stavy (16-19).

### Tabulka 3

#### **Rizikové faktory preeklampsie**

Omezená expozice spermatem	Primipaternita
Těhotenství po inseminaci dárcovským spermatem, dárcovské oocyty a dárcovská embrya	Protektivní efekt změny partnera v případě předchozí preeklamptické gravidity
Mateřské nebo k těhotenství vztahované rizikové faktory	Extrémy mateřského věku
Mnohočetná gravidita	Preeklampsie v předchozí graviditě
Chronická hypertenze nebo renální onemocnění	Revmatoidní onemocnění
Nízká porodní hmotnost matky	Obezita a inzulinová rezistence
Pregestační diabetes mellitus	Mateřské infekce
Preexistující trombofilie	Výskyt preeklampsie v rodině
Nikotinismus	Hydropická degenerace placenty

Riziko onemocnění stoupá u těch žen, které měly omezenou expozici partnerskými spermii před koncepcí (21-22). Protektivní vliv dlouhodobé expozice spermatem téhož partnera by mohl vysvětlit vysoké riziko preeklampsie u žen mladších 20- ti let. Předchozí spontánní nebo indukovaný abort či normální těhotenství se stejným partnerem je spojeno se sníženým rizikem preeklampsie. Tento protektivní efekt se ztrácí se změnou partnera pro další graviditu (21,23). Některé studie definují i tzv. rizikového muže, za kterého je považován muž, který může vyvolat preeklampsii u těhotenství s více partnerkami (31,32). Lie et al. prokázali, že otec, který koncipoval preeklamptickou graviditu, měl téměř dvojnásobnou pravděpodobnost vzniku další preeklampsie u jiné ženy bez ohledu, zda ta již preeklampsii měla či nikoli (32). Riziko žen pro vznik preeklampsie po již proběhlém porodu bylo s rizikovým mužem téměř 3 %, což se téměř rovnalo riziku u primipar. Jiní autoři hodnotili vliv intervalu mezi porody na vznik preeklampsie se závěrem, že s prodlužujícím se intervalem mezi porody od preeklampsie v prvním těhotenství toto riziko pro další těhotenství klesá (33). Naopak u žen, které neonemocnely preeklampsií v první graviditě, riziko vzniku preeklampsie stoupá s prodlužujícím se intervalem od předchozího porodu (33). Skjarven et al. (34) po prozkoumání norského registru porodů zjistili, že předpokládaná otcovství mohou být sporná až v 60 % případů. Je třeba též brát v úvahu delší interval mezi porody, který může být způsobem infertilitou, hlavně u syndromu polycystických ovárií a opakovanými aborty, což jsou všechno rizikové faktory preeklampsie (34).

K nárůstu rizik preeklampsie přispěly paradoxně pokroky v technikách asistované reprodukce, které zvýšily šanci na otěhotnění žen starších čtyřiceti let. Tyto ženy bývají často obézní primipary, které otěhotní na základě darovaných gamet, inseminace darovanými

spermii či oocyty nebo prostřednictvím dárcovství embryí. Zmíněné techniky mohou zvyšovat aktivitu mateřské imunitní odpovědi a tím i riziko preeklampsie. Darované gamety ovlivňují mateřsko fetální imunitní interakci a často mají za následek mnohočetnou graviditu, která je považována též za rizikový faktor preeklampsie (15,22, 24).

Za neposlední rizikový faktor preeklampsie je nutné považovat obezitu. Riziko stoupá s hodnotou body-mass indexu (22,26) a prokazatelný světový nárůst obezity, provázený s inzulinovou rezistencí, zvyšuje i riziko preeklampsie (27). Přesná teorie, jak se zmíněné faktory uplatňují v etiopatogenezi preeklampsie, není zcela jasně známa. Možná vysvětlení zahrnují zvýšený oxidativní stress, spojený s hyperdynamickou cirkulací a dyslipidemií. Důležitou úlohu má i zvýšená aktivita cytokinů, posílená samotnou aktivitou sympatiku, a zvýšení tubulární resorpce sodíku. Vlastní porucha inzulinové rezistence vede k hyperinzulinemii, spojené s poruchou placentace (22).

Těhotenství samo o sobě představuje stav systémového zánětu, zejména ve III. trimestru. Na základě tohoto konceptu by pak preeklampsie nepředstavovala samostatnou jednotku, ale jen vystupňování mateřské zánětlivé odpovědi namířené proti současné graviditě. V důsledku by to tedy znamenalo, že jakýkoliv faktor, který by zvýšil tuto zánětlivou odpověď, by mohl zvyšovat predispozici k preeklampsii (35). Současné studie také naznačují, že mateřské infekce močového traktu vyvolané chlamydiemi a cytomegaloviry, jsou často asociovány s preeklampsii (25,29,30). Chronické zánětlivé změny jsou přítomny u žen s vysokým body-mass indexem (36).

U žen s preeklampsií byla rovněž v některých studiích prokázána větší prevalence trombofilních stavů (17,18), která však byla dalšími autory popřena (37,38). Nápadná protichůdnost studií by mohla poukazovat na nehomogenost souborů. Většina studií, které neprokázaly souvislost s trombofiliemi a preeklampsií, byla zaměřena hlavně na případy preeklampsie ve III. trimestru. Van Pampus a spolupracovníci (19), kteří studovali dosud největší skupinu preeklamptických žen, jasně poukázali na rozdílnou přítomnost trombofilií u žen s časným nástupem preeklampsie (tzn. s porodem před 28. týdnem gestace) ve srovnání s ženami, u kterých došlo k ukončení gravidity ve III. trimestru (221).

### **1.3 Patofyziologie preeklampsie**

I přes nárůst nových vědeckých teorií, týkajících se patofyziologie preeklampsie, její přesná příčina zůstává stále nejasná.

Preeklampsie vzniká v souvislosti s mateřskou odpovědí na placentaci. Je známo, že chybná placentace není příčinou, ale silným predisponujícím faktorem, který ve většině případů vede k tzv. mateřskému syndromu. Jeho závažnost je pozitivně závislá na množství „zánětlivých“ signálů, které způsobují fetální geny a stupeň mateřské odpovědi na ně. Pokud by placentární ischemie byla jedinou příčinou preeklampsie, mohli bychom očekávat určitý stupeň souladu mezi onemocněním matky a plodu. Této skutečnosti však oponuje fakt, že po porodu je novorozenec často ve velmi dobrém stavu i přes velmi závažný klinický stav matky, a naopak.

Teorie o příčině preeklampsie jsou často popisovány jako spor zastánců vaskulární teorie, ve které ischemie a následná reperfuze vede k oxidativnímu stressu a následnému vaskulárnímu onemocnění, a skupiny imunologů, kteří považují preeklampsii za mateřskou alloimunní reakci spuštěnou rejekcí fetálního allogenního štěpu. Chaouat et al. správně zdůrazňuje, že rozdíl mezi vaskulární a imunologickou příčinou není nadále obhajitelný na základě znalostí o molekulách, secernovaných uvnitř imunologického systému (39). Většina cytokinů disponuje pleiotropními vlastnostmi, jimiž ovlivňují endotel, hladký sval a koagulaci a současně i další imunní buňky a tím zodpovídají za vznik preeklampsie.

### **1.3.1 Placentace a imunologická teorie preeklampsie**

Epidemiologické studie podporují koncept mateřsko - fetální (paternální) imunologické maladaptace, která centrálně navozuje příčinu preeklampsie (21,22,24). Depozice ejakulátu do ženského genitálu vyvolává kaskádu buněčných a molekulárních změn, které vyvolávají klasickou zánětlivou odpověď. Hlavním seminálním faktorem je pravděpodobně transformující růstový faktor TGF-  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1). Zahajuje postkoitální zánětlivou reakci, umožňující zvýšeně detekovat a určit paternální antigeny a vyvolává imunologickou reakci II. typu. Zahájením této imunologické odpovědi proti paternálním antigenům může seminální TGF-  $\beta$ 1 potlačit indukci I. typu proti semiallogenímu konceptu, což je pravděpodobně spojeno s poruchou placentárního vývoje a omezeným fetálním růstem (40).

Peters a spol. v současnosti potvrdili, že expozice mužskými spermii způsobuje slizniční alloimunizaci (41). Omezená expozice spermii je nejpravděpodobnějším vysvětlením pro vysokou incidenci preeklampsie u teenagerů. Wang et al. prokázali, že antigen, který je zodpovědný za protektivní efekt po předchozí expozici spermatem, vychází z buněk spermii. Zjistili, že riziko preeklampsie bylo zvýšeno 3x u žen koncipujících po ICSI s chirurgicky získanými spermii mužů s kompletní azoospermií oproti ženám po standardní IVF a ICSI ,

kdy byly používány spermie získané masturbací (24, 27). Opakovaný sexuální styk s opakovanou expozicí antigeny z buněk spermií ve správném cytokinovém prostředí je podstatou partnersky specifické slizniční tolerance (40).

Během časných týdnů gestace migrují cytotrofoblastové buňky ven z hrotů kotvících klků, penetrují trofoblastový kmen a obklopují syntitiotrofoblast, formují cytotrofoblastové sloupce, které se pak vyvíjejí do cytotrofoblastových kmenů. Trofoblastové buňky pokračují v migraci do deciduy a eventuálně kolonizují placentární lůžko myometria. Po kontaktu cytotrofoblastového sloupce s otvory spirálních arterií, trofoblastické buňky proudí do arteriálních otvorů a formují intraluminální zátku. Endovaskulární trofoblastické buňky nahrazují endotel spirálních arterií a poté invadují do medie, což vede k destrukci mediální elastické, svalové a neurální tkáně. Trofoblastové buňky se inkorporují do cévní stěny a endoteliální povrch je poté kompletně rekonstruován (42,43).

Zhou et al. prokázali, že endovaskulární trofoblastické buňky transformují adhesivní receptorový genotyp a nahrazují endoteliální buňky (44). Preeklampsie je spojena s poruchou přeměny cytotrofoblastu do vaskulárních adhezí. Počáteční vaskulární změny pravděpodobně předcházejí endovaskulární trofoblastické invazi, která ukazuje, že intersticiální trofoblast a deciduální leukocyty (zejména „přirození zabíječi“, natural killer cells, NK buňky) hrají roli v časně disrupci. Tyto fyziologické změny vytváří arteriolární systém s nízkým odporem bez vazomotorické mateřské kontroly, který umožňuje podstatný vzestup krevního zásobení rostoucímu plodu. Během časných stadií implantace, cytotrofoblastové zátky mohou fungovat jako ventily regulující tok krve v intervilosním prostoru a chránící embryo před silným mateřským krevním tokem.

Tento počáteční fyziologický stupeň hypoxie je důležitý v „switch“ mechanismu na produkci hypoxií indukovaného faktoru 1- alfa s následným zvýšením tvorby některých angiogenních a růstových faktorů trofoblastem, včetně inzulinových růstových faktorů (45). Výsledky dopplerometrických studií předpokládají, že přítomnost kontinuálního intervilosního toku v prvním trimestru je spojena s komplikacemi v těhotenství a skutečný tok je stanoven až ve 12. gestačním týdnu u zdravých gravidit (46).

Endovaskulární trofoblastická invaze představuje postranní cestu intersticiální invaze (47). Pravá decidua je vytvořená jen u druhů s invazivní formou placentace. Člověk má extenzivní placentární invazi vzhledem k nutnosti dostatečného dlouhého intrauterinního období pro vývoj fetálního mozku (48). Hlavní buněčnou charakteristikou transformace sliznice endometria do deciduální podoby je masivní leukocytární infiltrace (49). Proces začíná v luteální fázi před potenciální implantací. Během časně gravidity, uterinní NK buňky se

nahromadí jako hustý infiltrát okolo invadujícího cytotrofoblastu. Od střední fáze gestace tyto buňky rychle mizí, což koinciduje s cytotrofoblastickou invazí do doby dokončení placentace okolo 20. týdne gestace (49). NK buňky ovlivňují nejen trofoblastickou invazi, ale i vaskulární změny v placentě (49) schopností produkce cytokinů, které se projevují v angiogenezi a vaskulární stabilitě a zahrnují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), placentární růstový faktor (PIGF) a angiopoetin 2 (50,51).

Trofoblastická buněčná invaze do deciduy s její masivní leukocytární infiltrací představuje těsný tkáňový kontakt mezi allogenními buňkami. Jaký imunologický mechanismus dovoluje tuto hlubokou kontrolovanou trofoblastickou invazi? Ačkoliv na membránách syntitiotrofoblastu chybí všechny klasické antigeny HLA I. třídy s výjimkou HLA-C, invadující trofoblast exprimuje neklasické HLA-G a HLA-E antigeny. Nepolymorfní HLA-G hraje důležitou roli v ochraně trofoblastu před cytotoxickými účinky NK buněk. NK buňky na svém povrchu exprimují receptory, kterými rozeznávají cílové struktury a kterými aktivují či inhibují následný proces.

Skupina receptorů KIR (killer immunoglobulin-like receptor) rozpoznává molekuly I. třídy (HLA-A, B, C). Molekula HLA-G je důležitá pro aktivaci děložních přirozených zabíječů, ale je monomorfní a nemůže sdílet žádný partnersky specifický signál. Naopak HLA-C lokusy jsou dimorfní pro části 77-80 a tyto dvě HLA-C skupiny ovlivňují různé receptory NK buněk. U lidí existuje velká různorodost haplotypů KIR a protože HLA-C je polymorfní, každá gravidita bude mít různé kombinace paternálně odvozených HLA-C a mateřských receptorů KIR. Tento nový náhled poskytuje názorný model, kterým by bylo možné vysvětlit, jak je těhotenství závislé na jedinečné párově specifické imunologické interakci s otcovskými HLA-C molekulami (49). Matky, kterým chybí aktivace většiny nebo všech KIR receptorů (AA genotyp) v případě, že plod exprimuje HLA-C2 molekuly, jsou ohroženy větším rizikem preeklampsie. Tento efekt se prokázal i tehdy, když matky měly HLA-C2 genotyp, což naznačovalo, že došlo k selhání rozlišení svého nebo i cizího antigenu (50). Tato vazba mezi mateřskými KIRs a trofoblastem nevykazuje známky typické imunologické reakce ale je důkazem, že buňky z vrozeného imunního systému hrají fyziologickou roli ve vývoji placenty.

Děložní NK buňky jsou během časných stadií gravidit zdrojem deciduálního interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ), který ovlivňuje přestavbu spirálních arterií a reguluje geny, stimulující produkci alfa-2 makroglobulinu, který prostřednictvím VEGF působí na vaskulární dilataci, do procesu je zapojena i aktivita indukční syntetázy oxidu dusnatého (52). Hladiny IFN  $\gamma$ ,

který inhibuje migraci cytotrofoblastu v závislosti na počtu NK buněk, byly nalezeny zvýšené u preeklamptických gravidit (54).

### 1.3.2 Toll - like receptory a preeklampsie

Během těhotenství dochází k vzájemné mateřsko - fetální reakci, zprostředkované zejména buňkami vrozeného imunologického systému. Hlavním úkolem imunologického systému na mateřsko- fetálním rozhraní je umožnění implantace a vývoje placenty při současné toleranci plodu (181,182). Přesto i zde je vyžadována určitá úroveň hostitelské obrany. Následně může dojít buď k neefektivní resorpci infekčních agens nebo naopak příliš bouřlivá imunologická odpověď může mít výrazný dopad na těhotenství. Klinické studie poukázaly na vzájemný vztah mezi intrauterinními infekcemi a komplikacemi gravidity (183,184). Předpokládá se, že vrozený imunitní systém může ovlivnit osud gravidity.

V situaci, kdy preeklampsie může být indukována infekcí, je důležité působení Toll- like receptorů (185,186). Toll like receptory (TLR) jsou součástí vrozeného imunitního systému např. na povrchu dendritických buněk. Navázání cizorodé molekuly na Toll-like receptor spouští složitou signální kaskádu, na jejímž konci dochází zejména k produkci cytokinů a chemokinů, které vyprovokují B-lymfocyty a T-lymfocyty k akci. TLRs patří do skupiny poznávacích receptorů, které detekují struktury, které jsou součástí mikroorganismů (lipopolysacharidy, lipoproteiny, peptidoglykany, manany, dsRNA) a jsou označovány jako „molekulární znaky patogenů“ (PAMP= pathogen associated molecular patterns ). PAMP chybějí v hostitelských buňkách a jejich rozpoznání prostřednictvím TLR jsou jedním z mechanismů, kterým matka detekuje cizí buňky. V lidské placentě jsou exprimovány toll like receptory, označené 1 až 10 a proteiny pro tyto TLRs aktivují vrozené imunitní odpovědi na mateřsko - fetálním rozhraní (187). Trofoblast s exponovanými TLR secernuje ve srovnání s normální graviditou více prozánětlivých cytokinů a chemokinů pro zvýšení imunitní buněčné migrace. Je důležité, že produkce TLR se mění s fenotypem a gestačním věkem trofoblastů (188-193). Buňky placenty ve II. a III. trimestru produkují různé TLR a aktivace těchto receptorů může být spojena s vývojem preeklampsie.

TLR iniciují produkci cytokinů monocyty. Subtyp TLR-2 detekuje peptidoglykan gram- pozitivních bakterií a lipoarabinomanan mykobakterií, subtyp TLR-4 rozeznává lipopolysacharidy gram- negativních bakterií (194). V animálních modelech bylo zjištěno, že i nízké dávky lipopolysacharidů aktivují TLR- 4 a indukují symptomy podobné preeklampsii

(195). Produkce TLR- 4 byla též zvýšená v placentárních trofoblastech žen s preeklampsií (196). Existuje stoupající počet důkazů, který poukazuje na pozitivní korelaci mateřské virové infekce a preeklampsie. Tinsley et al. (197) prokázali, že aktivace mateřského imunitního systému u krys prostřednictvím TLR-3 vyvolala různé symptomy preeklampsie např. hypertenzi, endoteliální dysfunkci, proteinurii a abnormální fetální vývoj. DNA adenovirů se nacházela mnohem častěji v trofoblastech u případů závažné preeklampsie při srovnání s fyziologickou graviditou (198). Jiní autoři prokázali (např. 199), že při imitaci bakteriální infekce pomocí polysacharidů a při imitaci virální infekce je v trofoblastech následně zvýšena prozánětlivá sekrece cytokinů.

Na základě rozsáhlých rešerší v literatuře (200,217-220) bylo prokázáno, že mateřská bakteriální a virová infekce žen byla spojena s dvojnásobným zvýšením rizika preeklampsie. Antibiotická terapie však v prevenci preeklampsie neměla žádoucí efekt. V randomizované kontrolní studii nesnižovala léčba bakteriurie sulfadimidinem riziko preeklampsie (OR 1,18; 95% CI 0,40-3, 44) (201). Michalovicz et al. (202) publikoval zjištění, že periodontální léčba v graviditě neovlivnila signifikantně výskyt preeklampsie. Nezdá se tedy, že by infekce přímo korelovala s preeklampsií. Přesto však existuje možná role prozánětlivých cytokinů sekundárně vyvolaných infekcí na základě imunologické odpovědi a tato sekundární produkce cytokinů pak úzce koreluje v patogenezi preeklampsie.

### **1.3.3 Hypotéza placentární drti - odlučování syncytiotrofoblastu.**

Odlučování a apoptóza syncytiotrofoblastu jsou příznaky fyziologické gravidity. Apoptóza vyvolává kontrolovanou buněčnou fragmentaci a umožňuje tím kontinuální obnovu syncytiálního povrchu (55). Tento proces je u preeklampsie zvýšen a nacházíme zvýšené odplavování částí membrán mikrokřů syncytiotrofoblastu a elevaci koncentrace volné fetální DNA a cytokeratinu v mateřské cirkulaci (56-58). Zvýšený bezbuněčný interval fetální DNA byl nalezen mezi 16. - 18. týdnem u následně preeklamptických žen (58,59).

Za hlavní patogenetický faktor zvýšené apoptózy byla považována placentární ischemie a reperfuze s následným oxidativním stresem. Tyto mechanismy jsou pravděpodobné zejména u rozvinutého onemocnění s účastí plodu (60). Za kauzální vyvolavatele ischemie a hlavně infarktů je pokládána akutní ateróza a trombóza spirálních arterií (43).



Absence těsné korelace mezi přítomností mateřských, fetálních a placentárních komponent onemocnění a chronologie mateřských komponent tohoto syndromu je v protikladu k teorii, považující placentární ischemii jako hlavní nebo jediný mechanismus vzniku choroby (61,53). Placentární prostředí v prvním trimestru je typicky chudé na kyslík. Tato relativní hypoxie je pravděpodobně fyziologicky důležitá, neboť zvýšený intervilozní průtok by mohl být spojen s nežádoucími těhotenskými výsledky (46). V důsledku hypoxie však převládnou v syncytiotrofoblastu nekrotické procesy nad apoptotickými. Znamky placentární spoluúčasti – např. zvýšená koncentrace inhibinu A v plasmě – se mohou objevit u žen s následnou preeklampsií již v I. trimestru (62). Placentární ischemie zejména v pokročilých stádiích onemocnění je pravděpodobně jen jedním z mnoha predisponujících faktorů pro syndrom preeklampsie (63).

Alternativním vysvětlením by mohl být koexistující imunologický nebo zánětlivý proces. Apoptóza by mohla být výsledkem mateřské nebo fetální imunní maladaptace. Některé cytokiny - interleukin 2, interferon gamma a tumor nekrotický faktor (TNF), FAS- ligandy jsou velmi známými mediátory apoptózy (64). Mateřské serum preeklamptických žen redukuje životaschopnost trofoblastu s prokázanou zvýšenou senzitivitou k FAS - ligandami zprostředkovanou apoptózou (65). Malé množství apoptotických buněk, které jsou pohlcovány makrofágy, zvýší produkci antiinflammatorních cytokinů, naopak excesivní apoptóza, aktivuje makrofágy k prozánětlivému chování cytokinů (64).

Zvýšené množství drti z placentární apoptózy u preeklampsie může představovat zvýšenou zánětlivou stimulaci. Monocyty a neutrofilů, vážící se k mikročástkám syncytiotrofoblastu, produkují zvýšeně TNF a interleukin 12 a superoxidové radikály (66,67).

U preeklampsie je zvýšeno mnoho dalších placentárních faktorů, které se vyskytují v normálních koncentracích v mateřském oběhu během zdravé gravidity. Mezi tyto faktory, které mohou stimulovat mateřskou zánětlivou odpověď, patří některé zánětlivé cytokiny, kortikotropin uvolňující hormon, volné radikály a activin A (57). Mnoho kontroverzí o oxidativním stressu je spojeno s nespécifitou markerů. Moretti et al. (68) měřili parametry oxidativního stressu ve vydechovaném objemu vzduchu a u žen s preeklampsií prokázali vyšší hodnoty než u žen s fyziologickou graviditou a u netěhotných.

Klíčovou roli v aktivaci endoteliálních buněk by mohl mít již zmíněný TNF. Aktivace endotelu má za následek mikrovaskulární únik bílkovin a redukci vazorelaxace, indukovanou acetylcholinem. Zvýšené koncentrace TNF v plasmě u preeklamptických placent jsou pravděpodobně produkovány stromálními buňkami klků, především makrofágy. Je možné, že

i jiné zdroje než placenta pravděpodobně přispívají u tohoto onemocnění ke zvýšení TNF a interleukinu- 6 (69,70).

U preeklamptických žen byla nalezena zvýšená koncentrace interleukinu 12 (IL-12), produkovaného monocyty a makrofágy. Předpokládá se, že IL 12 hraje důležitou roli při regulaci přirozených buněčných zabíječů a T lymfocytů, dokáže indukovat imunitní odpověď a je silným stimulem pro uvolňování interferonu gamma. Interferon gamma efektivně stimuluje monocyty k vyžívání a dalšímu uvolňování IL12, který má antiangiogenní efekt. Tento následný bludný kruh by mohl vysvětlit velmi rychlé zhoršení u některých závažných preeklamptických pacientek (66, 71).

Mateřsko-fetální imunní maladaptace by tedy mohla být hlavní příčinou poruchy placentace. Následné zvýšené odlučování syncytiotrofoblastu může spustit systémovou zánětlivou odpověď u matek, pravděpodobně vytvářející antigenní stimul a tzv. nebezpečný signál, vedoucí k následné aktivaci T helperů (64,71, 72).

#### **1.3.4 Endoteliální aktivace a zánět**

Odpověď na otázku, zda je preeklampsie způsobena poškozením ischemické nebo reperfundované placenty nebo zvýšenou zánětlivou mateřskou odpovědí proti přítomnosti trofoblastu, zůstává nejasná. Role endotelu je spojena s patofyziologií onemocnění a mnoho studií týkajících se této problematiky se zaměřilo na důležitost prostacyklinu a tromboxanového A2 nepoměru (53). Současné studie potvrzují nálezy zvýšené koncentrace asymetrického dimethylargininu ve 23. - 25. týdnu u těhotných žen, u kterých se následně vyvinula preeklampsie a podtrhují důležitost NO cGMP cesty (73).

Endoteliální dysfunkce nebo inadekvátní aktivace endotelu je nejčastějším klinickým projevem při preeklampsii a zahrnuje též zvýšenou buněčnou propustnost a agregaci destiček (74). Dle Redmana a kol. (75) je tato aktivace endotelu součástí mnohem větší intravaskulární zánětlivé reakce, zahrnující intravaskulární leukocytózu, koagulaci a systém komplementu. Tato mateřská zánětlivá odpověď se v menším rozsahu vyskytuje také u zdravých gravidit ve III. trimestru (35). Aktivace endotelu může být způsobena absencí typické stimulace renin-angiotensinového systému i při trvalé hypovolemii, zvýšenou citlivostí na angiotensin- II a norepinefrin s následnou vazokonstrikcí a hypertenzí a zvýšenou permeabilitou endotelu u rozvinuté preeklampsie (74,76). Endoteliální dysfunkce způsobí pokles v produkci a aktivitě vasodilatačních prostaglandinů, zejména prostacyklinu a kyslíčnicku dusnatého (NO). Zvýšený

poměr tromboxanu A2 k prostacyklinu může dále zhoršit uteroplacentární průtok s následkem trombózy spirálních arterií a placentárních infarktů. U preeklampsie poškození endotelu a agregace destiček způsobí zvýšení trombinu a formaci fibrinu. Inadekvátní produkce antiagregačního prostacyklinu, NO či obou parametrů poskytuje přijatelné vysvětlení pro povrchem vyvolanou aktivaci destiček vznikající na vnitřním povrchu spirálních arterií. Produkty adheovaných trombocytů (především tromboxan A2 a serotonin) přispívají k agregaci destiček a indukují formace fibrinu zejména v uteroplacentárním oběhu (77). Tento proces může být navíc nepříznivě ovlivněn přidruženým trombofilním stavem. Cytotrofoblast ve spirálních arteriích nebo zvýšená apoptóza syntitiotrofoblastu může vyvolat depozici fibrinu i aktivaci destiček (78,79).

Při preeklampsii dochází právěpodobně následkem aktivity zánětlivých cytokinů a volných radikálů ke snížené produkci annexinu V v trofoblastech (80). Stupeň redukce annexinu V koreluje se zvýšením koagulační aktivity, závažností mateřského onemocnění a závažností IUGR (81). Redukce annexinu může být opět zhoršena již existující trombofilií. Role fetální trombofilie v příčině placentární vaskulopatie je stále kontroverzní (37,82,83).

### **1.3.5 Úloha angiogeneze při preeklampsii**

Zásadní roli v procesu angiogeneze má vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGF- A), který působí na dva receptory tyrozinkinázy: sFlt -1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1) a VEGF 2 (receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru). VEGF a jeho solubilní receptor sFlt poskytují jasný příklad molekulárních cest, predikovaných Haigem (84). Ve fyziologické graviditě přiměřená interakce mezi endovaskulárním trofoblastem a deciduálními leukocyty, zejména přirozenými zabíječi (natural killer cells) vyvolává následné uvolnění VEGF a PlGF- placentárního růstového faktoru (53). Zvýšené koncentrace volného VEGF jsou důležité pro zachování klidového stavu endotelu za přítomnosti zvýšeného zánětlivého stresu i ve fyziologické graviditě. Maynard et al. prokázal, že placentou vytvářený sFlt1 je antagonistou proangiogenních molekul VEGF a PlGF a jeho hladina je zvýšena u preeklampsie (85). Zvýšená hladina cirkulujícího sFlt1, který in vitro inhibuje invazi cytotrofoblastu a ovlivňuje jeho diferenciaci, je spojena se sníženými cirkulujícími koncentracemi volného VEGF a PlGF, což má za následek endoteliální poškození. Rozsah zvýšení sFlt koreluje se závažností preeklampsie, což nadále podporuje teorii, že rovnováha

VEGF a sFlt je v těsném vztahu s jednou z definitivních patofyziologických cest tohoto onemocnění (178).

U gravidit, u kterých následně došlo k rozvoji preeklampsie a IUGR, byly v I. trimestru nalezeny snížené koncentrace PlGF, hodnoty sFlt se nelišily od kontrolního souboru (179,180). Tato data, která korelovala i s dopplerovskými vyšetření placentárního průtoku, opět potvrzují roli deciduálních angiogenních růstových faktorů, zejména PlGF, který je rozhodující pro časný vývoj placenty (nízké koncentrace PlGF jsou prokázovány u preeklampsie i u IUGR). Zmíněná teorie předpokládá pozdější nástup účinku sFlt jako fetálního záchranného signálu, řídicího mateřskou odpověď a ovlivňujícího např. stupeň mateřské systémové hypertenze. Tato hypotéza je podporována Levinem et al., který dokumentoval změny koncentrací sFlt a PlGF během posledních dvou měsíců gravidit normotenzních kontrolních pacientek (87). Koncentrace sFlt (s následným vazokonstrikčním efektem) a PlGF (s vazodilatačním efektem) společně stoupaly nebo společně klesaly v rámci zachování stavu normotenze. U preeklampsie jsou nalézány také zvýšené koncentrace cirkulujícího endoglinu, solubilního koreceptoru pro transformující růstový faktor  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ 1), které jsou zvýšeny již od 17. - 20. týdne u preeklamptických gravidit a rychle narůstají 8 týdnů před klinickými příznaky choroby (178, 180).

### **1.3.6 Úloha oxidativního stresu v preeklampsii**

Oxidativní stres nastupuje v okamžiku, kdy tvorba volných radikálů (reaktivních substancí s jedním nebo více nepárovými elektrony) překročí kapacitu antioxidantní obrany. Současné literární poznatky dokazují, že oxidativní stres přispívá ke vzniku preeklampsie. Podporujícími důkazy je poškození lipidů, proteinů a DNA oxidativním stresem v placentární a mateřské krvi, snížená celková antioxidační kapacita a nedostatek jednotlivých antioxidantů.

#### **1.3.6.1 Tvorba volných radikálů**

Nejčastěji produkovanou reaktivně oxidační látkou (ROS) je superoxid, který je ale rychle konvertován ke stabilnějšímu hydrogen peroxidu ( $H_2O_2$ ). Ten se střídavě mění do vysoce reaktivního hydroxylanionu. Existuje celá řada zdrojů pro superoxid, např. v respiračním řetězci mitochondrií následkem oxidativní fosforylace. V řetězci unikají 1- 3% elektronů a

tvoří tak superoxid. Mitochondriální syntéza superoxidu je spojena s apoptózou, procesem stárnutí a vede k oxidativnímu poškození trofoblastu v placentě.

V neutrofilech, v buňkách endotelu a hladkého svalstva cév a v trofoblastu je důležitým zdrojem superoxidu skupina úzce spojených NADPH- oxidáz. Aktivaci tohoto enzymatického komplexu vyvolá řada podnětů: angiotensin, destičkový růstový faktor, cytokiny, trombin, hemodynamické změny a lokální metabolické změny. Zvýšená tvorba superoxidu pomocí NADPH oxidáz je prokazatelná při oxidativním stresu a při vzniku kardiovaskulárních chorob.

Za normálních podmínek xantinoxidoreduktáza (XOR), hojně přítomná v játrech a také v trofoblastu, existuje ve formě xantindehydrogenázy (XDH). XDH konvertuje hypoxantiny na xantiny a ty pak na uráty. Cytokiny zvyšují aktivitu XOR, zatímco hypoxie stimuluje nezvratnou konverzi ke xantinoxidáze (XO). Po reperfuzi oxygenovanou krví xantinoxidáza používá kyslík jako recipienta, dochází k tvorbě superoxidu a kyseliny močové. V řadě patologických procesů je xantinoxidáza uvolněna do plasmy, navázána na cílovou tkáň a inkorporována do intracelulárního prostoru pomocí endocytózy. Pokud dojde ke xantinoxidázou vyvolané tvorbě superoxidu, dojde i k poškození tkáně. Bylo zjištěno, že superoxid a kyslíkové radikály ovlivňují expresi genu pro fyziologické jevy jako je růst, proliferace, angiogeneza, ale i pro jevy patologické jako je zánětlivá odpověď a hypertrofie (228-230).

### **1.3.6.2 Mechanismus obrany proti oxidativnímu stresu**

Zástupce enzymatických antioxidantů superoxid dismutáza (SOD) představuje první linii obrany proti volným kyslíkovým radikálům, rozkládá superoxid na peroxid vodíku a kyslík. Rychlá buněčná odpověď na oxidativní stres vede k prudkému zvýšení SOD, ta společně působí s enzymy katalázou a glutathion peroxidázou, které odstraňují  $H_2O_2$ . Mezi další antioxidanty této skupiny patří selenium dependentní a non- dependentní glutathion peroxidáza, která redukuje rovněž peroxid vodíku a organické hydroperoxydy. Thioredoxinový systém je zahrnut do regenerace antioxidantních systémů (např. kyseliny askorbové).

Mezi non-enzymatické antioxidanty rozpustné ve vodě je řazen glutathion, hojně se vyskytující v lidských tkáních, dále sem patří vitamín C, který člověk nedokáže syntetizovat. Kyselina močová je považována za odpadový produkt aktivity xantinoxidázy, ale má i silnou antioxidantní schopnost proti ve vodě rozpustným volným radikálům a stabilizuje vitamín C

ve fyziologických koncentracích (153). Kyselina močová je neefektivní proti radikálům rozpustným v tucích. Další antioxidanty jsou železo vázící proteiny (transferin a ferritin) a hem vázící proteiny (haptoglobin).

### **1.3.6.3 Oxidativní stress ve fyziologické graviditě**

Fyziologická gravidita představuje mírné stádium oxidativního stressu. Navzdory přítomnosti antioxidantních mechanismů - SOD, kataláza, GPX a GSTP a kofaktorů - glutathionu a cysteinu - existuje nízký stupeň oxidativních modifikací v placentární tkáni. Také maternální faktory vedou ke zvýšení tvorby superoxidu a jiných ROS během gravidity, které jsou však částečně neutralizovány antioxidantními mechanismy (152). Po porodu se tvorba ROS a antioxidantů navrátí do původního stavu. Je známo, že vaginální porod představuje větší oxidativní stress než porod operativní (typ porodu je nutné znát při hodnocení placentární tkáně).

### **1.3.6.4 Oxidativní stress při preeklampsii**

Rozvoj preeklampsie je spojen s abnormalitami invaze trofoblastu. Aktivita některých antioxidantních enzymů v normální placentární tkáni se zvýší paralelně se vzestupem tlaku kyslíku, který se objevuje mezi 10. - 12. týdnem gestace. Existuje hypotéza, že porušená oxidativní odpověď na tento oxygenační stimulus rezultuje v oxidativní stress. To vede k degeneraci trofoblastu a pravděpodobně přispívá ke zhoršení invaze trofoblastu. Podobně byly nalezeny známky oxidativního stressu v placentární tkáni u časných potratů (detekce nitrotyrozinu a heat shock proteinu), takže oxidativní stress může přispívat ke ztrátě raného těhotenství.

Dále se předpokládá, že zachování muskulárního pláště spirální arterie na základě chybné invaze trofoblastu vede k intermitentní perfuzi placenty, která se společně s častou tromboembolickou okluzí podílí na chronickém poškození z hypoxie a reoxygenace a tím dochází k iniciaci oxidativního stressu. Díky hypoxickému prostředí, enzym xantinoxidoreduktáza, vyskytující se hojně v placentě, je konvertován do oxidační formy, což při následné reoxygenaci rezultuje v produkci superoxidu. Je dokázáno, že vystavíme-li normální placentární tkáň *in vitro* periodám hypoxie a následné reoxygenace, dojde ke zvýšení nitrotyrozinu v trofoblastu a aktivaci apoptotických mechanismů. Tyto mechanismy mohou být oslabeny přidáním „zametačů“ volných kyslíkových radikálů. Jako „zametač“ se uplatňuje například kyselina močová. Placentární tkáň žen s preeklampsií má zvýšenou

schopnost ke tvorbě superoxidu, což může být spojeno s větší expresí xantinoxidázy. NADPH oxidáza je přítomna v syncytiotrofoblastu a cytotrofoblastu, je funkčně aktivní již v prvním trimestru gravidity, má pravděpodobně svoji roli v časném vývoji placenty a více je pozorována u preeklamptických žen (231).

Poměrně často je v literatuře (232-234) uváděn pokles antioxidační kapacity placenty - snížení hladiny vitamínu E a snížená exprese některých důležitých enzymatických antioxidantů jako kataláza, SOD, GPX, glukózofosfát dehydrogenáza (152). Důkazem oxidativního poškození placenty je peroxidace lipidů, zvýšená syntéza isoprostanu, 8- iso prostaglandinu F2 beta a tvorba nitrotyrozinu. Poslední tři sloučeniny jsou biologicky aktivní (isoprostan redukuje invazi trofoblastu).

Maternální oxidativní stress při preeklampsii je pravděpodobně důvodem pro placentární stress. Ženy s preeklampsií mají zvýšenou apoptózu trofoblastu a mikrokřků. Deportace těchto mikročástek placenty do systémového oběhu při normální graviditě přispívá ke zvýšené mateřské zánětlivé odpovědi, typické pro preeklampsii a je spojena s lokální zvýšenou tvorbou superoxidu.

#### **1.3.6.5 Důkazy zvýšené systémové tvorby volných radikálů u preeklampsie**

U žen s gestační hypertenzí dochází ke zvýšení kyseliny močové v plasmě, která je produktem aktivity xantinoxidázy (XO) a je přítomna zvýšená aktivita této látky v plasmě. Tudíž zvýšení kyseliny močové můžeme považovat za nepřímý důkaz zvýšené tvorby superoxidu prostřednictvím xantinoxidázy (153). U žen s preeklampsií dochází k nestabilitě erytrocytární membrány, tím dochází ke zvýšenému rozpadu krvinek a vyplavování železa do krve, volné železo přispívá k tvorbě volných kyslíkových radikálů, např.  $H_2O_2$ . Tyto ženy mají patologické laboratorní hodnoty: snížený transferin a totální vazebnou kapacitu, zvýšený feritin a zvýšené volné železo v plasmě.

#### **1.3.6.6 Maternální antioxidační statut u preeklampsie**

U žen s preeklampsií je celková antioxidační schopnost plasmy zvýšena, což platí také pro antioxidant kyselinu močovou, avšak jak už bylo zmíněno, toto zvýšení může spíše znamenat zvýšení XO aktivity s následnou tvorbou superoxidu než vlastní antioxidační obranu. Absorpční schopnost, která je postavena na přímém uhašení volných radikálů, je u žen s mírnou preeklampsií nezměněna, u žen s těžkou preeklampsií snížena.

Řada studií (159,235,236,237) se zabývá hladinou glutathionu a jinými aminothioly v etiologii oxidativního stressu u preeklampsie a bylo pozorováno snížení jejich hladiny v plasmě. Volnými radikály jsou oxidovány aminothioly (cystein, homocystein a cysteinylglycin), tato změna je dokazatelná laboratorně. Nejvíce je atakován cystein, aminothioliol s nejmenším redukčním potenciálem. Poměr volných k oxidovaným aminothiolum je u žen s preeklampsií snížen. V případě homocysteinu přetrvává toto snížení až 6 týdnů po porodu. Vysoká hladina cysteinu a snížení poměru volné k oxidované kyselině byly nalezeny také u netěhotných žen, které prodělaly dříve preeklampsií. 60 % následných gravidit bylo spojeno s hypertenzí, porušená redukční schopnost může být tedy predisponujícím rizikovým faktorem.

U preeklampsie je popisováno snížení i zvýšení hladiny vitamínu E, stanovené jako alfa tokoferol (238-241). Vitamín E je transportován lipoproteiny a jeho hladina je závislá na hladině lipoproteinů. Hladina vitamínu E v krvi však neodráží stav vitamínu E v buňkách. U preeklampsie dochází ale nepochybně k depleci vitamínu C a protože vitamin C funguje společně s vitamínem E, může být schopnost vitamínu E jako „zametače“ kyslíkových radikálů snížena.

Deplece vitamínu C má svůj důvod ve sníženém příjmu v potravě těhotných a současně je i důsledkem zvýšené syntézy volných radikálů. Studie, které se zabývaly příjmem vitamínu C a vitamínu E u žen s preeklampsií jeden rok před otěhotněním zjistily, že příjem vitamínu C u těchto žen byl nižší než je denní doporučená dávka (241-242). Jiné studie však vztah mezi denní dávkou vitamínu C a E a vznikem preeklampsie nenalezly (243).

Co se týče karotenoidů (retinol nebo vitamin A), nebyl dosažen jednotný názor na jejich vztah k preeklampsií (153). Některé práce prokázaly snížení hladin beta -karotenu, lykopenu a retinolu (245-245).

Na rozdíl od neenzymatických antioxidantů, výskyt a aktivita enzymatických oxidantů byla zkoumána i u preeklampsie. Roggensack prokázal sníženou hladinu SOD v cévách v podkožním tuku a její sníženou aktivitu v erytrocytech, GPX a kataláza však zůstaly v normálních mezích (246). Asociace mezi sníženou enzymovou aktivitou SOD a katalázou a paradoxně zvýšenou aktivitou GPX hraje důležitou roli v metabolismu toxických produktů oxidativního stressu. Volné radikály a produkty poškození oxidativním stresem vyvolají tzv. antioxidační odpověď a iniciují tvorbu antioxidačních enzymů. Aktivita GPX může být snahou zabránit excesivní lipidovou peroxidaci a metabolizovat produkty z oxidativního poškození, které bylo vyvoláno nízkou aktivitou enzymů SOD a katalázy.



### **1.3.6.7 Následky oxidativního stresu u preeklampsie**

Produkty OS v placentě přispívají k mateřské zánětlivé odpovědi, skládající se z lokální tvorby volných radikálů. Je tedy možné vysvětlit preeklampsii na základě oxidativního stresu. Vaskulární funkce mohou být také změněny oxidativním stresem. Lipidové peroxidy mohou poškodit funkci endoteliálních buněk. Některé práce (246,247) předpokládají, že NO-syntetáza a kyslíčnick dusnatý (NO) jsou zvýšené u žen s preeklampií. NO rychle reaguje s peroxidem, vzniká peroxyinitrit, který snižuje dostupnost NO působit jako vasorelaxační látka, dále je zapojen do procesu nekrózy a apoptózy a může poškodit endoteliální buňky. Navíc peroxyinitrit a společně s lipidovými peroxidy inhibuje prostaglandin H syntázu, což způsobí sníženou koncentraci prostacyklinu. Poškozené buňky a volné radikály stimulují uvolnění endotelinu, masivního vazokonstriktoru, který je zvýšen u žen s preeklampií.

### **1.3.6.8 Profylaxe preeklampsie pomocí antioxidantů**

V současné době neexistuje akceptovatelná metoda v prevenci preeklampsie. Studie (248), které zkoumaly aspirin a kalcium jako profylaxi, nebyly přesvědčivé. Protože však OS hraje u preeklampsie důležitou roli, stále je hledán nový antioxidant. Některá antioxidantia např. vitamin E nepůsobí pouze detoxikaci volných radikálů, ale redukuje i zánětlivou systémovou odpověď. Antioxidantia, která změní redukční potenciál buněk, nepřímo ovlivňují expresi redukčního genu. Jednou z vlastností vitaminu C je inhibice apoptózy a redukce tvorby mikroparticulí v placentě (249). Poněvadž vitamin C přispívá k tvorbě alfa tokoferolu, mohou tyto vitaminy být slibné právě v prevenci preeklampsie (159). Oba vitamíny mohou blokovat nejen lipidovou peroxidaci, ale mohou snížit i tvorbu volných radikálů, zánětlivou odpověď a prokoagulační stav. Tři velké studie, které se zabývaly podáváním vitamínů E a C ve vysokých dávkách, ukázaly, že aplikace vitamínů při nástupu nemoci nemá terapeutický efekt (250-252). Podávání vitamínů C v denní dávce 1000 mg a vitamínu E v denní dávce 400 IU ženám z rizikové populace (tzn. s abnormálními dopplerometrickými nálezy v předchozí graviditě či s prodělanou preeklampií) již v rané graviditě od 18. - 22. týdne až do porodu bylo spojeno s poklesem biochemických markerů pro oxidativní stress, byl tedy snížen stupeň oxidativního poškození. Tyto nálezy podporují teorii, že časná intervence pro prevenci preeklampsie je nezbytná. Pokud však již došlo k progresi oxidativního stresu a multiorgánovému poškození, není možné tento děj vitamínovou terapií ovlivnit. Další studie z USA, Velké Británie a tří rozvojových zemí na dané téma probíhají.

Závěrem je možno konstatovat, že oxidativní stress a následné orgánové poškození volnými radikály může hrát zásadní roli v maternálním syndromu u preeklampsie.

### 1.3.7 Autoimunita k angiotensinovému receptoru

Autoimunita je dlouhodobě spojována s preeklampsií (253,254). V současné době několik studií prokázalo (255,257), že ženy s preeklampsií mají agonistické autoprotilátky proti receptoru typu I pro angiotensin II. Aplikace těchto autoprotilátek březí myši způsobí klinický stav preeklampsie aktivací AT1 receptoru (257). Z uvedeného vyplývá, že preeklampsie by mohla představovat autoimunní stav, ve kterém AT1 receptor a jeho agonisticky působící autoprotilátky (AT1- AA) přispívají k mnoha rysům tohoto onemocnění.

AT1-AA dávají signály vaskulárním buňkám, aktivují protein 1, kalcineurin, reaktivní kyslíkové radikály a nukleární faktor kappa B, které jsou blokovány AT1R antagonisty (256, 258). U lidí byla prokázána jednoznačná korelace mezi aktivitou AT1- AA a závažností preeklampsie. Současně se zdá, že AT1-AA receptory jsou zodpovědné za další účinky v různých tkáních, např. aktivaci endotelu u u březích krys prostřednictvím interleukinu-6 produkovaného v mesangiálních buňkách. Přesto existuje celá řada nezodpovězených faktů, mezi něž patří otázka antigenního stimulu k aktivaci těchto receptorů a interval, v jakém jsou AT1- AA receptory po stimulaci aktivovány (259).

Jiná studie (260) prokazovala vztah mezi zvýšením tumor nekrotického faktoru alfa (TNF- alfa) a AT1- AA aktivitou u preeklamptických žen a byla vyslovena hypotéza, že AT1- AA jsou novým kandidátem, který by mohl přímo stimulovat produkci TNF- alfa aktivací AT1 receptoru. Inhibicí AT1-AA receptoru dojde následně ke snížení produkce TNF- alfa, a tím zmírnění placentární apoptózy. Inhibice TNF- alfa oslabuje klinické projevy preeklampsie, které je možné pozorovat po aplikaci autoprotilátek březí myši in vivo. Z animálních i humánních studií (261,262) vyplynulo, že aktivace AT1 receptoru autoprotilátkami indukuje tvorbu TNF- alfa a jeho zvýšená produkce může být základním mechanismem přispívajícím k vysvětlení patofyziologie preeklampsie. Přestože podstata tohoto mechanismu není zcela objasněna, může lepší poznání tvorby AT1- AA vést k potenciálním terapeutickým zásahům u preeklampsie.

### 1.3.8 Antifosfolipidové protilátky a preeklampsie

Antifosfolipidové protilátky (APA) jsou velmi heterogenní skupinou protilátek, které působí proti plazmatickým a buněčným proteinům, vázajícím fosfolipidy. Část APA má trombogenní účinek, u této skupiny se uplatňuje ve spojení s fosfolipidy plazmatický kofaktor -  $\beta$ 2 glykoprotein I ( $\beta$ 2 GPI). Jedna z mnoha klasifikací zahrnuje dělení APA podle užitého antigenu v ELISA metodě. Rozlišujeme protilátky antikardiolipinové, anti  $\beta$ 2-glykoproteinové a antifosfolipidové protilátky proti jednotlivým fosfolipidům např. fosfatidylserinu, fosfatidylcholinu, fosfatidylinositolu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylglycerolu, anexinu V a kyselině fosfatidové (222). Protilátky proti protrombinu méně korelují s klinickými projevy trombóz. Trombogenní APA jsou spojeny s antifosfolipidovým syndromem (APS), který je definován řadou klinických příznaků: rekurentními venózními či arteriálními trombózami v anamnéze, trombocytopenií, opakovanými potraty a předčasnými porody, porodem mrtvého plodu, spojenými s preeklampií. Prevalence APA mezi rodícími ženami se vyskytuje v rozmezí 0,3- 9,1 %.

Vlastní účinek APA je předmětem debat a podle posledních hypotéz se na jejich působení spolupodílí defekt buněčné apoptózy, který expozicí membránových fosfolipidů umožní jejich spojení s různými plasmatickými proteiny, následně vzniklý komplex je cílem autoprotilátek.  $\beta$ 2- glykoprotein 1 může vázat a aktivovat dendritické buňky stejným způsobem jako Toll-like receptor 4 a tím podporovat tvorbu autoprotilátek. Další imuno-hematologické mechanismy působení APA a jejich vazbu na buněčné antigeny trombocytů s hyperkoagulačním efektem zahrnuje **tabulka 4**.

#### Tabulka 4

#### **Možné mechanizmy působení fosfolipid - dependentních protilátek (265)**

$\beta$ 2- glykoprotein I	inhibice aktivace PC, inhibice inaktivace FVa a FVIIIa cestou APC/PS, inhibice aktivace fibrinolýzy komplexem FXII/PK, inhibice aktivace AT mediované heparan-sulfátem, potenciace aktivace trombocytů, potenciace tvorby FXa na trombocytech, snížení volného PS cestou inhibice interakce $\beta$ 2-glykoprotein I a C4-vázající protein
Antiprotrombin/ Antitrombin	vazba na trombinem aktivované destičky, inhibice uvolnění prostacyklinu pod vlivem trombinu, inhibice aktivace PC
Antiprotein C	inhibice aktivace proteinu C, inhibice inaktivace FVa a FVIIIa cestou APC/PS
Antiprotein S	inhibice inaktivace FVa a FVIIIa cestou APC/PS
Antifosfolipáza A2	inhibice produkce prostacyklinu z endoteliálních buněk
Antianexin V	ovlivnění funkce placentárního antikoagulačního proteinu 1- anexinu V- tvorbou komplexů, blokádou nebo odstraněním anexinu V z jeho přirozených míst v placentě

**Legenda:** PC - protein C, PS - protein S, F - faktor, APC - aktivovaný protein C, AT - antitrombin, PK - prekalikrein

Mimo trombogenního efektu je u preeklampsie zvažován přímý efekt APA na poškození placentárního trofoblastu a redukci jeho invazivity a diferenciaci, dále na formaci syncytia a na inhibici lidského choriového gonadotropinu (hCG).

### **1.3.9 Trombofilní stavy a preeklampsie**

Trombofilní stavy jsou vrozené nebo získané poruchy spojené se zvýšeným rizikem trombózy. Nejvýznamnější klinickou manifestací trombofilie je venózní tromboembolismus. K vrozeným poruchám patří Leidenská mutace genu V. faktoru, mutace genu protrombinu 20210A, polymorfismy genu pro MTHFR (677 CT) a MTHFR (1298 AC), deficiencie antitrombinu, proteinu C a proteinu S. Také získaná APC rezistence, hyperhomocysteinemie, syndrom lepivých destiček a zvýšená hladina faktorů VIII, IX a XI je spojena s vyšším rizikem venózní tromboembolie.

K získaným trombofilním poruchám řadíme především antifosfolipidový syndrom a maligní nádory.

Riziko tromboembolie je lehce zvýšené u pacientů s mutací faktoru V. Leiden nebo protrombinovou mutací, středně zvýšené u osob s hyperhomocysteinemií a výrazně zvýšené u osob se zvýšenou hladinou faktoru VIII. nebo s antifosfolipidovým syndromem (203).

Těhotenství je charakterizováno souhrou několika mechanismů zvyšujících riziko trombózy, takže její výskyt je 6-10 x vyšší než u netěhotných žen. V graviditě dochází k mnohonásobnému zvýšení koncentrací fibrinogenu a faktoru II, VII, VIII, X a XII, hladiny koncentrací faktoru V a IX se nemění. Koncentrace endogenních antikoagulancií se mírně zvyšují (alfa-2-makroglobulin), ostatní faktory přetrvávají v nezměněných koncentracích (antitrombin III, C protein, heparin II kofaktor), S protein se snižuje.

Tyto změny se mohou podílet na vzniku trombóz v uteroplacentárním a intervilózním prostoru (205). Primárním orgánem, který je zasažen chorobnými projevy, je placenta. Trombotické změny v placentě vznikají v uteroplacentárním a intervilózním prostoru, manifestují se ve formě infarktů a nekróz, funkčně pak způsobují rozvoj placentární insuficience s projevy chronické tísně plodu a nitroděložní růstovou restrikcí. Vaskulární trombotické projevy lze detekovat v mateřském i fetálním kompartmentu. Histologicky prokazatelné změny placenty jsou nespecifické (206).

U žen s trombofiliemi je přibližně 2x vyšší riziko ztráty plodu, intrauterinní růstové retardace plodu, placentární abrupce, těžké preeklampsie a HELLP syndromu (208).

### **1.3.10 Genetická teorie preeklampsie**

Nilsson et al. ublikoval model odhadující 31 % dědičnost preeklampsie a 20 % dědičnost gestační hypertenze (89). Je nepravděpodobné, že by existoval pouze jediný gen pro preeklampsii. V současné době je upřesňována teorie rostoucího počtu vnímavých genů, z nichž mnohé ovlivňují mateřský kardiovaskulární nebo koagulační systém či regulují mateřskou zánětlivou odpověď. Studie genomu identifikovaly nejméně tři genové lokusy, mající podstatný vztah k preeklampsii : 2p12, 2p25 a 9p13 (90). Tyto lokusy jsou odlišné v různých populacích (91) a mohou vysvětlit jen malé procento všech případů preeklampsie. V etiopatogenezi preeklampsie není vyloučena ani spoluúčast fetálních genů. Dle publikované hypotézy může mít fetální vliv rozhodující význam pro nemoc dospělého. V případě

preeklampsie by „nepřátelské“ intrauterinní prostředí pro plod vytvořilo podklad pro syndrom inzulinové rezistence a s tím spojené poškození endotelu a tak by došlo ke zvýšení rizika preeklampsie (22).

Epigenetické jevy např. genomický imprinting hrají rovněž roli v patogenezi preeklampsie (91,92). Oudejans et al. potvrdil existenci lokusu vnímavosti na chromozomu 10q 22.1 (91). Analýza haplotypu dcer- dvojčat s preeklampsií ukázala genetický podklad onemocnění, maximum sdílené alely u postižené dcery byla předána z maternální strany ve všech vyšetřovaných rodinách, což potvrzuje koncept, že preeklampsie zahrnuje maternálně exprimované geny, ovlivněné genetickým imprintingem, které ovlivňují placentu v I. trimestru.

Na základě teorie genetického konfliktu jsou fetální geny selektovány, aby např. zvýšily transfer výživy k plodu a exprimované mateřské geny svým působením transfer živin, který by byl nad specifické mateřské optimum, omezují (84). S genomickým imprintingem existuje obdobný konflikt mezi geny fetálních buněk, které pocházejí z maternální strany s geny z paternální strany. Hypotéza konfliktu predikuje, že placentární faktory (fetální geny) budou způsobovat zvýšení mateřského krevního tlaku, zatímco mateřské geny budou tento tlak snižovat (22). Dysfunkce endotelu by se mohla vyvinout jako důsledek strategie záchrany plodu, která vede ke zvýšení cévní rezistence v případě neadekvátního uteroplacentárního zásobení plodu krví (22).

## **1.4 Predikce preeklampsie**

Předpokládá se, že existují některé cirkulující angiogenní markery, které by mohly napomoci v predikci a potvrzení časně diagnózy preeklampsie (21,48-51). Tyto biomarkery zahrnují redukované množství sérového placentárního růstového faktoru, zvýšení rozpustného fms- like thyrosin kinasa -1 receptoru a zvýšení v séru rozpustných endoglinů (48-51). Tyto markery byly zvoleny na bázi specifických patofyziologických abnormalit, u kterých byl předpoklad asociace s preeklampsií a s placentární dysfunkcí, aktivací endotelu a koagulací (93,94) a systémovým zánětem (56,58,87,93,95). Některé studie prokázaly, že rozdíly mezi těmito angiogenními markery korelují se závažností onemocnění a dobou nástupu preeklampsie a mohou být nápomocné pro stanovení diagnózy preeklampsie u žen s gestační

hypertenzí nebo gestační proteinurií (21,22,48,50). Data o spolehlivosti těchto markerů pro diagnostiku preeklampsie nejsou dosud dostatečně specifická nebo prediktivní, abychom je mohli použít pro rutinní klinickou praxi (93,94).

Dopplerovská velocimetrie představuje metodu měření rychlosti toku krve v uterinní arterii ve II. trimestru. Abnormální rychlostní vlna je charakterizována vysokým indexem rezistence nebo časným diastolickým zářezem - „notch“ (96). Těhotenství, spojená s abnormálními dopplerometrickými nálezy v arteria uterina ve II. trimestru, jsou ohrožena více než šestinásobně zvýšeným rizikem vzniku preeklampsie (96). Senzitivita nálezů abnormálního dopplerometrického měření pro predikci onemocnění se pohybuje mezi 20-60% s pozitivní prediktivní hodnotou 6-40 %. (97-99). Metaanalýza 27 studií s celkem 12 994 ženami prokázala, že dopplerometrické vyšetření uterinní arterie má jako screeningový test na preeklampsii limitovanou hodnotu (98). Současná data nepodporují tento test pro rutinní screening těhotných žen na preeklampsii (93), ale vyšetření by mohlo být přínosné u žen s vysokým rizikem této choroby, pokud by existovala dostupná a efektivní preventivní léčba (22).

## **1.5 Prevence preeklampsie**

Během posledních dekád poukázalo několik randomizovaných studií na užití různých postupů k redukci počtu nebo závažnosti preeklampsie nebo obou zmíněných veličin. Výsledky těchto studií byly podkladem pro některá systémová zkoumání (13,22,100,101-104). Studie, zabývající se tímto tématem, zkoumaly restrikcii proteinů nebo soli ve stravě, suplementaci zinkem, hořčíkem, rybím olejem a vitamínem C a preventivní podávání diuretik, antihypertenziv či heparinu u žen s různými rizikovými faktory (100,105-107). Tyto pokusy měly omezený počet zkoumaných pacientek a výsledky ukázaly jen minimální přínos (105). Nálezy observačních studií naznačují, že heparin snižuje opakování preeklampsie u žen s trombofiliemi (108).

### **1.5.1 Suplementace kalcia**

Podle Cochrane review (102) bylo podávání kalcia spojeno se snížením hypertenze a preeklampsie pouze u žen ve vysokém riziku onemocnění a s nízkým příjmem kalcia v potravě, u žen s adekvátním příjmem kalcia v potravě nebyl rozdíl signifikantní. Žádné

vedlejší účinky podávání kalcia nebyly zaznamenány (101). Data směřovala k podpoře užívání kalcia pro ženy ve vysokém riziku preeklampsie a v komunitách s nízkým příjmem kalcia (101). Avšak ani u největší studie s 4589 probandkami nebyl nalezen žádný přesvědčivý důkaz pro efektivitu této suplementace a proto nebylo doporučeno podávat kalcium v rámci prevence preeklampsie v rozvinutých zemích (109). Přínos podávání kalcia u prevence preeklampsie u žen s nízkým příjmem kalcia zůstává stále nejasný (105, 22).

### **1.5.2 Aspirin a další protideštičkové léky**

Smyslem pro doporučení malých dávek aspirinu v profylaxi preeklampsie je fakt, že vazospasmus a koagulační abnormality u tohoto onemocnění jsou částečně způsobeny porušením rovnováhy mezi tromboxanem A<sub>2</sub> a prostacyklinem. Malé dávky aspirinu inhibují syntézu destičkového tromboxanu A<sub>2</sub>, minimálně ovlivňují syntézu prostacyklinu a působí tak ve prospěch prostacyklinu a jsou prevencí ve vývoji preeklampsie (110). Léčba aspirinem po 23. týdnu gestace není prevencí preeklampsie (97,99).

Většina probandek v randomizovaných studiích v prevenci preeklampsie užívala malé dávky aspirinu 500-1500 mg / 1 (102). Metaanalýza efektivity a bezpečnosti protideštičkové léčby (zejména aspirinu) v prevenci preeklampsie zahrnuje 51 studií s 36 500 ženami a potvrdila, že vlivem této léčby došlo ke snížení rizika onemocnění o 19% (102). Práce, které se zabývaly korelací předčasných porodů a preeklampsie (celkem 28 studií s 31 845 ženami), zjistily 7 % snížení rizika porodu před 37. týdnem v souborech žen s protideštičkovou léčbou. V těchto souborech byla rovněž pozorována 16 % redukce fetálního nebo neonatálního úmrtí a 8 % snížení růstové retardace plodů (IUGR).

Výsledky metaanalýz dále předpokládaly, že malé dávky aspirinu zlepšují průběh těhotenství žen s přetrvávajícím zvýšeným indexem rezistence, stanoveným dopplerometricky v 18. a 24. týdnu gestace (111). Naopak velká multicentrická studie, která zahrnovala 2539 rizikových žen s pregestačním diabetes mellitus léčeným inzulinem, chronickou hypertenzí, mnohočetnou graviditou nebo preeklampsií v předchozí graviditě neprokázala žádný benefit při užívání malých dávek aspirinu (111). Léčba aspirinem by měla vždy záviset na posouzení individuálního rizika pro možný vznik preeklampsie v graviditě (22,102,105,112). Je tedy možno konstatovat, že antiagregační terapie aspirinem v malých dávkách přináší jisté výhody v prevenci preeklampsie (102,103). Je nutno získat více informací, abychom mohli přesně stanovit, které ženy budou z léčby nejvíce profitovat. Neméně důležitá je znalost datace zahájení léčby a optimalizace podávané dávky.



## **1.6 Léčba preeklampsie**

Adekvátní a správná prenatální péče je v léčbě preeklampsie nejdůležitější. Sledování matky před porodem zahrnuje identifikaci žen vysokého rizika, časnou detekci klinických symptomů a detekci progresu onemocnění do závažného stavu. Po verifikaci diagnózy se následná léčba řídí dle výsledků matky a plodu. Hlavním objektem léčby preeklampsie musí být vždy bezpečnost matky. Ačkoliv indikace porodu zohledňuje vždy stav matky, nemusí být ideálním řešením pro velmi nezralý plod. Volba porodu či expektačního postupu závisí na gestačním stáří a stavu plodu, závažnosti mateřské kondice v době vyšetření, přítomnosti děložní činnosti a odtoku plodové vody. Detailní popis léčby ženy s preeklampií je předmětem mnoha vědeckých publikací (140,154).

Výsledky gravidit u žen s mírnou formou preeklampsie se začátkem po 38. týdnu gestace a později jsou srovnatelné s výsledky gravidit normotenzních žen. U těchto žen by měla být provedena indukce porodu. Indukce porodu je doporučena i pro ženy v nebo po 34. týdnu gestace v přítomnosti závažné preeklampsie, běžícího porodu, ruptury vaku blan nebo nepříznivého stavu plodu. V těchto případech má matka mírně zvýšené riziko abrupce placenty a riziko přechodu do eklampsie. U žen, které neporodily, je nutný intenzivní mateřský a fetální monitoring, jehož typ a frekvence závisí na gestačním stáří a závažnosti mateřského stavu a přítomnosti nebo chybění fetální růstové retardace.

### **1.6.1 Expektační postup při závažné preeklampsii**

Klinický stav těžké preeklampsie je charakterizován progresivním zhoršením jak stavu matky i plodu (113). Vzhledem k riziku nárůstu mateřské i neonatální morbidity a mortality, by měl být u těchto pacientek indukován porod, zejména v období po 34. týdnu gestace . Indikace porodu je jednoznačná v případě hrozící eklampsie (perzistující těžké symptomy) multiorganové dysfunkce, těžké IUGR, podezření na abrupci placenty či ohrožení plodu.. Z prací, publikovaných v Cochranově databázi a zabývajících se srovnáním postupu časně intervence a expektačním postupem (82), nevyplývá jednoznačné doporučení. Nicméně opatrný expektační postup by mohl redukovat morbiditu nezralých dětí (114-116).

## 1.6.2 Antihypertenzivní léčba

Léčba akutní hypertenze by měla předcházet potencionálním cerebrovaskulárním a kardiovaskulárním komplikacím, které jsou v rozvinutých zemích nejčastější příčinou mateřské morbidity a mortality (117,118). Přestože používání antihypertenziv u žen s preeklampií a závažnou elevací krevního tlaku se ukázalo jako výhodné při prevenci cerebrovaskulárních komplikací, tato léčba však není prevencí a nedokáže změnit přirozený průběh onemocnění u žen s mírnou preeklampií (2,119). Z údajů v Cochrane databázi, která obsahuje 24 studií s celkem 2815 pacientkami, srovnávajících efekt užívání antihypertenziva s placebem a bez medikace u skupin žen, vyplývá, že bylo prokázáno poloviční riziko vzniku závažné hypertenze, ale pouze malý rozdíl ve vzniku preeklampsie. Antihypertenzní medikace neovlivnila riziko perinatálního úmrtí, předčasného porodu nebo IUGR (104). Ani studie (1,3,63,121), které srovnávaly různá antihypertenzní generika, nezjistily podstatné rozdíly pro riziko vzniku těžké hypertenze a proteinurie nebo preeklampsie (102). Zůstává tedy nejasné, zda je léčba antihypertenzivy pro mírnou až střední hypertenzi během gravidity opodstatněná. Snížení tlaku u žen s mírnou formou onemocnění by mohlo mít za následek zvýšení rizika IUGR (104). Terapie je někdy doporučována u trvalých hodnot systolického tlaku minimálně 160 mm Hg a diastolického tlaku minimálně 110 mm Hg.

Důležitou otázkou zůstává i volba vhodného preparátu pro antihypertenzivní léčbu. Mezi nejčastěji užívané léky ke kontrole akutní závažné hypertenze u žen s preeklampií patří hydralazin, labetalol a nifedipin. Parenterální podání hydralazinu je lékem první volby u akutní hypertonické krize (1,3,121). Magee a spol (122) provedli metanalýzu 21 studií s celkem 893 pacientkami, 8 studií srovnávalo hydralazin s nifedipinem a 5 studií porovnávalo efekt hydralazinu s labetalolem. Terapie hydralazinem byla spojena s jednoznačně vyššími mateřskými vedlejšími účinky a zhoršovala mateřské a perinatální výsledky (111). Autoři se domnívají, že při léčbě závažné hypertenze u žen s preeklampií jsou třeba další adekvátně provedené klinické studie ke srovnání labetalolu s nifedipinem (122).

## 1.6.3 Užití kortikosteroidů ke zlepšení těhotenských výsledků u žen těžkou preeklampií nebo HELLP syndromem

Ze současných vědeckých studií nevyplývají jednoznačné závěry ohledně efektivity a léčby kortikosteroidy u žen s těžkou preeklampií s nebo bez HELLP syndromu (2). U studií ( 123)

žen s těžkou preeklampií a gestačním stářím mezi 26. – 34. týdny byla ve skupině s podaným betametazonem pozorována významná redukce syndromu dechové tísně u novorozenců, nižší výskyt neonatální intraventrikulární hemorrhagií, infekcí a neonatálních úmrtí. Nebyly pozorovány žádné mateřské komplikace. Vzhledem k malé velikosti studovaných skupin nebyl získán žádný důkaz, který by podporoval nebo kontraindikoval antenatální nebo postpartální použití steroidů u HELLP syndromu a také preeklampsie. Vyjimku činí samozřejmě kortikoidy indukovaná maturace plic plodu před 34. týdnem (9, 123,124).

#### **1.6.4 Léčba volumoexpandéry**

Část žen s těžkou preeklampií má omezené množství cirkulující plasmy a je hemokontrovaná (1). Zvýšení intravaskulárního objemu podáním koloidů nebo krystaloidů má za následek zlepšení mateřské systémové a uteroplacentární cirkulace (125). Aplikace intravaskulárních expandérů objemu s sebou nese vážná rizika hyperhydratace, která může vést k plicnímu nebo cerebrálnímu edému. Doplnění cirkulujícího objemu vyžaduje rovněž invazivní monitoring intravaskulárního tlaku, spojený s řadou rizik (126). Závěry provedených studií, které srovnávaly podání koloidů s placebem nebo bez podání volumoexpanze podporují teorii, že zvýšení plasmatického objemu nepřináší žádná pozitiva (127).

#### **1.6.5 Prevence křečí a kontrola akutních křečí**

Eklampsie je definována jako nástup křečí u žen, které mají gestační hypertenzi nebo preeklampsii. Mnoho randomizovaných studií srovnává efektivitu léčby síranem hořečnatým ( $MgSO_4$ ) s dalšími antikonvulzivy (diazepamem, fenytoinem, lytickým koktejlem) u žen s eklampií (128). Aplikace  $MgSO_4$  je spojena s průkazně nižším počtem recidiv křečí a mateřských úmrtí ve srovnání s jinými antikonvulzivy (128).

Podávání  $MgSO_4$  u žen s preeklampií připadá v úvahu v prevenci či ke snížení počtu eklampií a jejich komplikací (129). Sekundární přínos prevence  $MgSO_4$  u žen s těžkou preeklampií zahrnuje rovněž snížení mateřské a perinatální morbidit a redukuje počet progresí do těžkého stavu u žen s mírnou preeklampií (129,130). Magpie studie, dosud největší práce na toto téma, zahrnovala 10141 žen s preeklampií (zejména v rozvojových

zemích) a učinila závěr, že počet eklamsií byl výrazně nižší u MgSO<sub>4</sub> léčených žen (131). Léčba MgSO<sub>4</sub> však i u závažné preeklampsie neovlivnila závažné mateřské komplikace - pulmonární edém, iktus, jaterní hematomy nebo renální selhání (129,130). Z dostupných údajů vyplývá, že MgSO<sub>4</sub> by mělo být podáno během porodu a ihned po porodu u žen s těžkou preeklamsií, přestože přínos léčby MgSO<sub>4</sub> je u lehké formy preeklampsie nejednoznačný (129).

## **1.7 Atypické formy preeklampsie**

Hypertenze je nečastějším onemocněním v graviditě (1,2). Termín gestační hypertenze - preeklampsie se používá na popis širokého spektra onemocnění pacientek od mírného zvýšení krevního tlaku až po těžké hypertenze s různými orgánovými změnami, které zahrnují akutní gestační hypertenzi, preeklampsii, eklampsii a HELLP syndrom.

### **1.7.1 Gestační hypertenze bez proteinurie**

Proteinurie je u preeklampsie známkou poškození bazální membrány glomerulů a snížením zpětné resorpce bílkoviny v tubulech. V současné době není tento příznak nutný pro stanovení klinické diagnózy preeklampsie nebo eklampsie (2). Ke stanovení diagnózy je dostačující přítomnost gestační hypertenze ve spojení s perzistujícími symptomy (bolest v pravém horním kvadrantu břicha, epigastrická bolest, retrosternální hrudní bolest, nausea a vomitus, dyspnoe při kongestivním srdečním selhání, bolest hlavy, nereagující na podání analgetik, změny vize, změny duševního chování, krvácení ze slizničních membrán a žloutenka) nebo při abnormálních laboratorních testech (perzistující proteinurie větší než 300mg/24hod, trombocytopenie pod 100 000/mm<sup>3</sup>, zvýšení transamináz nad dvojnásobnou mez fyziologických hodnot, elevace sérového kreatininu a laktátdehydrogenázy nad dvojnásobek normy (141). Do preeklampsie progreduje 25-45 % žen s mírnou gestační hypertenzí v závislosti na gestačním stáří v době nástupu hypertenze. (v případě vzniku gestační hypertenze před 32. týdnem činí toto riziko až 50 %) a většina žen porodí předčasně či u nich dochází k růstové retardaci plodu (144-146). Ženy s mírnou gestační hypertenzí vyžadují intenzivní prenatální monitoring včetně sériových hodnocení počtu trombocytů, jaterních enzymů a stanovení fetální biometrie. Závažná gestační hypertenze bývá spojena

s nežádoucími mateřsko-perinatálními výsledky (144-146). Zhodnocením dvou multicentrických studií (135,145), srovnávajících výsledky žen s těžkou gestační hypertenzí s výsledky žen s mírnou nebo závažnou preeklampsií, bylo zjištěno, že závažná gestační hypertenze je spojena s vyšší mateřskou a perinatální morbiditou než u žen s mírnou preeklampsií a odpovídá nálezům žen se závažnou preeklampsií (135,146). Ženy s nekorigovanou závažnou gestační hypertenzí nebo ženy s orgánovým postižením s hypertenzí by měly být léčeny jako ženy se závažnou preeklampsií. Léčba zahrnuje hospitalizaci ženy ke korekci a kontrole hypertenze a v případě perzistence nekorigovatelné hypertenze či symptomů terminaci gravidity po 34. týdnu (nebo dříve, pokud je indikováno) (147).

### **1.7.2 Capillary leak syndrom - syndrom kapilárního úniku**

Hlavním diagnostickým znakem preeklampsie je hypertenze, přesto se u některých pacientek dle současných názorů onemocnění může manifestovat atypickými klinickými známkami. Preeklampsie se v těchto případech manifestuje formou kapilárního úniku (těžká proteinurie, ascites, plicní edém), nadměrným přírůstkem hmotnosti větším než 2 kg/ týden nebo spektrem abnormální hemostázy s multiorgánovým postižením (136,149). V případě těchto klinických projevů je u žen doporučováno zhodnocení počtu trombocytů, jaterních enzymů a renálních funkcí a sledování známek klasické preeklampsie. Ženy se zmíněnými symptomy nebo s abnormálními krevními testy by měly být léčeny jako ženy s preeklampsií (138,144).

### **1.7.3 Preeklampsie- eklampsie před 20. týdnem gravidity**

Preeklampsie nebo eklampsie, která vznikne před 20. týdnem gestace, byla popsána u molární či hydropicky změněné placenty nezávisle na přítomnosti plodu (140,155). Raritně se může preeklampsie-eklampsie rozvinout i během první poloviny těhotenství bez molární degenerace placenty (158,160). Přítomnost hypertenze, proteinurie a abnormálních laboratorních testů před 20. týdnem gestace se může objevit na základě lupusové nefritidy, hemolyticko-uremického syndromu, antifosfolipidového syndromu nebo trombocytopenické trombocytopenické purpury (161). Je nutné důkladné vyšetření těchto žen k vyloučení jiných onemocnění. Na ženy, u kterých dojde ke křečím ve spojení s hypertenzí a proteinurií v první

polovině těhotenství, by mělo být nahlíženo jako na ženy s eklampsií do doby verifikace diagnózy. U těchto žen by mělo být současně provedeno ultrazvukové vyšetření dělohy pro vyloučení molárního těhotenství a cystickou nebo hydropickou degeneraci placenty. V diagnostické rozvaze může též pomoci dopplerometrické vyšetření uterinních arterií, které může prokázat klasický „notching“, který charakterizuje zvýšený odpor v placentě u žen s preeklampsií. Citlivost tohoto testu u pacientek s časným průkazem preeklampsie se pohybuje v rozmezí 87-96 % (162,163).

#### **1.7.4 Pozdní postpartální preeklampsie- eklampsie a HELLP syndrom**

Pozdní postpartální preeklampsie - eklampsie je definována jako rozvoj symptomů v rozmezí více než 48 hodin, ale méně než 4 týdny po porodu (132,164). Původní předpoklad, že preeklampsie a eklampsie může vzniknout jen do 48 hodin po porodu, popřely publikované studie, které potvrzují existenci pozdní postpartální preeklampsie - eklampsie (165-170). Každá žena s anamnézou křečí vzniklých v intervalu větším než 48 hodin od porodu, u které je přítomna hypertenze, proteinurie či jiné symptomy preeklampsie, by měla být považována za eklamptickou do doby vyloučení diagnózy (138). Diferenciálně diagnosticky je nutné vyloučit cerebrovaskulární příhody (intrakraniální krvácení, rupturu aneuryzmatu, arteriální embolii nebo trombózu, cerebrální venózní trombózu, cerebrální vaskulitidu, hypoxicko-ischemickou encefalopatii, angiomy), hypertenzivní encefalopatii, záchvatovitá onemocnění, mozkové tumory, gestační trofoblastickou nemoc, metabolická onemocnění, reverzibilní leukoencefalopatický syndrom, antifosfolipidový syndrom, trombotickou trombocytopenickou purpuru a postpunkční syndrom. Pacientky, u kterých nedojde k výraznému zlepšení po terapii křečových stavů a po korekci hypertenze, a ženy s lokalizovaným nálezem při neurologickém vyšetření, by měly být nadále intenzivně vyšetřovány dalšími neurodiagnostickými testy (171). Klasickým nálezem u preeklampsie-eklamptické je zadní reverzní encefalopatický syndrom. Při výskytu dosud nevysvětlené slepoty nebo při dalších neurologických deficitech je nutné pátrat po syndromu spontánní reverzibilní vaskulopatie nebo cerebrální angiopatie (172). Tyto stavy mohou být diagnostikovány prostřednictvím magnetické rezonanční angiografie nebo klasické cerebrální angiografie.

Přibližně ve 20-30 % žen se HELLP syndrom manifestuje po 48 hodinách po porodu (148). Ve většině případů představuje porod nejzazší řešení preeklampsie. U části pacientek se HELLP syndrom může zhoršit až po porodu novorozence. U žen, u kterých se objevily první

příznaky HELLP syndromu až po porodu, by měla následovat rychlá diagnostika ke zhodnocení přítomnosti těžké preeklampsie. Diferenciálně diagnosticky je nutné vyloučit trombotickou trombocytopenickou purpuru, hemolyticko uremický syndrom nebo zhoršení systémového lupus erythematoses (161).

Kortikosteroidy jsou doporučované pro indukci plicní zralosti plodu u těžké preeklampsie do 34. týdne gestace (147). Současně však někteří autoři doporučují aplikaci kortikosteroidů, zejména dexametazonu, u pacientek s parciálním nebo kompletním HELLP syndromem před a ihned po porodu s cílem zlepšit laboratorní nálezy rodičky a zkrátit nutnou dobu hospitalizace. Vyčerpávající přehled o této problematice je popsán Martinem a spolupracovníky (148). Užití kortikosteroidů před porodem může prodloužit nástup HELLP syndromu až do období post partum. Dle současné literatury aplikace intravenózního dexametazonu po porodu ke zlepšení mateřských výsledků a stavu u žen s HELLP syndromem zůstává nadále kontroverzní (173-175). Většina studií, popisující přínos dexametazonu, byla retrospektivní a srovnávala jen omezený počet případů. Dvě současné, dvojitě zaslepené a placebo kontrolované multicentrické studie (173,174), které srovnávaly intravenózní podání dexametazonu u žen s antepartálním a postpartálním HELLP syndromem, neprokázaly žádné zlepšení v laboratorních nálezech matek, mateřské morbiditě a délce nutné hospitalizace. Bude nutné získat více údajů, abychom tuto otázku mohli spolehlivě rozřešit. Dosud platí, že použití intravenózního dexamethasonu ke zlepšení mateřských výsledků zůstává experimentální (176).

## 2 Cíl práce

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

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

Cílem první části práce bylo stanovit hladiny osmi vybraných antifosfolipidových protilátek (*proti fosfatidylserinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu a kyselině fosfatidové, annexinu V, kardiolipinu a  $\beta$ 2-glykoproteinu I*) u žen s preeklampsií v období těsně před terminací gravidity, porovnat tyto hodnoty s hodnotami kontrolního souboru žen a zjistit, zda přítomnost těchto protilátek by mohla splňovat účel markeru pro stanovení rizika vývoje preeklampsie v pozdní gestaci.

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



## **3 Materiál a metodika**

### ***3.1 Soubor***

Pacientky naší studie byly definovány na základě předem stanovených vstupních kritérií. Vyšetřovaný soubor tvořily ženy s diagnózou preeklampsie (PE), které byly hospitalizovány v období od 1.1.2007 do 31. 12. 2008 na Gynekologicko- porodnické klinice Fakultní nemocnice v Plzni a hospitalizace byla ukončena porodem. Diagnóza PE byla stanovena na základě kombinace klinického nálezu a biochemických parametrů dle diagnostických kritérii doporučených American College of Obstetricians and Gynecologist (150). Vstupními kritérii do studie bylo zvýšení krevního tlaku (TK) nad 140/ 90 mm Hg, detekce proteinurie (při vyšetření dvou jednorázových vzorků moči, získaných v 6 hodinovém intervalu hodnota vyšší než 300 mg/ l) a přítomnost dvou dalších příznaků (elevace hladiny kyseliny močové v séru, oligurie méně než 500 ml/ 24 hodin, plicní edém, bolesti hlavy, poruchy visu, bolest v epigastriu nebo v pravém horním kvadrantu). Ženy s preeklampsií měly negativní anamnézu na výskyt cévní trombózy, na přítomnost přidruženého autoimunitního onemocnění či genitální infekce. Podmínkou zařazení do studie byl rovněž negativní výsledek sérologického vyšetření protilátek proti syfilis, proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV-Human Immunodeficiency Virus) a proti povrchovému antigenu hepatitidy B viru (HbsAg-Hepatitis B Surface Antigen). Celkem bylo zařazeno 55 žen.

Kontrolní skupinu tvořilo 55 zdravých žen, které porodily ve sledovaném období na Gynekologicko-porodnické klinice LF UK a FN v Plzni. Podmínkou pro zařazení do kontrolní skupiny byla absence preeklampsie, negativní anamnéza na výskyt abortů, hypertenze, arteriálních nebo venózních trombóz a autoimunitních chorob a negativní výsledek sérologického vyšetření protilátek proti syfilis, HIV a HbsAg. V době vyšetření ženy neměly akutní genitální infekci a byly afebrilní. Ve všech případech byly ženy před zahájením studie informovány a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla vedena dle zásad správné klinické praxe v rámci Helsinského protokolu (149).

### ***3.2 Protokol studie***

Po zařazení do skupin byly ženám odebrány anamnestické údaje, týkající se předešlých gravidit s důrazem na výskyt PE a provedeno gynekologické vyšetření. U žen byl vypočten

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

### **3.3 Metodika studie**

#### **3.3.1 Stanovení hladin antifosfolipidových protilátek**

Ženám bylo odebráno 5 ml srážlivé venózní krve. Získaná odseparovaná séra byla skladována při teplotě -18 stupňů do vyšetření antifosfolipidových protilátek. Testovaná séra byla bez známek hemolýzy. Pro detekci antifosfolipidových protilátek, zaměřených proti fosfatidylserinu, fosfatidyl-ethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu a kyselině fosfatidové byl použita home made metoda ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), která byla standartizována podle doporučení Evropského fóra antifosfolipidových protilátek z r. 2004 pro detekci antifosfolipidových protilátek (bez ohledu na způsob kalibrace detekční soupravy). Vyšetření byla prováděna v dubletu, k výpočtu cut- off byl použit 95 % interval spolehlivosti a byly použity dvě externí kontroly - jedna nižší nežli cut-off a druhá středně pozitivní. Polystyrenové mikrotitrační destičky MaxiSorp (Nunc-Immuno™ Plates ) byly potaženy 50 uml fosfolipidu (50 ul /ml metanol) a ponechány přes noc při teplotě 4C. Použité purifikované fosfolipidy byly získány z komerčního zdroje (Sigma, St. Louis, Mo, USA). Následující den byly jamky destiček blokovány roztokem, obsahujícím 10% fetální bovinní

sérum v 1M Tris buffered saline (TBS: 250 mol/l Tris, 1,5 mol/l NaCl) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly polystyrenové mikrotitrační destičky promyty třikrát v pufovacím roztoku ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ , pH 9,6). Séra žen z vyšetřovaného i kontrolního souboru byla naředěna v poměru 1:50 v TBS (s obsahem 10% fetálního bovinního séra), byla poté přidána do jamek titrační destičky. Následovala dvouhodinová inkubace destiček při pokojové teplotě a destičky pak byly pětkrát promyty TBS, obsahujícím 0,05% Tween 20. Poté bylo přidáno 50 ul antihumánního imunoglobulinu IgA, IgG, IgM konjugovaného s peroxidázou a inkubováno po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly destičky pětkrát promyty v TBS - Tween. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 50 ul chromogenního substrátu a inkubováno v temnu po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 50 ul 2 mol/l kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) na 1 jamku. Optická hustota každé jamky byla stanovena pomocí automatického vertikálního spektrofotometru Titertek Multiscan MCC/340 (Flow Lab, Londýn, Velká Británie) při vlnové délce 492 nm. Základní optická hustota vzorků byla stanovena u všech patientských sér, ředěných 1:50 v jamkách na identických mikrotitračních destičkách potažených metanolem, avšak bez fosfolipidů. Výsledky byly vyjádřeny v delta OD (optical density).

Pro detekci a kvantifikaci sérových anti-annexinových protilátek v izotopech IgG a IgM byl použit komerčně vyráběný ELISA testy Anti-Annexin V (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany), výsledky byly vyjádřeny v U/ml. Antikardiolipinové protilátky (ACLA) v izotopech IgG a IgM byly stanovovány pomocí komerčně vyráběného testu Anti-Cardiolipin IgG/ IgM (Organtec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany), výsledky byly vyjádřeny v jednotkách GPL a MPL U/ml pro ACLA. Anti  $\beta_2$  - glykoproteinové protilátky (anti  $\beta_2$ - GPI) v izotopech IgG a IgA byly detekovány a kvantifikovány pomocí komerčně vyráběného testu Anti  $\beta_2$  - glykoprotein 1 ELISA (Euroimmun, Lubeck, Germany). Výsledky byly vyjádřeny v U/ml pro anti  $\beta_2$ -GPI.

### Tabulka 1

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

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

**Legenda:** hodnoty udány v mezinárodních jednotkách na ml (U/ml).  
**IgG**- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M

## Tabulka 2

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

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

**Legenda:** hodnoty udány v mezinárodních jednotkách na ml (U/ml)  
**IgG**- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M; **IgA** - imunoglobulin A

### 3.3.2 Stanovení trombofilních stavů

Stanovení trombofilních stavů prováděla certifikovaná laboratoř Oddělení lékařské genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň.

Vyšetření mutací v genech trombofilních faktorů (MTHFR, FV a FII) bylo provedeno analýzou DNA lymfocytů periferní krve pomocí metody real-time PCR. Krev byla odebrána rodičkám na porodním sále v první době porodní a to jak u zkoumané skupiny pacientek s preeklampsií, tak i u zdravých rodiček, které sloužily jako kontrolní soubor. Krev byla odebrána do zkumavky s EDTA s objemem v rozmezí 2- 4 ml krve a do zpracování byla skladována při 4-8°C. Každý vzorek byl zaevidován a označen tak, aby

byl v budoucnu jednoznačně dohledatelný.

Ze vzorku plné krve byla DNA izolována pomocí kitu QIAAmp DNA Mini (QIAGEN) přesně podle návodu výrobce. DNA byla z buňky uvolněna po buněčné lýze, které bylo dosaženo v roztocích obsahujících velké množství chaotropních iontů v přítomnosti Proteinázy K. Přidáním vhodného množství ethanolu bylo dosaženo patřičných podmínek pro navázání DNA na silikonovou membránu kolonky. Toto navázání je reverzibilní a specifické pro nukleové kyseliny. Proplachovací kroky sloužily k odstranění nečistot a kontaminace. Ve finálním kroku byla DNA z membrány uvolněna roztokem o nízké iontové síle v mírně alkalickém elučním pufru. Výsledek izolace byl zkontrolován spektrofotometricky a výsledná koncentrace DNA byla upravena tak, aby odpovídala požadavkům pro následnou RT-PCR analýzu (40-60 ng/ul).

Trombofilní mutace byly vyšetřeny pomocí kitů pro daný typ mutace. Pro mutaci C667T v genu pro MTHFR byl použit Kit QGENE MTHFR C667T, pro mutaci A1298C v genu pro MTHFR kit QGENE MTHFR A1298C, pro mutaci v genu pro faktor V kit QGENEFV a pro mutaci v genu pro faktor II kit QGENEFII, všechny od firmy IAB a.s. Analýza byla provedena na real-time PCR přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research). Teplotní profil PCR reakce byl na přístroji nastaven přesně podle návodu výrobce kitů. PCR reakce byla připravena smícháním Master mixu daného kitu se vzorkem DNA. Analýza vzorků byla provedena softwarem RotorGene 6000 na základě alelově specifické diskriminace, která umožňuje rozlišit zdravého homozygota, heterozygota a nemocného homozygota pro danou analyzovanou mutaci.

### **3.3.3 Ostatní biochemická vyšetření**

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

### **3.4 Statistika**

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

## 4 Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 55 žen s preeklampií, stejný počet žen tvořil kontrolní soubor. Průměrný věk žen ve vyšetřovaném souboru byl 29,6 let (směrodatná odchylka 4,51), kontrolního souboru 30,0 let (směrodatná odchylka 4,90). Ve vyšetřovaném souboru bylo 11 (20 %) kuřáček, v kontrolním souboru 6 (10,9%) žen. Průměrný body mas index (BMI) žen v době přijetí k hospitalizaci byl u vyšetřovaného souboru 31,6 (směrodatná odchylka 3,88), u kontrolního souboru činil 31,1 (směrodatná odchylka 4,90). Ve výše uvedených demografických údajích nebyly mezi soubory nalezeny statisticky významné rozdíly.

Při hodnocení parity žen s preeklampií bylo zjištěno 40 (72,7 %) primipar a pouze 15 (27,3%) žen byly multipary. V kontrolním souboru bylo rozložení parity následující: 27 (49,1 %) primipar a 28 (50,9%) žen multipar. U 47 (85 %) žen s preeklampií bylo indikováno ukončení gravidity operativně, v kontrolním souboru byla pouze u 11 (20 %) žen gravidita ukončena císařským řezem. Rozdíly v těchto sledovaných parametrech byly statisticky významné.

Průměrná délka gravidity u žen s preeklampií byla statisticky signifikantně nižší než u kontrolního souboru (34+6, směrodatná odchylka 2,51; 40+1, směrodatná odchylka 8,35). Celkem 32 % (18) gravidit bylo ukončeno operativně před dokončeným 34. týdnem gestace. Incidence závažné preeklampsie činila celkem 40 % (22 žen).

Měřením průměrného systolického a diastolického krevního tlaku byly ženy s preeklampií zjištěny signifikantně vyšší hodnoty (TK systolický 162,4 mmHg, směrodatná odchylka 10,8; TK diastolický 102,4 mmHg, směrodatná odchylka 6,37) ve srovnání s kontrolním souborem (TK systolický 123,6 mmHg, směrodatná odchylka 13,7; TK diastolický 83,4 mmHg, směrodatná odchylka 6,9). Oba soubory se statisticky významně lišily i v počtu krevních destiček (ženy s preeklampií měly průměrné hodnoty trombocytů 196 000 (směrodatná odchylka 88), ženy v kontrolním souboru 276 000 (směrodatná odchylka 75). Závažná proteinurie, hodnocená vizuálně na detekční škále stupněm nad 5, byla přítomna u 7 (12,7%) žen v souboru s preeklampií. Výše uvedená data jsou přehledně zobrazena v **tabulce 1**.

Tabulka 1

**Základní charakteristiky souboru žen s preeklampií a kontrolního souboru**

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

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

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

Tabulka 2

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

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

**Legenda:** Čísla udávají počet žen s detekovanými hladinami jednotlivých antifosfolipidových protilátek nad stanovenými hranicemi cut – off. **IgG**- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M;

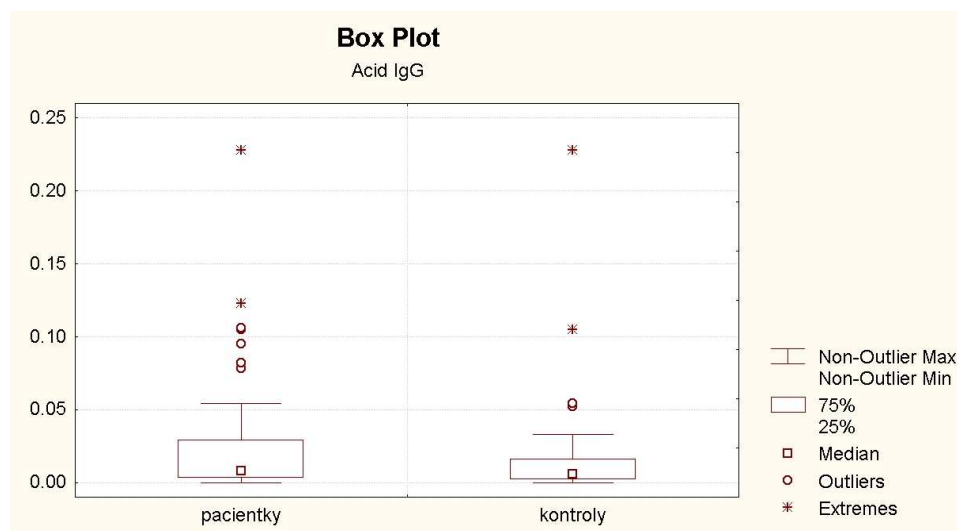


## 4.1 Výsledky vyšetření jednotlivých antifosfolipidových protilátek

### 4.1.1 Antifosfolipidové protilátky proti kyselině fosfatidové

V souboru pacientek s preeklamsií se plazmatické hladiny protilátek proti kyselině fosfatidové v izotopu IgG (Acid IgG) signifikantně nelišily od hodnoty protilátek žen z kontrolní skupiny- (průměr 0,033, směrodatná odchylka 0,055, median 0,008, interkvartilové rozmezí: 0,003 - 0,029; průměr 0,02, směrodatná odchylka 0,052, medián 0,006, interkvartilové rozmezí: 0,002- 0,016;  $p = 0,15$  (Wilcoxonův test) **graf 1**. Hodnocením poměru šancí (Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 1,5 (95% CI 0,41-5,87) pro zkoumané laboratorní cut off 0,1 U / ml (specifita a senzitivita nesignifikantní).

Graf 1

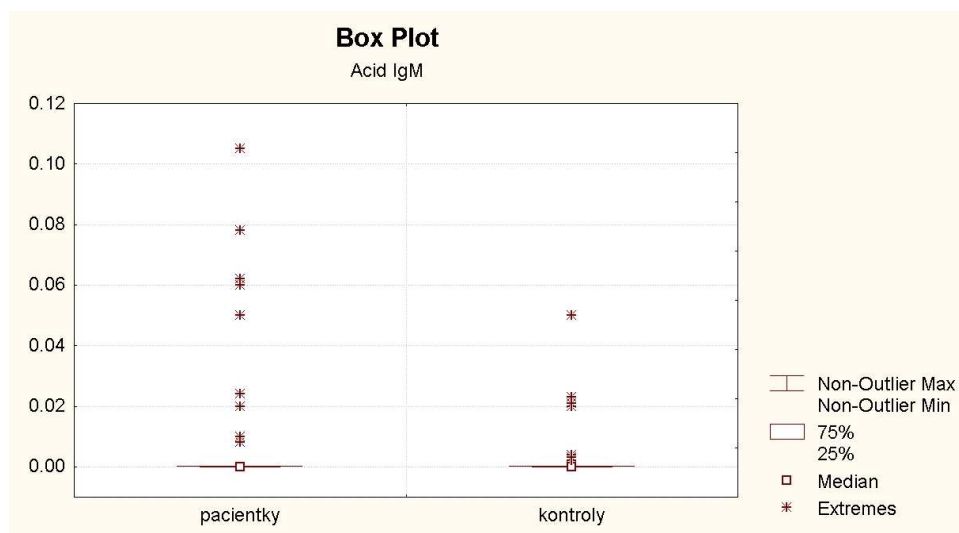


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimální a maximální hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami: kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

Plazmatické hladiny protilátek proti kyselině fosfatidové v izotopu IgM (Acid IgM) se v jednotlivých souborech rovněž signifikantně nelišily. (průměr 0,007, směrodatná odchylka 0,021, median 0,0, interkvartilové rozmezí: 0,0 - 0,0; průměr 0,003, směrodatná odchylka 0,008, medián 0,0, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0,00;  $p = 0,82$  (Wilcoxonův test) **graf 2**.

Hodnocením poměru šancí (Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 6,6 (95 % CI 0,779 - 56,80 pro zkoumané laboratorní cut-off 0,1 U/ ml (specifita a senzitivita nesignifikantní).

## Graf 2

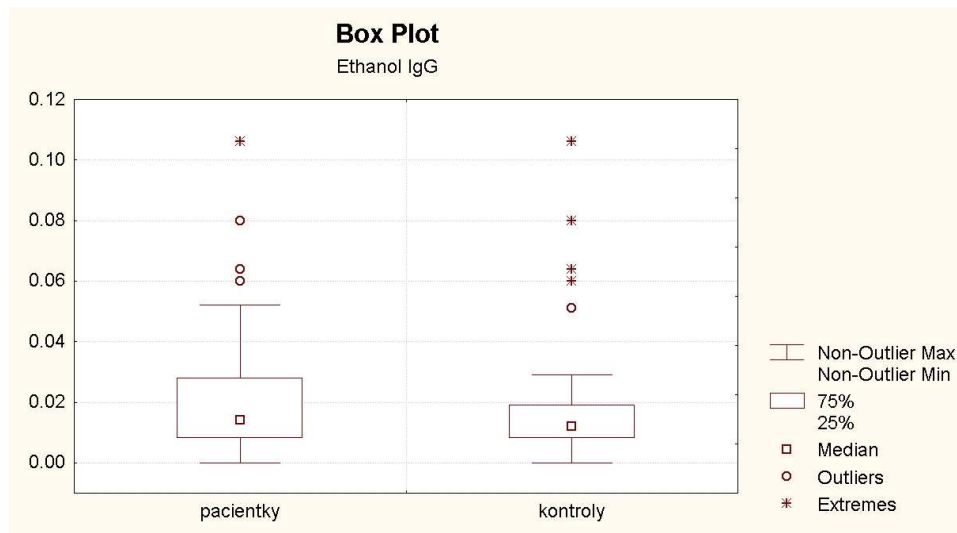


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

### 4.1.2 Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylethanolaminu

Mezi plazmatickými hladinami protilátek proti fosfatidylethanolaminu v izotopu IgG (Ethanol IgG) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi vyšetřovanými soubory žen. (průměr 0,021, směrodatná odchylka 0,02, medián 0,014, interkvartilové rozmezí: 0,008 - 0,028; průměr 0,019, směrodatná odchylka 0,02, medián 0,012, interkvartilové rozmezí: 0,008- 0, 019;  $p = 0,377$  (Wilcoxonův test) **graf 3**.

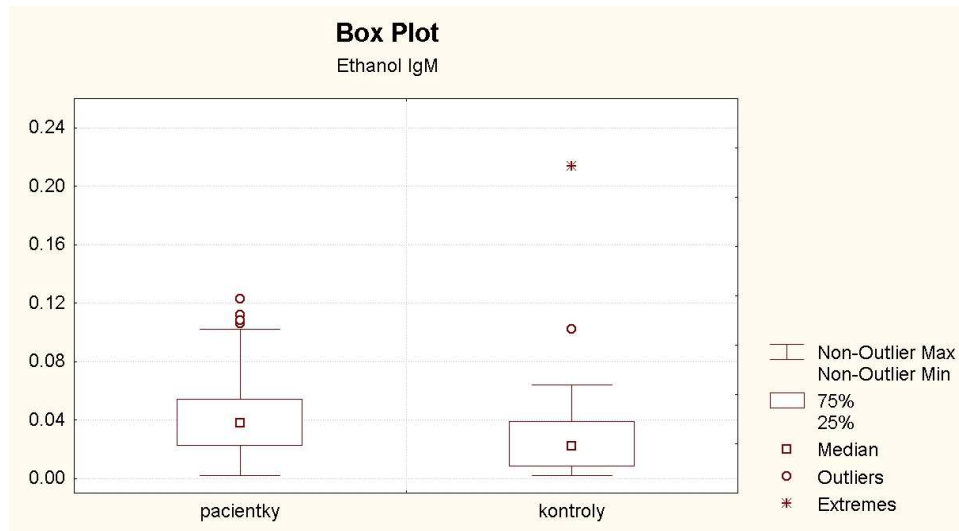
Graf 3



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

Plazmatické hladiny protilátek proti fosfatidylethanolaminu v izotopu IgM (Ethanol IgM) byly ve skupině žen s preeklampsií **statisticky významně vyšší** než v kontrolní skupině žen (průměr 0,041, směrodatná odchylka 0,03, medián 0,038, interkvartilové rozmezí: 0,008 - 0,039; průměr 0,029, směrodatná odchylka 0,03, medián 0,022, interkvartilové rozmezí: 0,008-0, 019;  **$p < 0,016$**  (Wilcoxonův test) **graf 4**. Hodnocením poměru šancí (Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 0,9 (95% CI 0,06-16,01 pro zkoumané laboratorní cut- off 0,1 U/ ml (specifita 96,1 %, senzitivita 12,7 %).

**Graf 4**

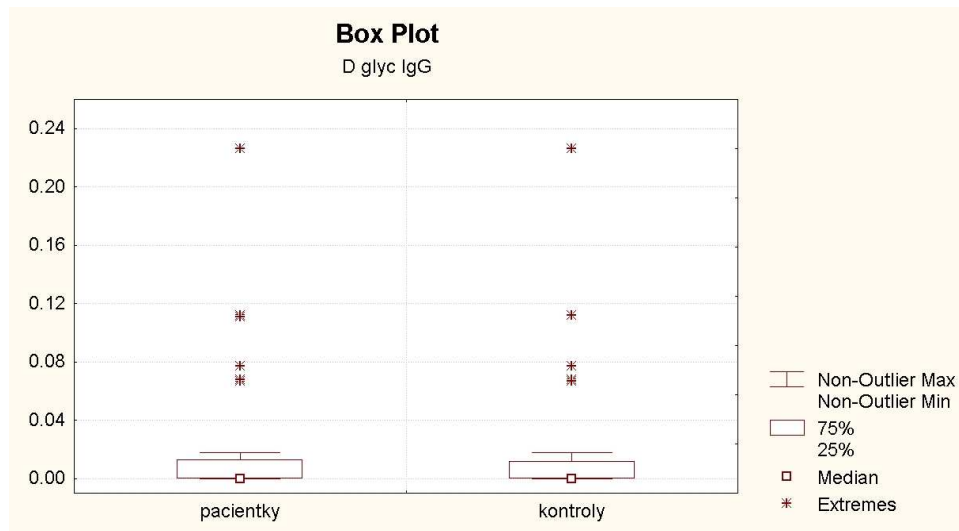


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimální a maximální hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

#### 4.1.3 Antifosfolipidové protilátky proti D- fosfatidylglycerolu

Plazmatické hladiny protilátek proti D- fosfatidylglycerolu v izotopu IgG (D Glyc IgG) v souboru u žen s preeklampií nebyly statisticky významně odlišné v porovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 0,015, směrodatná odchylka 0,03, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00 - 0,013; průměr 0,01, směrodatná odchylka 0,03, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0, 012;  $p = 0,90$  (Wilcoxonův test) **graf 5**. Hodnocením poměru šancí (Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 1, 52 95 % CI 0,24 - 9,5201 pro zkoumané laboratorní cut- off 0,1 U /ml (specifita a senzitivita nesignifikantní).

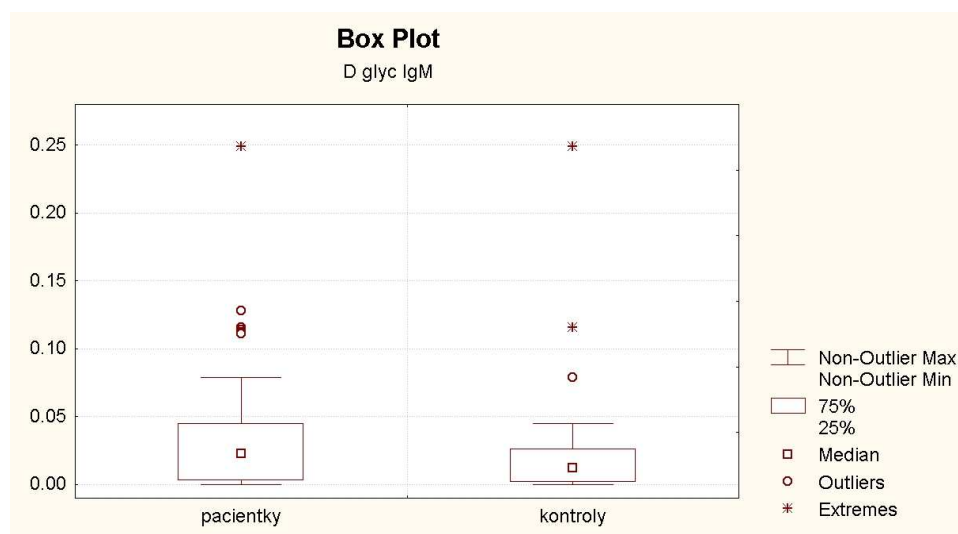
## Graf 5



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

Při porovnání plazmatických hladin protilátek proti D- fosfatidylglycerolu v izotopu IgM (D Glyc IgM) v souboru u žen s preeklampií a s kontrolní skupinou žen nebyly rovněž nalezeny statisticky významné rozdíly. (průměr 0,04, směrodatná odchylka 0,05, medián 0,022, interkvartilové rozmezí: 0,00 - 0,013; průměr 0,02, směrodatná odchylka 0,05, medián 0,012, interkvartilové rozmezí: 0,003- 0, 045;  $p = 0,10$  (Wilcoxonův test) **graf 6**. Hodnocením poměru šancí ( Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 3, 8 (95 % CI 0,76 - 19.51 pro zkoumané laboratorní cut- off 0,1 U/ml (specifita a senzitivita nesignifikantní).

## Graf 6

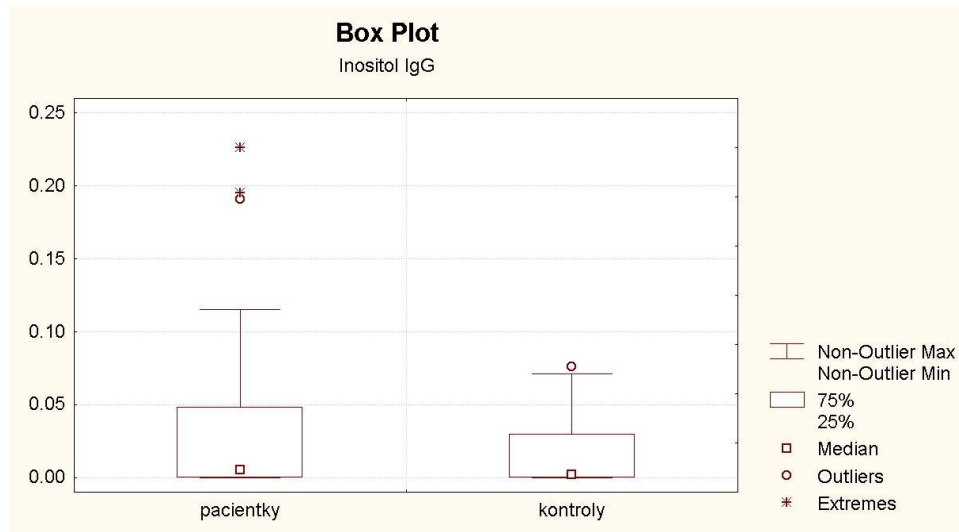


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

### 4.1.4 Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylinositolu

V souboru u žen s preeklamsií nebyly nalezeny statisticky odlišné hladiny protilátek proti fosfatidylinositolu v izotopu IgG (Inositol IgG) v porovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 0,033, směrodatná odchylka 0,051, medián 0,005, interkvartilové rozmezí: 0,00 - 0,048; průměr 0,014, směrodatná odchylka 0,021, medián 0,002, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0,03;  $p = 0,13$  (Wilcoxonův test) **graf 7**. Hodnocením poměru šancí (Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 2,9 (95 % CI 0,74 -11,81) pro zkoumané laboratorní cut-off 0,1 U/ml (specifita a senzitivita nesignifikantní).

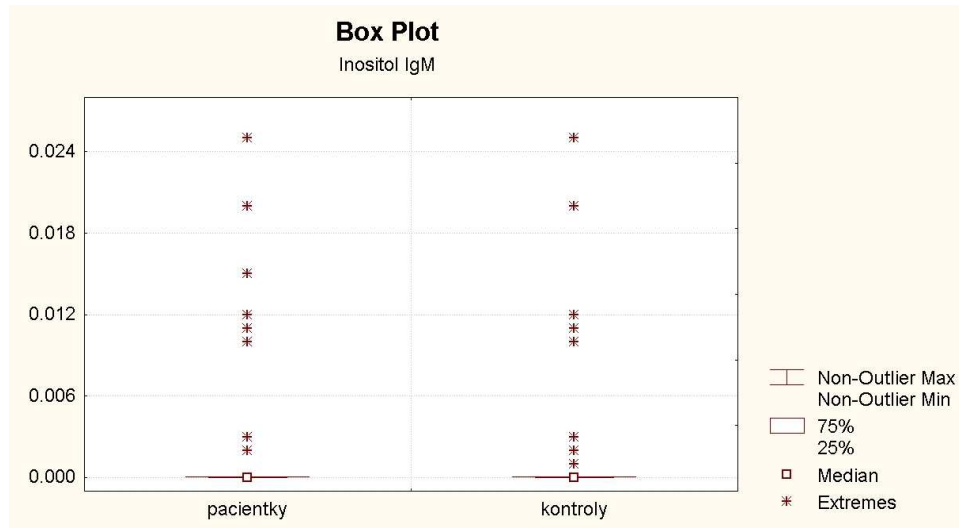
## Graf 7



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

Plazmatické hladiny protilátek proti fosfatidylinositolu v izotopu IgM (Inositol IgM) v souboru u žen s preeklampsií nebyly statisticky rozdílné v porovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 0,002, směrodatná odchylka 0,05, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00 - 0,00; průměr 0,01, směrodatná odchylka 0,04, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0,010;  $p = 0,59$  (Wilcoxonův test) **graf 8.**

Graf 8



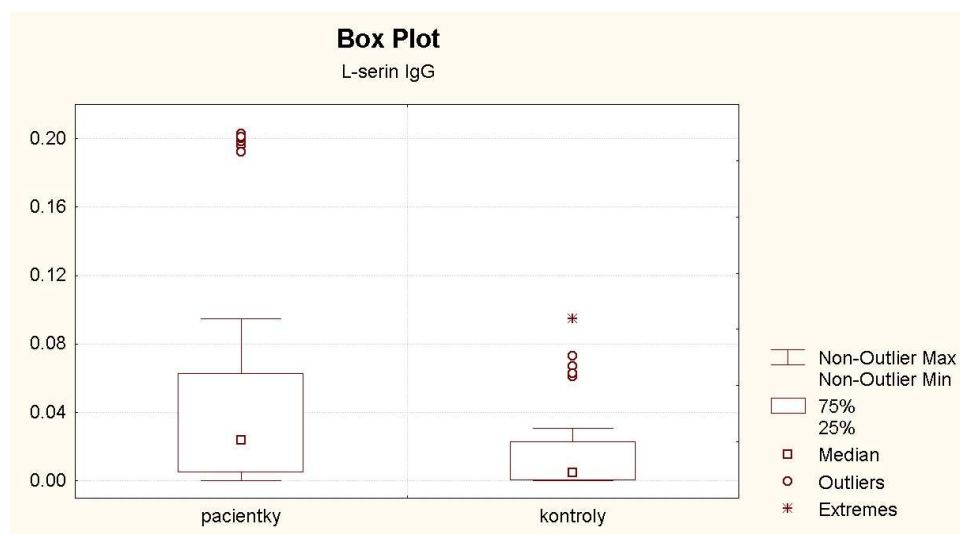
**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

#### 4.1.5 Antifosfolipidové protilátky proti fosfatidylserinu

Plazmatické hladiny protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgG (L- serin IgG) byly **statisticky významně vyšší** u pacientek s preeklampsí ve srovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 0,052, směrodatná odchylka 0.066, medián 0,024, interkvartilové rozmezí: 0,005 - 0,063; průměr 0,014, směrodatná odchylka 0,022, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00-0,023;  **$p < 0,0005$**  (Wilcoxonův test) **graf 9**.



## Graf 9

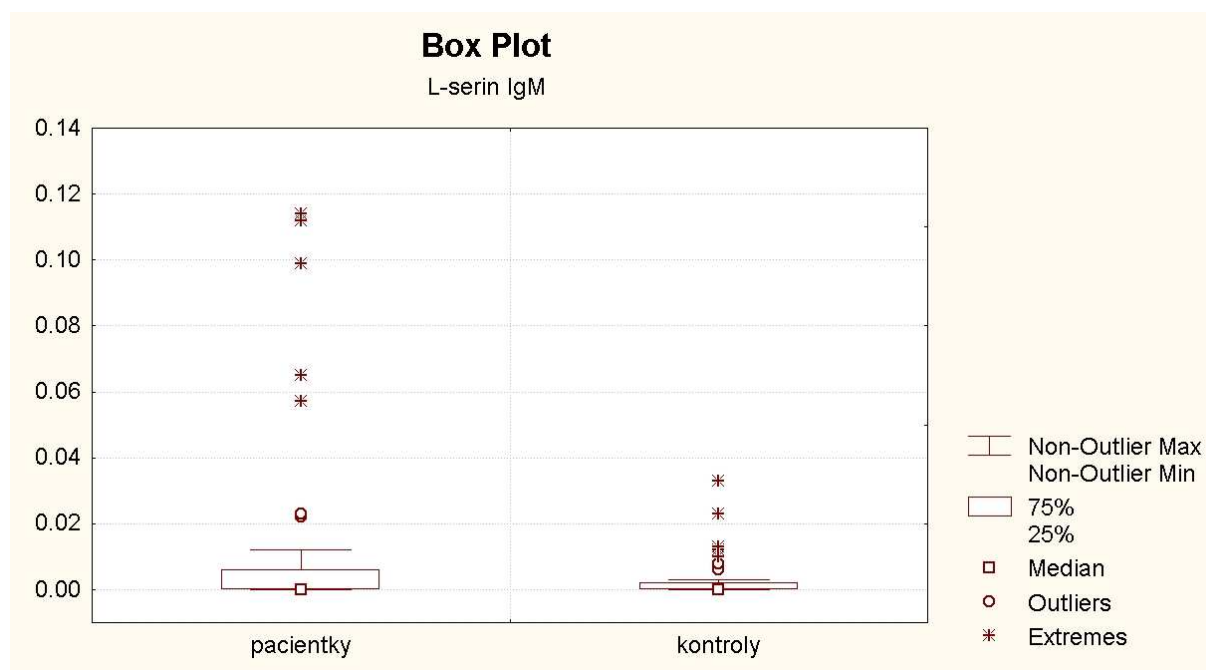


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám , které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

Z hodnocení pro zkoumané laboratorní cut off 0,1 U/ml vyplynula 98,1% specifita a 16,1 % senzitivita parametru, dle Fisherova exaktního testu byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,002$ ). Ke zvýšení senzitivity testu by bylo vhodné snížit cut off hodnotu (např. při cut- off 0,015 je senzitivita parametru 71% a specifita 60%).

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgM (L- serin IgM) u pacientek s preeklampsí ve srovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 0,011, směrodatná odchylka 0.026. medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00 - 0,006; průměr 0,002, směrodatná odchylka 0,05, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0,002;  $p > 0,29$  (Wilcoxonův test) **graf 10.**

Graf 10

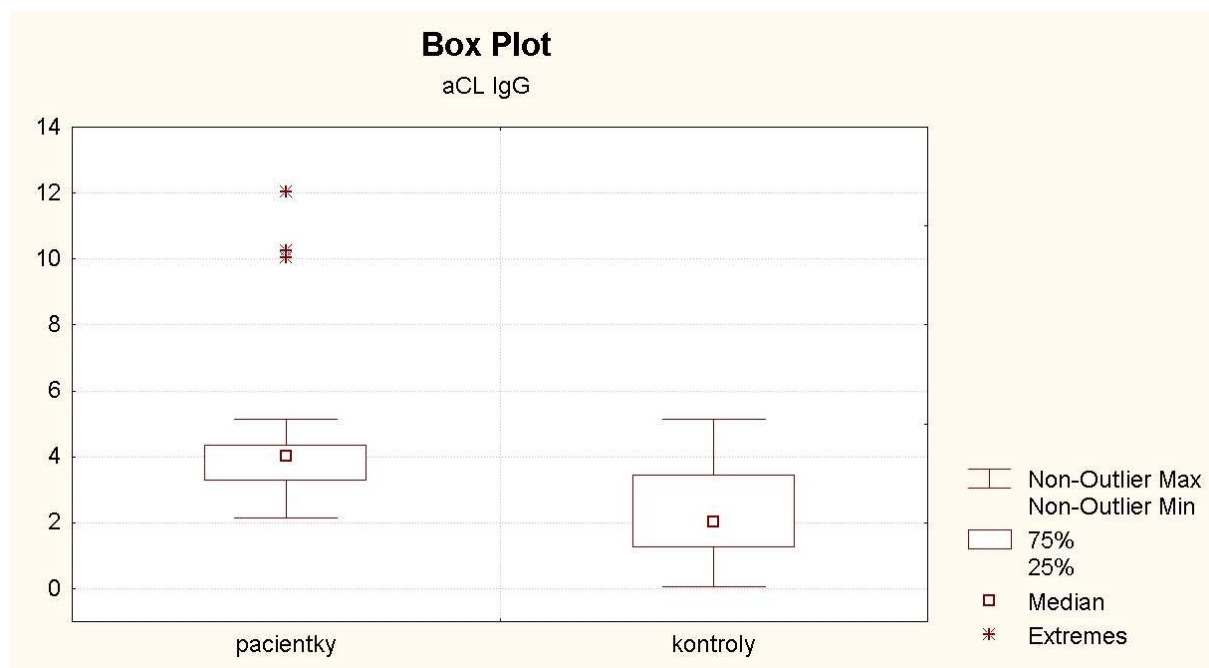


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám , které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

#### 4.1.6 Antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu

Plazmatické hladiny protilátek proti kardiolipinu v izotopu IgG (aCL IgG) u pacientek s preeklampsií byly **statisticky významně vyšší** ve srovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 4,53, směrodatná odchylka 2,53. medián 4,02, interkvartilové rozmezí: 3,26 - 4,35; průměr 2,48, směrodatná odchylka 2,25, medián 2,02, interkvartilové rozmezí: 1,24- 3,45;  **$p < 0,0001$**  (Wilcoxonův test) **graf 11.**

Graf 11

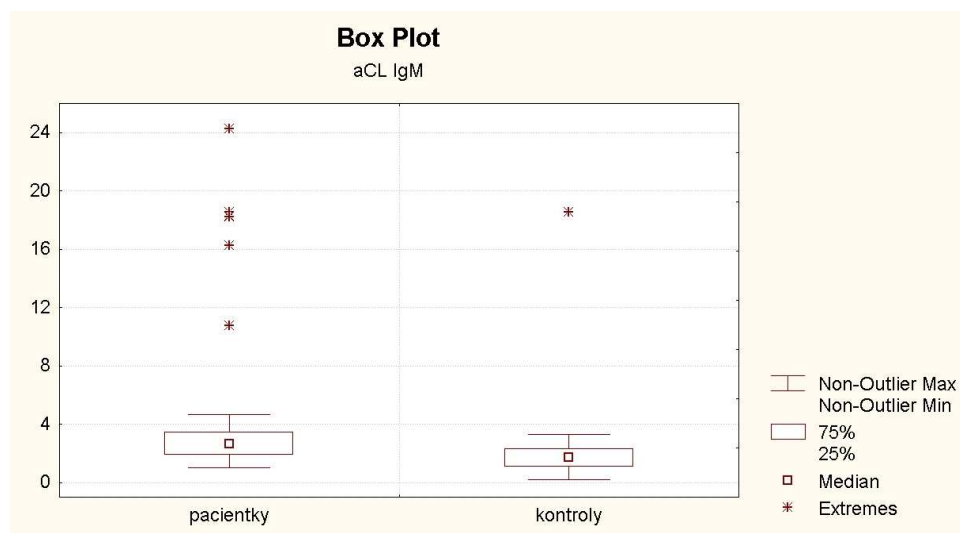


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimální a maximální hodnotám , které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

Z hodnocení pro zkoumané laboratorní cut off 10 U/ml vyplynula 98,2 % specificita a 12,7 % senzitivita parametru, dle Fisherova exaktního testu byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,05$ ). Ke zvýšení senzitivity testu by bylo vhodné snížit cut off hodnotu (např. při cut - off 0,015 je senzitivita parametru 71 % a specificita 60 %).

Plazmatické hladiny protilátek proti kardiolipinu v izotopu IgM (aCL IgM) u pacientek s preeklampsií se rovněž **statisticky významně lišily** od hodnot v kontrolní skupině žen. (průměr 4,10, směrodatná odchylka 5,07, medián 2,65, interkvartilové rozmezí: 1,88- 3,45; průměr 2,04, směrodatná odchylka 2,37, medián 1,69, interkvartilové rozmezí: 1,07- 2,30;  $p < 0,0001$  (Wilcoxonův test) **graf 12.**

## Graf 12



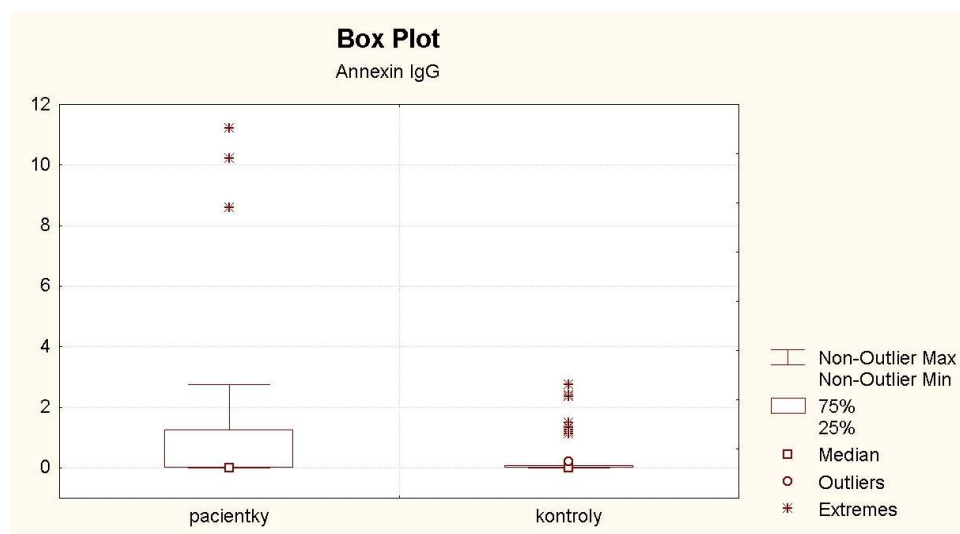
**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

Z hodnocení pro zkoumané laboratorní cut off 10 U/ml vyplynula 98 % specificita a 10,9 % senzitivita parametru, dle Fisherova exaktního testu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,11$ ). Ke zvýšení senzitivity testu by bylo vhodné snížit cut- off hodnotu (např. při cut – off 2,39 je senzitivita parametru 83,6% a specificita 52,7 %). Hodnocením poměru šancí ( Odds ratio) byla zjištěna statisticky nevýznamná hodnota 6,6 (95 % CI 0,76 -56,80) pro zkoumané laboratorní cut- off 10 U/ml.

### 4.1.7 Antifosfolipidové protilátky proti annexinu V

V souboru pacientek s preeklampsií se plazmatické hladiny protilátek proti annexinu V v izotopu IgG ( Annexin IgG) signifikantně nelišily od hodnoty protilátek žen z kontrolní skupiny (průměr 1,11, směrodatná odchylka 2,33, median 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00 – 1,24; průměr 0,35, směrodatná odchylka 0,70, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00-0,07;  $p = 0,10$  (Wilcoxonův test) **graf 13**.

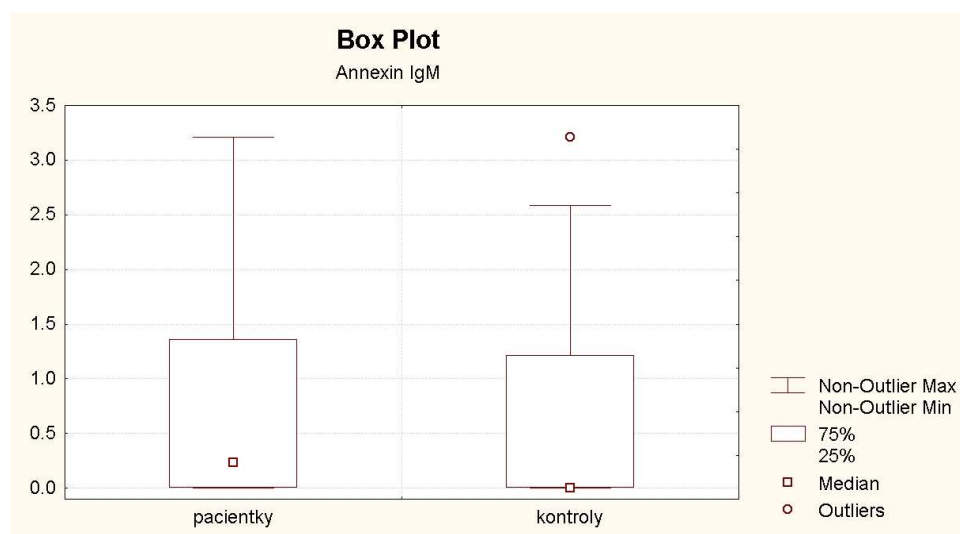
## Graf 13



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

V souboru pacientek s preeklampií se plazmatické hladiny protilátek proti annexinu V v izotopu IgM ( Annexin IgM) rovněž významně nelišily od hodnoty protilátek žen z kontrolní skupiny (průměr 0,82, směrodatná odchylka 0,98, median 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00 – 0,23; průměr 0,55, směrodatná odchylka 0,89, medián 0,00, interkvartilové rozmezí: 0,00- 1,21;  $p = 0,07$  (Wilcoxonův test) **graf 14.**

Graf 14

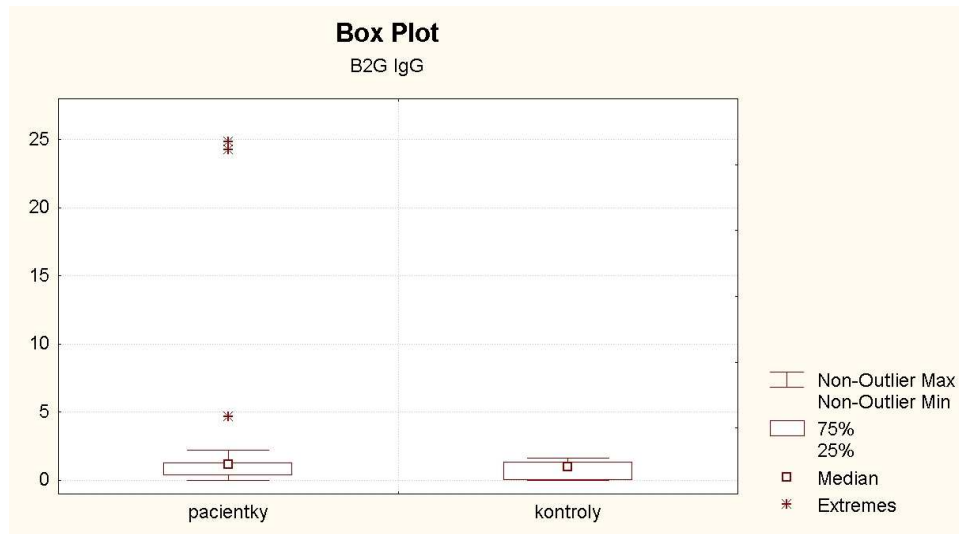


**Legenda:** Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka ( Non outlier Min) a horní úsečka ( Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám , které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty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

#### 4.1.8 Antifosfolipidové protilátky proti $\beta$ 2- glykoproteinu-I

V souboru žen s preeklampsií nebyly nalezeny statisticky odlišné hladiny protilátek proti  $\beta$ 2- glykoproteinu-I v izotopu IgG (B2G IgG) v porovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 1,77, směrodatná odchylka 4,5, medián 1,17, interkvartilové rozmezí: 0,32 - 1,27; průměr 0,77, směrodatná odchylka 0,61, medián 1,00, interkvartilové rozmezí: 0,00- 0,32  $p = 0,55$  (Wilcoxonův test) **graf 15**.

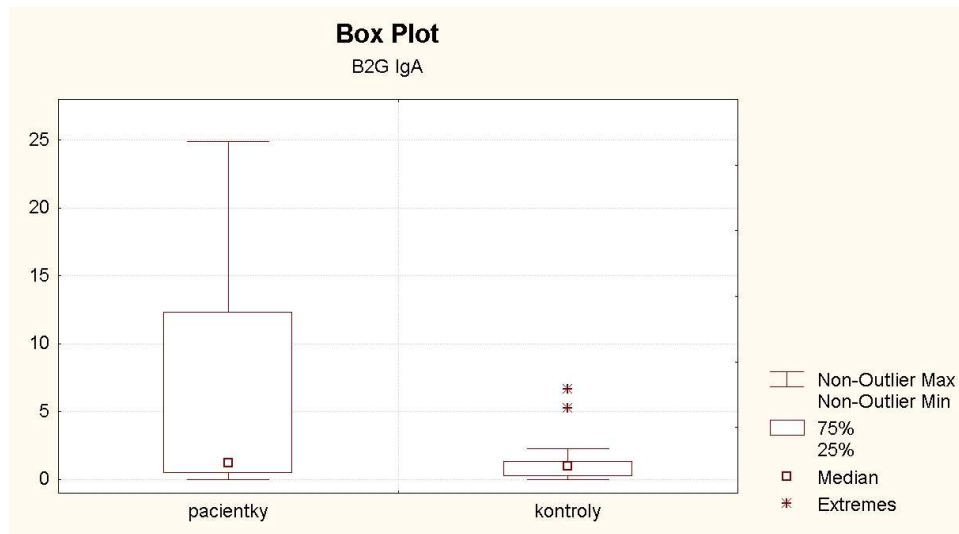
## Graf 15



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

Plazmatické hladiny protilátek proti  $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA (B2G IgA) u pacientek s preeklampsií byly **statisticky významně vyšší** ve srovnání s kontrolní skupinou žen. (průměr 5,44, směrodatná odchylka 6,9, medián 1,23, interkvartilové rozmezí: 0,47 – 12,34; průměr 1,03, směrodatná odchylka 1,15, medián 1,00, interkvartilové rozmezí: 0,21- 1,36;  $p < 0,0086$  (Wilcoxonův test) **graf 16**.

Graf 16



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

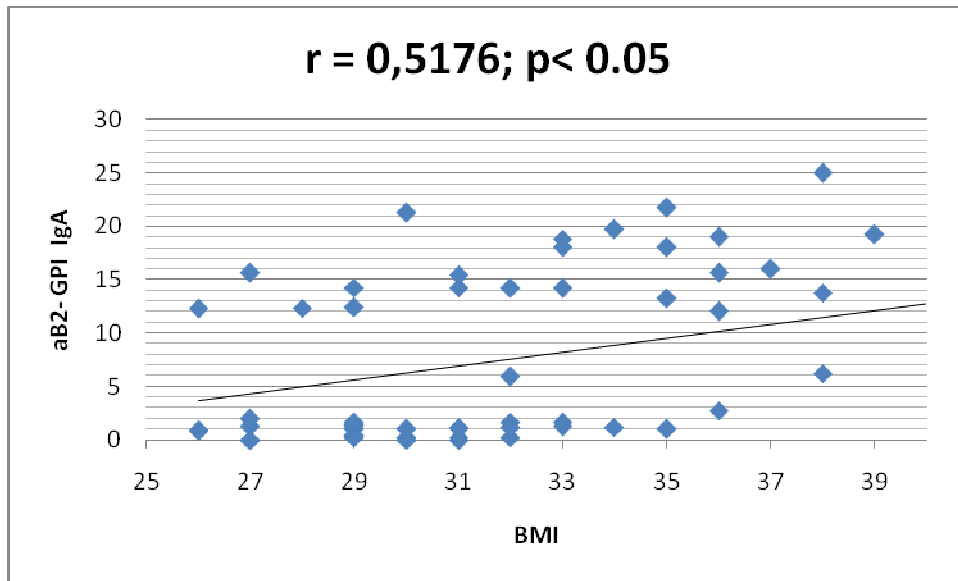
Z hodnocení pro zkoumané laboratorní cut off 10 U/ml vyplynula 100 % specificita a 30 % senzitivita parametru, dle Fisherova exaktního testu byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,001$ ). Ke zvýšení senzitivity testu by bylo vhodné snížit cut off hodnotu (např. při cut - off 1,5 je specificita 80% a senzitivita 45 %).

## 4.2 Korelační analýza

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



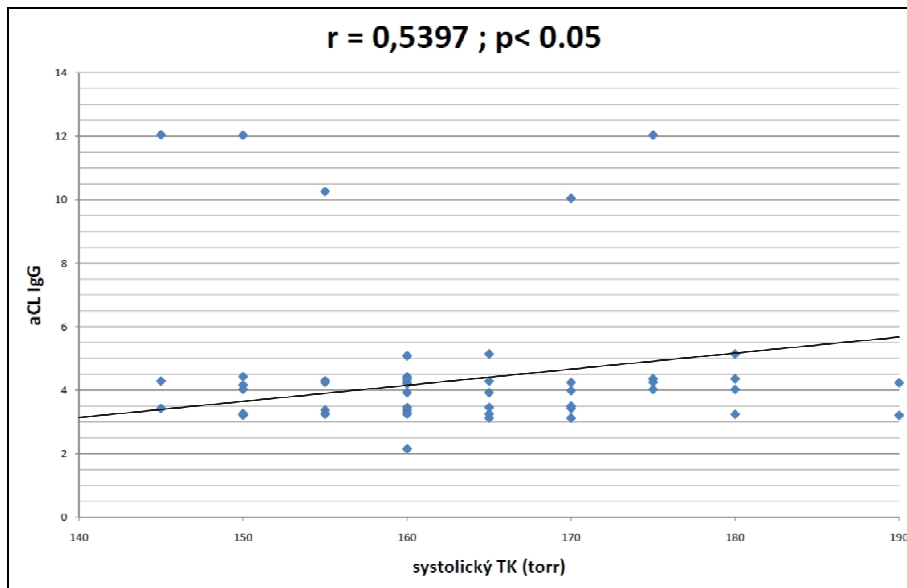
Graf 17



**Legenda:** Korelace mezi hladinami antifosfolipidové protilátky aB2- GPI a body mass indexu u pacientek s preeklampsí; **aB2- GPI** - antifosfolipidová protilátka proti  $\beta$ 2- glykoproteinu I; **IgA** - imunoglobulin A; **BMI** - body mass index ;**p** - p-hodnota ; **r**- korelační koeficient

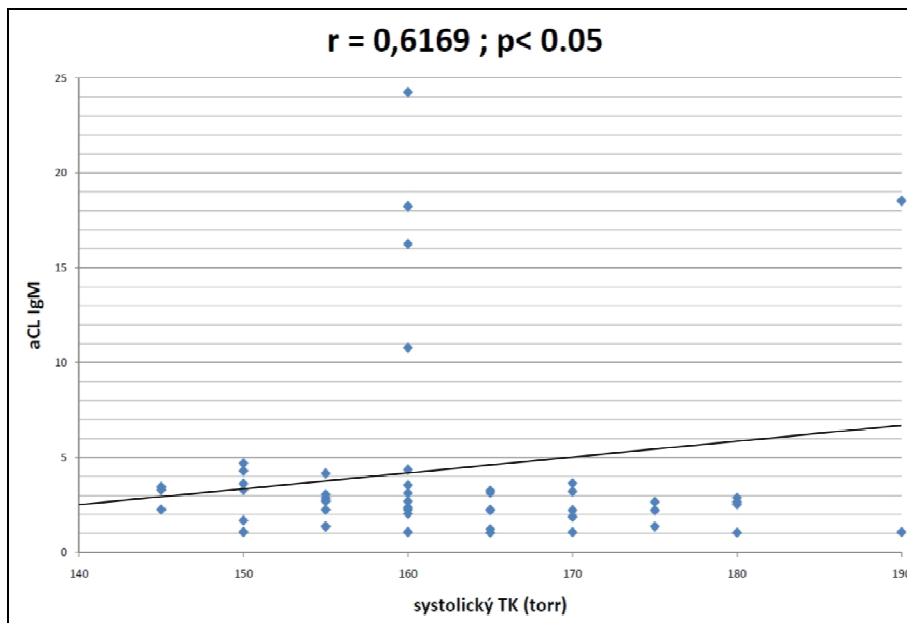
Dále byla při korelační analýze zjištěna u pacientek s preeklampsí pozitivní korelace mezi hodnotou krevního systolického tlaku a hladinou antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG (  $r=0,5397$ ;  $p<0.05$ ) a v izotopu IgM ( $r=0,6169$ ;  $p<0.05$ ) **graf 18**, **graf 19**.

Graf 18



**Legenda:** Korelace mezi hladinami antifosfolipidové protilátky aCL a systolického TK u pacientek s preeklampsí; **aCL** - antifosfolipidová protilátka proti kardiolipinu ; **IgG** - imunoglobulin G; **TK** – krevní tlak; **p** - p-hodnota ; **r**- korelační koeficient

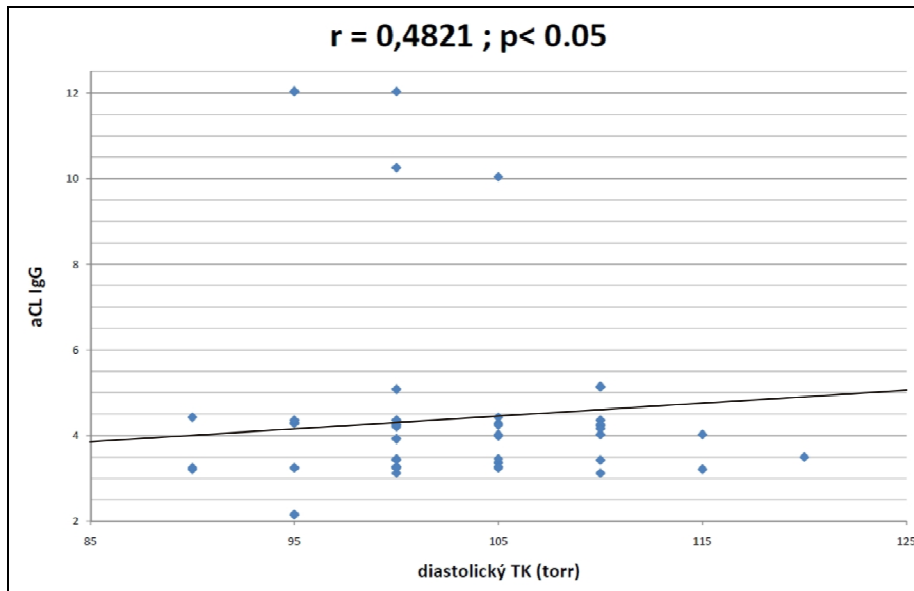
Graf 19



**Legenda:** Korelace mezi hladinami antifosfolipidové protilátky aCL a systolického TK u pacientek s preeklampsí; **aCL** - antifosfolipidová protilátka proti kardiolipinu ; **IgM** - imunoglobulin G; **TK** – krevní tlak; **p** - p-hodnota ; **r**- korelační koeficient

Slabě pozitivní korelace byla nalezena mezi hodnotou krevního diastolického tlaku a hladinou antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG ( $r=0,4821$ ;  $p<0.05$ ) **graf 20**.

Graf 20



**Legenda:** Korelace mezi hladinami antifosfolipidové protilátky aCL a diastolického TK u pacientek s preeklampsí; **aCL** - antifosfolipidová protilátka proti kardiolipinu ; **IgG** - imunoglobulin G; **TK** – krevní tlak; **p** - p-hodnota ; **r**- korelační koeficient

Parametr závažná preeklampsie pozitivně koreloval s hladinou antifosfolipidové protilátky proti  $\beta$ 2- glykoproteinu-I v izotopu IgA ( $r=0,7223$ ;  $p<0.01$ ) Žádná další korelací nebyla statisticky signifikantní.

### 4.3 Výsledky vyšetření trombofilních stavů

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

Tabulka 3

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

	Soubor žen s PE (n-55)	Kontrolní soubor (n-55)	Odds ratio (95 % CI)	p
<b>Faktor V Leiden</b> (+/-)	2 (3,64 %)	1 (1,82 %)	<b>0,38</b> (0,18 - 23,15)	1,00
<b>Faktor II F G20210A</b> (+/-)	1 (1,82 %)	1 (1,82 %)	<b>1,00</b> ( 0, 06 - 16,40)	1.00
<b>Mutace MTHFR C677T</b> (+/+ a +/-)	5 (9,09 %)	7 (12,7 %)	<b>0,68</b> (0,20 - 2.30)	0,76
<b>Mutace MTHR A1298C</b> (+/+ a +/-)	8(14,6 %)	7 (12,7 %)	<b>0,85</b> ( 0, 29 - 2, 55)	0,78

**Legenda:** Čísla vyjadřují počet pacientek s trombofilními stavy v souboru s preeklampií (PE) a v kontrolní skupině, v závorkách je uvedeno procentuální zastoupení. Poměr šancí (Odds ratio), konfidenční interval (95 % CI), p- hladina významnosti; +/- - heterozygot; +/+ - homozygot.

## 5 Diskuze

### ***5.1 Vyšetření jednotlivých typů antifosfolipidových protilátek***

Názor, že zvýšený výskyt pozitivních hladin antifosfolipidových protilátek je nalézán ve spojitosti s preeklampsí byl poprvé vyjádřen u žen s antifosfolipidovým syndromem (223-227). V případech těhotenství žen s antifosfolipidovým syndromem a těhotenství žen se systémovým lupus erythematoses (SLE) a s předchozí trombózou byl medián preeklampsie v rozmezí 20 - 50 %. Polovina žen měla závažnou formu preeklampsie (214-216). K předčasnému porodu u pacientek s antifosfolipidovým syndromem došlo v jedné třetině případů. I přes adekvátní léčbu antifosfolipidového syndromu nedošlo k redukci počtu vzniklých preeklamsií. Pozitivní hodnoty antifosfolipidových protilátek byly zjištěny u 25 % žen, které porodily růstově retardované plody a antifosfolipidové protilátky byly spojeny se vznikem IUGR v těhotenstvích, která byla komplikována preeklampsí (217,218). U žen s antifosfolipidovými protilátkami byla prokázána preeklampsie s časným nástupem v graviditě v 14,6% a s abrupcí placenty v 18,8%. Naproti trvale vysokému počtu preeklamsií u žen s již dříve prokázaným antifosfolipidovým syndromem, existuje mezi studii široké rozpětí prevalence pacientek s antifosfolipidovými protilátkami, u kterých dojde k rozvoji preeklampsie (218,219-221). Pravděpodobost, při které dojde u žen s APA k rozvoji preeklampsie, se zvyšuje s přítomností dalších rizikových faktorů. Zvýšený počet antifosfolipidových protilátek u žen s preeklampsí (204,205,218) a těžkou preeklampsí (206,207) byl pozorován u žen s prokázanými antikardiolipinovými protilátkami, v těchto případech byly gravidity komplikovány vznikem preeklampsie v 11- 29 % , v kontrolním souboru činila incidence preeklampsie pouze 0 % -7 % (188,205,208). Existují však i práce, které zmíněnou korelaci popírají (208). Rozdíly ve výsledcích mezi studii mohou být vysvětleny používáním odlišných antifosfolipidových protilátkových esejí, mezilaboratorními rozdíly v použitých fosfolipidech a především variabilními hodnotami cut- off , označujících pozitivní výsledky. Studie, které se zabývaly predikcí preeklampsie na velkých souborech čítajících více než 800 neselektovaných fertlních žen, však zjistily, že přítomnost antifosfolipidových protilátek byla signifikantně vyšší u probandek, u kterých došlo k rozvoji preeklampsie a tato hodnota byla udávána v rozmezí od 2% - 7%. (213-215). V našem kontrolním souboru žen bez preeklampsie byla zjištěna přítomnost antifosfolipidových protilátek v 1,8% případů. V souboru pacientek s preeklampsí byl sumárně výskyt pozitivních hladin antifosfolipidových protilátek významně vyšší a činil 31%. Jednou

z možných hypotéz pro tento nález je vysoká incidence nullipar ve zmíněném souboru. Je známo, že předchozí gravidita končící porodem, má vysoce protektivní imunologický efekt. Dalším vysvětlením pro vysokou incidenci pozitivních nálezů antifosfolipidových protilátek by mohla být závažnost preeklampsie, která vedla k ukončení 32 % gravidit operativně před 34. týdnem gestace. Je známa vyšší pozitivita antifosfolipidových protilátek u pacientek s časným nástupem onemocnění (207). Poněvadž jedním z vstupních kritérií pacientek byla absence anamnézy vaskulárních trombóz, antifosfolipidového syndromu či jiných přidružených autoimunitních chorob, předpokládáme, že se na zvýšené incidenci protilátek mohla spolupodílet i stressová situace, vyvolaná akutním ukončením gravidit převážně operativní cestou (135). Nejčastěji tzn. u 17 (30%) žen s preeklampsií byla nalezena pozitivita antifosfolipidové protilátky proti  $\beta$ -2 glykoproteinu I ( $\beta$ -2GPI), což je plazmatický protein, který má velkou afinitu k negativně nabitým fosfolipidům (např. kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol). Po vzniku vazby  $\beta$ -2GPI na povrch fosfolipidů dojde k jeho konformační změně a odkrytí kryptického antigenního neoepitopu. Vzniklý trimolekulární komplex (dimer  $\beta$ 2-GPI a autoprottilátka), vázaný na povrch fosfolipidů, pak reaguje s dalšími mechanismy koagulace a s receptory, umístěnými především na buňkách endotelu, monocytů a trombocytů. Předpokládá se, že u preeklampsie dále dochází k lokální aktivaci komplementu, vzniká prokoagulační stav, rezultující ve vývoj placentární infarzace. Dalším mechanismem působení  $\beta$ -2 glykoproteinu I může být jeho vazba s ostatními antifosfolipidovými protilátkami, která vede k aktivaci proliferace endoteliálních buněk placentárních cév a ke vzniku cévní okluze. V naší práci byly detekovány statisticky významně vyšší plazmatické hladiny protilátek proti  $\beta$ 2- glykoproteinu-I v izotopu IgA (anti - $\beta$ 2-GPI IgA) u pacientek s preeklampsií ve srovnání s kontrolní skupinou žen ( $p < 0,0086$ ) **graf 16**. Předpokládá se, že anti- $\beta$ 2-GPI v izotopu IgA může inhibovat proliferaci trofoblastu in vitro. V animálním experimentu Pierangeli et al. (264) dokázal, že purifikované IgA antifosfolipidové protilátky, získané od dvou pacientů s primárním APS, indukovaly formaci trombu v myším modelu. I když je ve spojitosti s antifosfolipidovým syndromem kladen důraz zejména na průkaz izotopů IgG a IgM a horší průběh onemocnění je spojován s vysokými titry v izotopu IgG2, izolovaná přítomnost anti- $\beta$ 2-GPI IgA ve spojitosti s APS, opakovaným potrácením a systémovým lupus erytematodes byla nalezena v řadě prací (222-227). Existuje názor, že měřením izotopu IgA se zvyšuje senzitivita a specifita imunoeseje. Průkazem IgA anti- $\beta$ 2-GPI je možno také dodatečně identifikovat pacienty s klinickými projevy, kteří nesplňují diagnostická Sapporo kritéria pro APS. Pozitivita hladina anti  $\beta$ 2- GPI v izotopu IgA také pozitivně korelovala s body-mas indexem žen s preeklampsií. Je známo, že obezita je spojena

se stavem chronického zánětu mírného stupně. Adipózní tkáň je charakterizována infiltrací makrofágů, které jsou důležitým zdrojem zánětlivých cytokinů (136). Druhou nejčastější antifosfolipidovou protilátkou nalezenou u 10,9 % žen s preeklampsií v našem souboru byla protilátka proti **fosfatidylserinu**. Plazmatické hladiny protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgG byly statisticky významně vyšší u pacientek s preeklampsií ve srovnání s kontrolní skupinou žen ( $p < 0,005$ ), **graf 9** a rovněž byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,002$ ). Ačkoliv dřívější práce zdůrazňovaly roli fenoménu placentárních trombotických změn, z epidemiologických studií vyplynulo, že pouze trombotické příhody nemohou vysvětlit veškeré histopatologické nálezy u žen s antifosfolipidovými protilátkami. Nověji se předpokládá, že antifosfolipidové protilátky uplatňují svůj přímý vliv na trofoblast a negativně ovlivňují jeho další proliferaci a maturaci. Tím dochází k přímému buněčnému poškození s následnou apoptózou buněk, doprovázenému i snížením hladiny lidského choriového gonadotropinu. Fosfatidylserin je fosfolipid, který je exponován na externí buněčné membráně trofoblastu a protilátky, namířené proti tomuto fosfolipidu, mohou negativně působit na diferenciaci trofoblastu včetně formace synticia. Součástí vazby protilátek fosfatidylserinem je opět  $\beta$ -2 glykoprotein I. Tento proces byl dokázán v animálním experimentu u myší, kdy antifosfolipidové protilátky injikované gravidní myši rychle vymizely z cirkulace a byly detekovány v placentární tkáni, kde dále ovlivňovaly funkci trofoblastu (137). Antifosfolipidové protilátky mohou patologicky působit na placentární invazivitu prostřednictvím abnormální exprese trofoblastického integrinu a cadherinu.

Zajímavé bylo naše zjištění, že v souboru pacientek s preeklampsií se plazmatické hladiny protilátek proti **annexinu V** v izotopu IgG ani v izotopu IgM signifikantně nelišily od hodnoty protilátek žen z kontrolní skupiny. Právě annexin V je považován za důležitý endogenní antikoagulační protein, tvořící ochrannou vrstvu na placentě či cévním endotelu s vysokou afinitou ke kyselým fosfolipidům, hlavně k fosfatidylserinu. In vitro však bylo prokázáno, že annexin může být odstraněn z placentárního povrchu BeWo buněk (buněčná linie trofoblastu, získaná z choriokarcinomu) pomocí monoklonálních antifosfatidylserinových protilátek a tím dojde k expresi prokoagulačního povrchu trofoblastu (138).

Protilátky proti **kardiolipinu** (ACLA) patří mezi hlavní skupiny protilátek, jejichž přítomnost podmiňuje existenci antifosfolipidového syndromu. Podobně jako u předešlých typů protilátek existují nejednotné údaje o asociaci těchto protilátek s preeklampsií, v některých pracích je uváděna detekce ACLA až v 16 % pacientek s touto chorobou (212). V současnosti

byla provedena systematická analýza publikované literatury ke stanovení rizika preeklampsie spojené s různými rizikovými faktory (263). Ve dvou srovnávacích skupinách případů (213,214) při průkazu antikardiolipinových protilátek (ACLA) a lupus antikoagulans (LA) nebo obou) bylo prokazatelně zvýšeno riziko vzniku preeklampsie (odds ratio 9,72; 95 % konfidenční interval 4,43-21,75). Nicméně dvě největší negativní srovnávací studie nebyly zavzaty do této analýzy (217,218). V našem souboru pacientek s preeklampsií byly nalezeny plazmatické hladiny protilátek proti kardiolipinu v izotopu IgG statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou žen ( $p < 0,0001$ ) **graf 11** a dle Fisherova exaktního testu byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ( $p < 0,05$ ). Plazmatické hladiny protilátek proti kardiolipinu v izotopu IgM u pacientek s preeklampsií se rovněž statisticky významně lišily od hodnot v kontrolní skupině žen ( $p < 0,0001$ ) **graf 12**, ale při hodnocení četnosti zkoumaného parametru jsme nenalezli statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Tyto nálezy jsou ve shodě se závěry metanalýzy, publikované v *Obstetric & Gynecology* v roce 2010, která konstatovala, že střední až vysoké titry ACLA jsou spojeny s touto základní chorobou u pacientek bez prokázané autoimunitní choroby (pooled odds ratio (OR)- 2,86; 95 % konfidenční interval 1,37- 5,98), u těžké formy preeklampsie byla tato asociace ještě výraznější (pooled odds ratio (OR) -11,15; 95% konfidenční interval 2,66–46,75) (139).

## ***5.2 Vyšetření trombofilních stavů***

Termín trombofilie popisuje heterogenní skupinu získaných či vrozených koagulačních abnormit, které jsou obecně spjaty s cévními trombózami. Během posledního desetiletí pomohla identifikace několika genových polymorfismů spojených s hyperkoagulací k pochopení mechanismu trombózy (209). Bodové mutace v genech kódujících koagulační faktory V(G169A, Leidenská mutace) a protrombin (G20210A), které se vyskytují v heterozygotní formě u 5%, event. 2 % populace, jsou spojené se zvýšeným rizikem venózního tromboembolizmu (203,204). V naší práci jsme se zaměřili na analýzu nejčastějších dědičných koagulačních poruch vyskytujících se v populaci, které jsou dávány do souvislosti s řadou porodnických komplikací (opakované potrácení, intrauterinní úmrtí plodu, růstová retardace plodu a preeklampsie). Existuje velká nejednotnost současných studií, z nichž část předpokládá, že dědičné trombofilie mohou být spojeny s preeklampsií (213). Předpokládaný mechanismus vzniku této choroby je spojen s poruchou diferenciací



trofoblastu, nesprávnou placentací nebo trombózou placentárních cév s následnou redukcí placentárního průtoku. Trombotické změny mohou postihovat i fetální část oběhu a histopatologické změny jsou shrnovány pod pojem trombotická vaskulopatie plodu a zahrnují hemoragickou endovaskulitidu, obliterující endarteriitidu, fibromuskulární sklerotizaci a fibrinoidní vaskulopatii (211). První zprávy o vyšší incidenci trombotických rizikových faktorů u žen s preeklampií a HELLP syndromem byly popsány v roce 1996 (182,187). Od té doby byla provedena a publikována celá řada klinických studií. Pokud byly zahrnuty nejen genetické polymorfismy, ale též APC rezistence, hyperhomocysteinemie a antikardiolipinové protilátky, pak bylo dosaženo až 40% prevalence u žen s anamnézou závažné preeklampsie (205,210).

Prvním trombofilním stavem, který jsme analyzovali, byl vrozený defekt V. koagulačního faktoru (FVL). Ve skupině pacientek s preeklampií byla nalezena prevalence 3,64% mutace FVL v heterozygotní formě a nebylo zjištěno zvýšené riziko pro vznik preeklampsie (odds ratio 0,38; 95% CI 0,18 -23,15). Homozygotní forma mutace nebyla v našem souboru prokázána. Studie zaměřené na výskyt FVL u preeklampiček vykazují značně rozdílné výsledky od vysoce signifikantních (Kupfermanc et al: odds ratio 4,6–5,3) až po zcela negativní (Shaugnessy, De Grooth: odds ratio 1,0, resp. 1,1) (206, 207). Alfirevič et al. (208) ve své metaanalýze 18 studií dochází k riziku 1,6; (95 % CI 1,2–2,1) u heterozygotů FVL.

Dalším námi vyšetřovaným trombofilním stavem byla bodová mutace genu kódujícího protrombin G20210A. V souboru žen s preeklampií jsme našli tuto mutaci v heterozygotní formě pouze v 1,82 % případů. Vzhledem ke shodné prevalenci této mutace u kontrolního souboru nebylo hodnocení možného rizika pro preeklampsii validní. Celkově je v Evropě udávána poměrně nízká prevalence heterozygotů s tímto polymorfismem (do 2%) a studie, týkající se asociací této mutace a preeklampsie popisují mírné až střední riziko (2,1- 3,8) (212). Je známo, že kombinací obou dvou mutací se zvyšuje riziko trombotické příhody, v našem souboru tato kombinace však nebyla nalezena.

Jako poslední genetickou dispozici k trombofilnímu stavu jsme testovali dvě bodové mutace enzymu methylen-tetrahydrofolát- reduktázy (MTHFR), který ovlivňuje metabolismus homocysteinu. Termolabilní varianta C677T genu pro MTHFR v obou dvou formách byla nalezena v 9,09 % v souboru pacientek s preeklampií, ale kontrolní soubor žen obsahoval dokonce vyšší prevalenci žen s touto trombofilní dispozicí (12,7%). Dle literárních údajů (175,176) je mutace MTHFR C677T jednou z nejčastějších mutací, která se vyskytuje ve vysokém procentu mezi bílou rasou (až u 37 % v heterozygotní formě a u 12 % v homozygotní formě), která způsobuje snížení aktivity enzymu s následnou mírnou

hyperhomocysteinémií hlavně při nízkých hladinách folátů. Metaanalýza, specificky zaměřená na polymorfismus C677T MTHFR genu a jeho vztah k vzniku preeklampsie (191) prokázala středně zvýšené riziko u nosiček T alely (MTHFR 677CT a TT) ve srovnání s homozygotními nosičkami C alely (MTHFR 677CC). Navzdory tomuto vztahu, v současně provedené studii u 1874 žen, hyperhomocystenemie, prokázaná v začátku druhého trimestru, selhala v predikci jak vývoje preeklampsie, tak i IUGR (192). Druhým analyzovaným polymorfismem genu pro MTHFR byla mutace A1298C, jejíž prevalence v heterozygotní a homozygotní formě v našem souboru pacientek s preeklampsií činila 14,6 % a riziko pro vznik preeklampsie nebylo statisticky významné (odds ratio 0,85; 95% CI 0,29 -2,55). Z výše uvedeného vyplývá, že při vyšetřování trombofilních stavů jsme neprokázali tvrzení, že trombofilie přispívají ke vzniku preeklampsie. Naše výsledky jsou jistě ovlivněny velikostí sestaveného souboru, ale jsou i v souladu s již publikovanými literárními pracemi (203-208). Kahn et al. (193) publikovali, že prevalence mutace faktoru V Leiden, protrombinu G20210A a MTHFR C677 T v homozygotní formě byly ve srovnání s kontrolní skupinou žen málo významné (odds ratio 0,6; 95% CI 0,3-1,3). Přesto platí, že předpokládaná placentární porucha perfuze (která byla definována autory) se vyskytovala mnohem častěji u žen s preeklampsií než u kontrolního souboru (63,2% versus 46,2%,  $p < 0,001$ ). Jednoznačné prokázání faktu, zda trombofilie účinkuje jako kofaktor v patogenezi preeklampsie nebo preeklampsie akceleruje její účinek, bude vyžadovat sestavení studie s dostatečnou statistickou výpovědní hodnotou.

## 6 Závěry

### 6.1 Závěry vyšetření antifosfolipidových protilátek

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

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

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

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

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

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

## **6.2 Závěry výsledků sledování genetických trombofilních faktorů**

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

## 7 Souhrn

Vyšetřili jsme hladiny osmi nejčastějších antifosfolipidových protilátek (proti fosfatidylserinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu, kyselině fosfatidové, annexinu V, kardiolipinu a beta 2-glykoproteinu I) pomocí ELISA metody a vybrané vrozené trombofilní stavy (mutace F V Leiden, mutace G20210A genu pro protrombin, mutace v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu -MTHFR C677T a mutaci v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu -MTHFR A1298C, analýzou DNA lymfocytů periferní krve pomocí metody real-time PCR) u padesáti pěti žen s preeklampsií v období těsně před ukončením gravidity. Výsledky jsme srovnali s kontrolním souborem zdravých žen. Statistické hodnocení jsme provedli pomocí Wilcoxonova neparametrického testu, kategorické proměnné jsme testovali Fisherovým exaktním testem a závislosti mezi hladinami jednotlivých protilátek v obou skupinách byly zkoumány pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace.

Prokázali jsme, že ženy s preeklampsií měly signifikantně vyšší hladiny antikardiolipinových protilátek v izotopu IgG ( $p < 0,01$ ) a IgM ( $p < 0,01$ ), hladiny protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgG ( $p < 0,01$ ) a ethanolaminu v izotopu IgM ( $p < 0,01$ ). Parametr závažná preeklampsie pozitivně koreloval s hladinou antifosfolipidové protilátky proti  $\beta$ 2-glykoproteinu-I v izotopu IgA ( $r = 0,7223$ ;  $p < 0,01$ ). V dosažených výsledcích jsme nenalezli pozitivní korelaci výskytu sledovaných trombofilních mutací a preeklampsie. Zvýšené hladiny antifosfolipidových protilátek zejména proti  $\beta$ 2-glykoproteinu-I v izotopu IgA a antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu a serinu v izotopu IgG by mohly být vhodné pro predikci preeklampsie u gravidit v pokročilých stadiích. Naše výsledky současně podporují myšlenku o autoimunitním podkladu preeklampsie.

## 8 Summary

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

## 9 Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat své školitelce prof. MUDr. Zdeňce Ulčové- Gallové, DrSc. za četné podněty, které stály u zrodu tématu této práce, dále pak za inspiraci, korektury, návrhy a odborné vedení mé práce v době postgraduálního studia a podpoře výzkumným úkolem MŠ MSM 002 162 0812. Děkuji též laborantkám, paní Bibkové a paní Mičanové za pomoc při zpracování získaných vzorků.

Děkuji též doc. MUDr. Zdeňkovi Novotnému, CSc a doc. MUDr. Zdeňkovi Rokytovi, CSc za podmínky, které mi při tvorbě mé práce na klinice byly vytvořeny a za veškeré dovednosti a informace, které jsem dosud získal při práci na tomto pracovišti.

Velký dík patří všem spolupracovníkům, kteří se spolupodíleli na vzniku této práce zejména MUDr. Ivanovi Šubrtovi při zpracování trombofilií , ing. Stanislavovi Kormundovi za pomoc při statistickém zhodnocení výsledků a všem zdravotním sestřám z porodního sálu za pomoc při odběrech vzorků krve.

Dále bych chtěl poděkovat své přítelkyni MUDr. Alici Mockové za pomoc odbornou, ale i za porozumění a podmínky, jež mi pro práci vytvořila.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat oběma rodičům za celoživotní podporu ve veškeré mojí činnosti a zejména svému otci, který pro mě zůstane nadosmrti nedostižným vzorem.

## 10 Literatura

1. **Report of the National High Blood Pressure Education Program**, Working group report on high blood pressure in pregnancy . *Am J. Obstet.Gynecol.*2000: 183:S1- 22.
2. **Sibai BM**. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet.gynecol.*2003, 102: 181-92.
3. **Brown MA, Hague WM, Higgins J et al**. The detection , investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement of recommendations from the council of Australian Society of the study of hypertension in pregnancy. *Aust N Z J Obstet. Gynaecol.* 2000, 40: 139.
4. **Mattar F, Sibai BM**. Eclampsia VIII: risk factors for maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 2000,182: 307-12.
5. **Hauth JC, Ewell MG, Levine RL et al**.Pregnancy outcomes in healthy nulliparous women who subsequently develop hypertension. *Obstet Gynecol* 2000,95:24-28.
6. **Helewa ME,Burrows RF, Smith J et al**. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive . disorders in pregnancy *CMAJ* 1997,157:715-25.
7. **Waugh JJS, Clark TJ,Divakaran TG et al**. Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2004, 103:769-77.
8. **Buchbinder A, SibaiBM, Cartis S et al**. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in sever gestational hypertension than in mild preeclampsia *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186: 66-71.
9. **Sibai BM**.Diagnosis, controversies and management of HELLP syndrome, *Obstet Gynecol* 2004, 103: 981-91.
10. **Douglas KA, Redman CWG**. Eclampsia in the United Kongdom. *BMJ* 1994, 309: 395-400.
11. **Cartis S, Sibai B, Hauth J et al**. Low dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. *N Engl J Med* 1998, 338: 701-05.
12. **Sibai BM**.Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002: 100:369-77.
13. **VattenLJ, Skjaerven R**. Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG* 2004,



111 :298-302.

14. **Sibai BM, Hauth J, Caritis S et al.** Hypertensive disorder in twin versus singleton gestations. *Am J Obstet Gynecol* 2000, 182: 938-42.
15. **Wen SW, Demissie K, Yang Q et al.** Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am, J Obstet Gynecol* 2004, 191: 254- 58.
16. **Hnat MD, Sibai BM, Caritis S et al.** Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparous. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186: 422-26.
17. **Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V.** How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002, 101 6-14.
18. **Kupfermenic MJ.** Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1: 111-66.
19. **van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H et al.** High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180:1146-50.
20. **Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner NO.** Sperm exposure and development of preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188 : 1241-43.
21. **Dekker G, Robillard PY.** The birth interval hypothesis- does it really indicate the end of primipaternity hypothesis? *J Reprod Immunol* 2003: 59:245-51.
22. **Dekker G, Sibai B.** Primary , secondary and tertiary prevention of pre-eclampsia, *Lancet* 2001, 357: 209-15.
23. **Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA et al.** Abortion, changed paternity and risk of preeclampsia in nulliparous women *Am J Epidemiol* 2003,157: 1108-14.
24. **Wang JX, Knottnerus AM, Schuit Get al.** Surgically obtained sperm and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia *Lancet* 2002: 359: 673-4.
25. **Wolfberg AJ, Lee-Paritz A, Peller A Jet al.** Association of rheumatic disease with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 204: 103: 1190-93.
26. **O'Brien TE, Ray JG, Chan WS.** Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology* 2003 : 14 368-74.
27. **Cedegren MI.** Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2004: 103 219-24.
28. **Wolf M, Sandler L, Muonz K et al.** First trimester insulin resistance and subsequent

- preeclampsia: a prospective study *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:1563-68.
29. **Von Dadelszen P, Magee LA.** Could an infectious trigger explain the differential maternal response to shared placental pathology of preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction? *Acta Obstet. Gynecol Scand* 2002, 81 :642-48.
  30. **Bogges KA, Lief S, Martha AP et al.** Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet. Gynecol* 2003, 101:227-31.
  31. **Esplin MS, Fausett MB, Fraser A et al.** Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 2001, 344 867 -72.
  32. **Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H et al.** Fetal and maternal contributions to risk of preeclampsia : a population based study, *BMJ* 1998, 316:1343-47.
  33. **Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT.** The interval between pregnancies and the risk of Preeclampsia. *N Engl J Med* 2002, 346:33-38.
  34. **Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM et al.** Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study *Hum Reprod* 2001, 16, 102-06.
  35. **Redman CWG, Sargent I L.** Pre eclampsia, the placenta, and the maternal systemic inflammatory response- a review. *Placenta* 2003, 24: 21- 27.
  36. **Wolf M, Kettle E, Sandler L et al.** Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation *Obstet. Gynecol.* 2001, 98:757-60.
  37. **Livingston JC, Barton JR, Park V et al.** Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001, 185: 153-57.
  38. **Morrison ER, Miedzibrodzka ZH, Campbell DM et al.** Prothrombotic genotypes are not associated with preeclampsia and gestational hypertension , results from a large population based study and systematic review. *Thromb. Haemost.* 2002, 87 : 779-85.
  39. **Chaouat G, Ledee-Bataille N, Zourbas S et al.** Implantation: can immunological parameters of implantation be of interest for pre-eclampsia? *J Reprod. Immunol* 2003 :59:205-17.
  40. **Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S et al.** Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002, 57: 109–28.
  41. **Peters B, Whittall T, Babaahmady K et al.** Effect of heterosexual intercourse on mucosal alloimmunisation and resistance to HIV-1 infection. *Lancet* 2004; 363: 518–24.
  42. **Khong TY, De Wolf F, Robertson W et al.** Inadequate maternal vascular response to

- placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93: 1049–59.
43. **Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, et al.** Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991, 98: 648–55.
  44. **Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ.** Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest* 1997, 99: 2152–64.
  45. **Giudice LC, Conover CA, Bale L, et al.** Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 2359–66.
  46. **Jaffe R, Dorgan A, Abramowicz JS.** Color Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the first trimester: value in predicting pregnancy failure or complication. *Am J Roentgenol* 1995; 164:1255–58.
  47. **Kaufmann P, Black S, Huppertz B.** Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69: 1–7.
  48. **Martin RD.** Scaling of the mammalian brain: the maternal energy hypothesis. *News Physiol Sci* 1996; 11: 149–56.
  49. **Moffett-King A.** Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 656–63.
  50. **Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, et al.** Uterine natural killer cells; insight into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction* 2003, 126: 149–60.
  51. **van der Meer A, Lukassen HG, van Lierop MJ, et al.** Membrane bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2004;189–95.
  52. **Hunt JS, Miller L, Vassmer D, Croy BA.** Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 34: 419–43.
  53. **Dekker GA, Sibai BM.** Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359–75.
  54. **Hiby SE, Walker JJ, O’Shaughnessy KM, et al.** Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004, 200: 957–65.
  55. **Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC et al.** Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998, 110:

495–508.

56. **Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S et al.** Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2003, 59: 153–60.
57. **Hahn S, Holzgreve W.** Fetal cells and cell-free fetal DNA in Materna blood: new insights into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 2002, 8: 501–08.
58. **Levine RJ, Qian C, Leshane ES, et al.** Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 190: 707–13.
59. **Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H et al.** Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:158–66.
60. **Roberts JM, Lain KY.** Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; 23: 359–72.
61. **Redline RW, Boyd T, Campbell V, et al.** Maternal vascular underperfusion: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 237–49.
62. **Salomon LJ, Benattar C, Audibert F, et al.** Severe preeclampsia is associated with high inhibin A levels and normal leptin levels at 7 to 13 weeks into pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1517–22.
63. **Ness RB, Roberts JM.** Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1365–70.
64. **Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M.** Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1305–15.
65. **Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T.** Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13: 39–44.
66. **Sacks GP, Redman CW, Sargent IL.** Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 490–97.
67. **Aly AS, Khandelwal M, Zhao J et al.** Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 252–58.
68. **Moretti M, Phillips M, Abouzeid A et al.** Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1184–90.
69. **Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN et al.** Secretion of tumor necrosis factor-

alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol* 2004; 164: 1049–61.

70. **Benyo DF, Smarason A, Redman CW** et al. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2505–12.
71. **American College of Obstetricians and Gynecologists.** ACOG practice bulletin number 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2002 77,67-75
72. **Matzinger P.** The danger model. *Vox Sang* 2004; 87 (suppl 2): 18.
73. **Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D** et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511–17.
74. **Wang Y, Gu Y, Zhang Y** et al. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 817–24.
75. **Redman CW, Sacks GP, Sargent IL.** Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 499–506.
76. **Roberts JM, Redman CWG.** Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447–51.
77. **Redman CW.** Platelets and the beginnings of preeclampsia. *N Engl J Med* 1990; 323: 478–80.
78. **Reister F, Frank HG, Kingdom JC, et al.** Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001; 81: 1143–52.
79. **Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, et al.** Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 102–08.
80. **Rand J.** The annexinopathies: a new category of disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498: 169–73.
81. **Shu F, Sugimura M, Kanayama N, Kobayashi H** et al. Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49: 17–23.
82. **Schlembach D, Beinder E, Zingsem J** et al. Association of maternal and/or fetal factor V

- Leiden and G20210A prothrombin mutation with HELLP syndrome and intrauterine growth restriction. *Clin Sci* 2003; 105: 279–85.
83. **Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A, et al.** Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGR and placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113: 31–35.
84. **Haig D.** Genetic conflicts in human pregnancy. *Q Rev Biol* 1993; 68: 495–532.
85. **Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al.** Excess placental soluble fmslike tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Clin Invest* 2003; 111: 649–58.
86. **Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, et al.** Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1541–47.
87. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al.** Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672–83.
88. **Thadhani R, Ecker JL, Mutter WP, et al.** Insulin resistance and alterations in angiogenesis: additive insults that may lead to preeclampsia. *Hypertension* 2004; 43: 988–92.
89. **Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S et al.** The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG* 2004; 111: 200–06.
90. **Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, et al.** Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 168–77.
91. **Oudejans CB, Mulders J, Lachmeijer AM, et al.** The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in androgenetic placentas. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 589–98.
92. **Cross JC.** The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64: 96–103.
93. **Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M.** World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2004; 104: 1367–91.
94. **Tjoa ML, Qudejans CBM, Van Vugt JMG, Blankenstein MA et al.** Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertens Pregnancy* 2004; 23: 171–89.
95. **Djurovic S, Clausen T, Wergeland R et al.** Absence of enhanced systemic inflammatory response at 18 weeks of gestation in women with subsequent pre-eclampsia. *BJOG* 2002;

- 109: 759–64.
96. **Chien PF, Arnott N, Gordon A et al.** How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of preeclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An Overview. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107: 196–208.
  97. **Yu CKH, Papageorghiou AT, Parra M et al.** Randomized controlled trial using low-dose aspirin in the prevention of pre-eclampsia in women with abnormal uterine artery Doppler at 23 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 22: 233–39.
  98. **Yu CKH, Papageorghiou AT, Boli A et al.** Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction in twin pregnancies at 23 weeks of gestation by transvaginal uterine artery Doppler ultrasound. *Obstet Gynecol* 2002; 20: 535–40.
  99. **Subtil D, Goeusse P, Houfflin-Debarge V, et al.** Randomised comparison of uterine artery Doppler and aspirin (100 mg) with placebo in nulliparous women: the Essai Regional Aspirine Mere-Enfant study (part 2). *BJOG* 2003; 110: 485–91.
  100. **Makrides M, Duley L, Olsen SF.** Fish oil, and other prostaglandin precursor supplementation during pregnancy for reducing preeclampsia, preterm birth, low birth weight and intrauterine growth restriction. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 4: CD003402.
  101. **Coomarasamy A, Honest H, Papaioannou S et al.** Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors: a systemic review. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1319–32.
  102. **Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ et al.** Antiplatelet agents for preventing and treating preeclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD000492.
  103. **Atallah AN, Hofmeyr GJ, Duley L.** Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 1: CD001059.
  104. **Abalos E, Duley L, Steyn DW et al.** Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 1: CD002252.
  105. **Sibai BM.** Prevention of preeclampsia: a big disappointment. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1275–78.
  106. **North RA, Ferrier C, Gamble G et al.** Prevention of preeclampsia with heparin and antiplatelet drugs in women with renal disease. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1995; 35: 357–62.
  107. **Chappell LC, Seed PT, Briley AL, et al.** Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354:

- 810–16.
108. **Kupferminc MJ, Fait G, Many A, et al.** Low molecular weight heparin for the prevention of obstetric complications in women with thrombophilia. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20: 35–44.
  109. **Levine RJ, Hauth JC, Curet LB, et al.** Trial of calcium to prevent preeclampsia. *N Engl J Med* 1997; 337: 69–76.
  110. **Wallenburg HC, Dekker GA, Makovitz JW et al.** Low-dose aspirin prevents pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. *Lancet* 1986; 327: 1–3.
  111. **Coomarasamy A, Papaioannou S, Gee H et al.** Aspirin for the prevention of preeclampsia in women with abnormal uterine artery Doppler: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 861–66.
  112. **Coomarasamy A, Braunholtz D, Song F et al.** Individualising use of aspirin to prevent pre-eclampsia: a framework for clinical decision making. *BJOG* 2003; 110: 882–88.
  113. **Friedman SA, Lubarsky S, Schiff E.** Expectant management of severe preeclampsia remote from term. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42: 470–78.
  114. **Churchill D, Duley L.** Interventionist versus expectant care for severe pre-eclampsia before term. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 3: CD003106.
  115. **Vigil-DeGracia P, Montufar-Rueda C, Ruiz J.** Expectant management of severe preeclampsia and preeclampsia superimposed on chronic hypertension between 24 and 34 weeks' gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 107: 24–27.
  116. **Haddad B, Deis S, Goffinet F, Paniel B et al.** Maternal and perinatal outcomes during expectant management of 239 severe preeclamptic women between 24 and 33 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1590–95.
  117. **Zhang J, Meikle S, Trumble A.** Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22: 203–12.
  118. **Weindling AM.** The confidential enquiry into maternal and childhealth (CEMACH). *Arch Dis Child* 2003; 88: 1034–37.
  119. **Magee LA, Ornstein MP, Von Dadelszen P.** Fortnightly review: management of hypertension in pregnancy. *BMJ* 1999; 318: 1332–36.
  120. **von Dadelszen P, Ornstein MP, Bull S et al.** Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis. *Lancet* 2000; 355: 87–92.
  121. **Rey E, LeLorier J, Burgess E et al.** Report of the Canadian Hypertension Society



- Consensus Conference: 3. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997; 157: 1245–54.
122. **Magee LA, Cham C, Waterman E J et al.** Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy:meta-analysis. *BMJ* 2003; 327: 1–10.
  123. **Amorim MMR, Santas LC, Faundes A.** Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1283–88.
  124. **Matchaba P, Moodley J.** Corticosteroids for HELLP syndrome in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 4: CD002076.
  125. **Heilmann L, Gerhold S, von Templehoff GF et al.** The role of intravenous volume expansion in moderate pre-eclampsia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001; 25: 83–89.
  126. **Visser W, Wallenburg HCS.** Temporising management of severe preeclampsia with and without the HELLP syndrome. *Br J Obstet Gynecol* 1995; 102: 111–17.
  127. **Duley L, Williams J, Henderson-Smart DJ.** Plasma volume expansion for treatment of pre-eclampsia. *Cochrane Databáze Syst Rev* 1999; 4: CD001805.
  128. **Witlin AG, Sibai BM.** Randomized trials for prevention and treatment of eclamptic convulsions. In: Sibai BM, ed. Hypertensive disorders in women. *Philadelphia: Saunders*, 2001: 221–27.
  129. **Sibai BM.** Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia.Lessons learned from recent trials. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1520–26.
  130. **Duley L, Galmezoglu AM, Henderson-Smart DJ.** Magnesium sulfate and other anticonvulsants for women with preeclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 2: CD000025.
  131. **The Magpie Trial Collaborative Group.** Do women with preeclampsia and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1877–90.
  132. **Mathys LA, Coppage KH, Lambers D Set al.**Delayed postpartum preeclampsia: an experience of 151 cases.*Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1464–66.
  133. **Chames MC, Livingston JC, Ivestor T Set al.** Late postpartum eclampsia: a reventable disease? *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 1174–77
  134. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics.Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;98:159-67.
  135. **SeglerCP.** Anticardiolipin antibodies as markers of physiologic stress:a case studyof idiopathic stroke in a zouny adult.Medical hypothese 2004, 63, 461-463.

136. **Wellen KE, Gökhan S, Hotamisligil.** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue *J Clin Invest* 2003 112/12,1785-1788.
137. **Neroní PL, Simonen N, Teutoni C.** Antiphospholipid antibodies as cause of pregnancy loss. *Lupus* 2004, 13, 649-652.
138. **Vogt E, Ng AK, Rote AS.** Antiphosphatidilserine antipody removes annexin V and facilitates the binding of prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation. *Am J Obstet Gynecol* in press.
139. **do Prado AD, Piovean DM, Strub H L et al.** Association of anticardiolipin antibodies with preeclampsia. A systematic review and meta analysis *Obstet Gynecol* 2010;116: 1433-1443.
140. **Brown MA, Buddle ML.** Hypertension in pregnancy: maternal and fetal outcomes according to laboratory and clinical features. *Med J Aust* 1996;165:360-5.
141. **Knight M,** on behalf of UKOSS. Eclampsia in the United Kingdom 2005. *BJOG* 2007;114: 1072-8.
142. **Airoidi J, Weinstein L.** Clinical significance of proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:117-24.
143. **Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK et al.** Mild gestational hypertension remote from term: progression and out-come. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:979-83.
144. **Saudan P, Brown MA, Buddle ML et al.** Does gestational hypertension become preeclampsia? *BJOG* 1998;105:1177-84.
145. **Magee LA, von Dadelszen P, Bohun CM, et al.** Serious perinatal complications of non-proteinuric hypertension: an international, multicentre, retrospective cohort study. *J Obstet Gynaecol Can* 2003;2:372-82.
146. **Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S et al.** Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:66-71.
147. **Sibai BM, Barton JR.** Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection, treatment, and delivery indications. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196: 514.e1-9.
148. **Martin JN Jr, Rose CH, Briery CM.** Understanding and managing HELLP syndrome: the integral role of aggressive glucocorticoids for mother and child. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:914-34.
149. **Good medical Council,** Good medical practice, London, General medical Council 2006.
150. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin number

33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Int.J.Gynaecol Obstet* 2002;77,67-75.
151. **Arnořtová L, Fialová L, Malbohan et al.** Preeklampsie a její diagnostika, *Klin. Biochem Metab*, 15(36)2007 No4, 200-2006.
152. **Burton GJ, Hung TH.** Hypoxia reoxygenation, a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia *Fetal Maternal Med. Rev.* 14(2)97-117.
153. **Davide ST, Hubel CA, Brayden RD et al.** Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia *Semin.Reprod.Endocrinol.*, 16(1) 65-73.
154. **Janků P, Janků K, Unzeitig V.** Preeklampsie z hlediska multioborové spolupráce, *Vnitřní lékařství* 2009, 55(12), 1159-166
155. **Rahimpanah F, Smoleniec J.** Partial mole, triploidy and proteinuric hypertension: two case reports. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000; 40:215-8.
156. **Stefos T, Plachouras N, Mari G et al.** A case of partial mole and atypical type I triploidy associated with severe HELLP syndrome at 18 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;20:403-4.
157. **Sherer DM, Dalloul M, Stimphil R, et al.** Acute onset of severe hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome in a patient with partial hydatidiform mole at 17 weeks gestation. *Am J Perinatol* 2006;23: 163-6.
158. **Haram K, Trovik J, Sandset P M et al.** Severe syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) in the 18th week of pregnancy associated with the antiphospholipid- antibody syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:679-80.
159. **Bornstein E, Barnhard Y, Atkin R et al.** HELLP syndrome: a rare, early presentation at 17 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 2007;110:525-7.
160. **Hazra S, Waugh J, Bosio P.** "Pure" preeclampsia before 20 weeks of gestation: a unique entity. *BJOG* 2003;110:1034-5.
161. **Sibai BM.** Imitators of severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2007;109:956-66.
162. **Geerts L, Odendaal HJ.** Severe early onset pre-eclampsia: prognostic value of ultrasound and Doppler assessment. *J Perinatol* 2007; 27:335-42.
163. **Li H, Gudnason H, Olofsson P et al.** Increased uterine artery vascular impedance related to adverse outcome of pregnancy but is present in only one-third of late third-trimester preeclamptic women. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:459-63.
164. **Lubarsky SL, Barton JR, Friedman SA et al.** Late postpartum eclampsia revisited. *Obstet Gynecol* 1994;83:502-5.
165. **Tan LK, de Swiet M.** The management of postpartum hypertension. *BJOG* 2002;

- 109: 733-8.
166. **Douglas KA, Redman CW.** Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ* 1994;308: 1395-400.
167. **Conde-Agudelo A, Kafury-Goeta AC.** Epidemiology of eclampsia in Colombia. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;61:1-8.
168. **Katz V, Farmer R, Kuller JA.** Preeclampsia into eclampsia: toward a new paradigm. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1389-96.
169. **Chames MC, Livingston JC, Ivester T S et al.** Late postpartum eclampsia: a preventable disease? *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1174-7.
170. **Chen CY, Kwek K, Tan KH et al.** Our experience with eclampsia in Singapore. *Singapore Med J* 2003;44:88-93.
171. **Stella CL, Jodicke C, Harkness U et al.** Postpartum headache: is your work-up complete? *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:318.1-7.
172. **Neudecker S, Stock K, Krasnianski M.** Call-Fleming postpartum angiopathy in the puerperium: a reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Obstet Gynecol* 2006; 107:446-9.
173. **Fonseca JE, Mendez F, Catano C et al.** Dexamethasone treatment dose not improve the outcome of women with HELLP syndrome: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1591-8.
174. **Katz L, de Amorim MMM, Figueiro JN et al.** Postpartum dexamethasone for women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198: 283.e1-8.
175. **Sibai BM, Barton JR.** Dexamethasone to improve maternal outcome in women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1587-90.
176. **Lattuada RJ, Rossi E, Calzarossa C et al.** Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003;88:1029-34.
177. **Levine RJ, Lam C, Qian C.** Soluble endoglin and other circulating angiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355: 992-1005.
178. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al.** Circulating angiogenic factors and the risk for preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-83.
179. **Salahuddin S, Lee Y, Vadnais M.** Diagnostic utility of soluble fms-like tyrosine kinase

- 1 and soluble endoglin in hypertensive diseases of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197: 28.e1-6.
180. **Robinson CJ, Johnson DJ.** Soluble endoglin as a second-trimester marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197.
181. **Audus KL, Soares MJ, Hunt JS:** Characteristics of the fetal/maternal interface with potential usefulness in the development of future immunological and pharmacological strategies. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:402–409.
182. **Moffett-King A.** Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:656–663.
183. **Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R.** Intrauterine infection and prematurity. *Ment Petard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:3–13.
184. **Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J.** Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr* 2003; 133: 1668–1673.
185. **von Dadelszen P, Magee LA, Kraiden M et al.** Levels of antibodies against cytomegalovirus and Chlamydia pneumoniae are increased in early onset preeclampsia. *BJOG* 2003; 110:725–730.
- 186 **Hsu CD, Witter FR:** Urogenital infection in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 49:271–275.
187. **Arechavaleta-Velasco F, Koi H et al.** Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation? *J Reprod Immunol* 2002; 55:113–121.
188. **Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim Y Met et al.** Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol* 2004; 173:4286–4296.
189. **Beijar EC, Mallard C, Powell TL.** Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta* 2006; 27:322–326.
190. **Rindsjo E, Holmlund U, Sverremark-Ekstrom E et al.** Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol* 2007; 38:468–473.
191. **Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T et al.** Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E (2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 2006; 72:46–59.
192. **Ma Y, Krikun G, Abrahams V M et al.** Cell type-specific expression and function toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta* 2007; 28:1024–1031.
193. **Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR et al.** Expression and regulation of the pattern

- recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002; 107:145–151.
194. **Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17:1–14.
195. **Faas MM, Broekema M, Moes H** et al. Altered monocyte function in experimental preeclampsia in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1192–1198.
196. **Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim C** et al. Toll-like receptor 4: a potential link between “danger signals,” the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:921–927.
197. **Tinsley JH, Chiasson VL, Mahajan A** et al. Toll-like receptor 3 activation during pregnancy elicits preeclampsia-like symptoms in rats. *Am J Hypertens* 2009; 22:1314–1319.
198. **Arechavaleta-Velasco F, Ma Y, Zhang J** et al. Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol* 2006; 168:1951–1959.
199. **Lucchi NW, Moore JM.** LPS induces secretion of chemokines by human syncytiotrophoblast cells in a MAPK-dependent manner. *J Reprod Immunol* 2007; 73:20–27.
200. **Rustveld LO, Kelsey SF, Sharma R.** Association between maternal infections and preeclampsia: a systematic review of epidemiologic studies. *Matern Child Health J* 2008; 12:223–242.
201. **Branch DW, Scott JR, Kochenour NK** et al. Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. *N Engl J Med* 1985; 313:1322–1326.
202. **Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ** et al. Al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med* 2006; 355:1885–1894.
203. **Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP** et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85:1504–1508.
204. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH** et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698–3703.
205. **van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H** et al. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:1146–1150.
206. **Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N** et al. Increased frequency of genetic

- thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340:9–13.
207. **De Groot CJ, Bloemenkamp KW, Duvekot EJ et al.** Preeclampsia and genetic risk factors for thrombosis: a case- control study. *AmJ Obstet Gynecol.* 199,181,975-980
208. **Alfirević Z, Mousa HA, Martlew V et al.** Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications *Obstet Gynecol.* 2001; 97: 753–59.
209. **Alfirević Z, Roberts D, Martlew V.** How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A sytematic review. *European Journal of Obsterics&Gynaecology and Reproductive Biology.* 2002; 101: 6–14.
210. **Dizon Townson DS, Nelson LM, Easton K et al.** The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175 (4 Pt 1): 902–5.
211. **Ariel I, Anteby E, Hamani Y et al.** Placental pathology in fetal thrombophilia. *Hum Pathol.* 2004; 35: 729–33.
212. **Kupferminc MJ, Fait G, Many A et al.** Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol.* 2000; 96 (1): 45–9.
213. **Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D et al.** Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997; 77:1052–1054.
214. **Lockshin MD, Druzin ML, Goei S et al.** Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1985; 313:152–156.
215. **Branch DW, Silver RM, Blackwell JL.** Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 1992; 80:614–620.
216. **Huong DL, Wechsler B, Bletry O.** et al. A study of 75 pregnancies in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2001; 28:2025–2030.
217. **Goncavales LF, Chaiworapongsa T, Romero R.**Intrauterine infection and prematurity *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002,8 .3-13.
218. **Romero R, Chaiworaponsa T, Espinosa J.**Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr* 2003, 133 ,1668S-1673S.
219. **von Dadelszen P, Magee LA, Krajden M et al.** Levels of antibodies against cytomegalovirus and Chlamydomphila pneumonie are increased in early onset pre-

- eclampsia *BJOG* 2003, 110, 725-730.
220. **Hsu CD, Witter FR.** Urogenital infection in preeclampsia *Int J Gynaecol Obstet* 1995,49, 271-275.
221. **Hradecky L, Subrt I, Ulcova-Gallova Z.** Urgent termination of pregnancy in pre-eclampsia and the panel of antiphospholipid antibodies. *Am J Reprod Immunol.*2009, Dec 62(6): 412-417.
222. **Ulčová-Gallová Z.** Antifosfolipidové protilátky (APA) v gynekologii a porodnictví *Čes. Gynek.* 59, 1994 1, 28-34.
223. **Králíčková M, Ulčová-Gallová Z, Šíma R** et al. Association of the leukemia inhibitory factor gene mutation and the antiphospholipid antibodies in the peripheral blood of infertile women. *Folia Microbiol.* 2007, 52 (5),543-548.
224. **Subrt I, Ulcova-Gallová Z, Bibkova K** et al. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59 (3),193-200.
225. **Ulcova-Gallova Z.** Antiphospholipid antibodies and reproductive failure. *Chem Immunol Allergy* 2005, 88, 139-149.
226. **Ulcova-Gallova Z, Krauz V, Novakova P** et al. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol* 2005, 54, (2), 112-117.
227. **Ulcova-Gallova Z, Bouse V, Krizanovska K** et al. Beta 2 glycoprotein I is a good indicator of certain adverse pregnancy conditions. *Int J Fertil Womens Med* 2001, 46,(6) 304-308.
228. **Griendling KK, Sorescu D,Lassegue B** et al.Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.*Arterioscler Tromb Vasc Biol* 20(10), 2175-83
229. **Griendling KK, Sorescu D,Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase, role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86(5), 494-501.
230. **Irani K.** Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival, a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling *Circ Res.* 87(3), 179-183.
231. **Dechend R,Viedt C, MullerDN** et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 107(12), 1632-9
232. **Walsh SW.**Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in



- preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16(1), 93-104.
233. **Zusterzeel PLM, Peters WMH, De Bruyn MA** et al. Glutathione S-transferase Isoenzymes in decidua and placenta of preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol* 94(6), 1033-1038.
234. **Zusterzeel PLM, Rutten H, Roelofs HM** et al. Protein carbonyls in decidua and placenta of preeclamptic women. *Free Rad Res* 33(5) 471-476.
235. **Chapell LC, Seed PT, Briley A** et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia *Am J Obstet Gynecol*, 187(1), 127-136.
236. **Karb S**. Total free radical trapping antioxidant potential in pre-eclampsia. *Int J. Gynaecol Obstet* 69(1), 23-26.
237. **Many A, Hubel CA, Roberts JM**. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J. Obstet Gynecol* 174(1), 288-91.
238. **Madazli R, Benian A, Gumustas K** et al. Lipid peroxidation and antioxidants in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 85(2) 205-208.
239. **Sagol S, Ozkinay E, Ozsener S**. Impaired antioxidant activity in women with preeclampsia *Int J Gynaecol Obstet* 64(2) 121-127.
240. **Hubel CA, Kagan VE, Kisin ER** et al. Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia, implications for oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 23(4), 597-609.
241. **Schiff E, Friedmann SA, Stampfer M** et al. Dietary consumption and plasma concentrations of vitamin E in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175(4), 1024-1028.
242. **Zhang C, Williams MA, King IB** et al. Vitamin C and the risk of preeclampsia- results from dietary questionnaire and plasma assay *Epidemiology* 13(4), 409-416.
243. **Morris CD, Jacobson SL, Anand R** et al. Nutrient intake and hypertensive disorders of pregnancy, evidence from a large prospective cohort *Am J Obstet Gynecol* 184(4), 643-651.
244. **Mikhail MS, Anyaegbunam A, Garfinkel D** et al. Preeclampsia and antioxidant nutrients, decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171(1), 150-157.
245. **Palan PR, Mikhail MS, Romney SL**. Placenta and serum levels of carotenoids in preeclampsia *Obstet Gynecol* 103(11) 1151-61.
246. **Roggensack AM, Zhang Y, Davidge SE**. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 33(1), 83-89.

247. **Davidge ST.** Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*, 16(1),65-73.
248. **Coomarasamy A, Honest H, Papaioannou S** et al. Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors, a systematic review. *Obstet Gynecol* 101(6),1319-32.
249. **Ulčová-Gallová Z.** Význam vitamínu C v zachování normálního amnia. *Čes. Gynekol.*56, 1991(4) 301-301.
250. **Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ, Osthuizen MMJ.**Antioxidants in the treatment of severe preeclampsia, an explanatory randomised controlled trial. *Br J Obstet Gynecol*,104,689-96.
251. **Stratta P,CanaveseC, Porcu M** et al. Vitamin E supplementation in preeclampsia *Gynecol Obstet Invest* 37(4)246-249.
252. **Chappell LC, Seed PT, Briley AL** et al. Effect of antioxidants on the occurrence of preeclampsia in women at increased risk, a randomised trial. *Lancet* 345,810-816
253. **Gleicher N:** Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. *Am. J. Obstet Gynecol* 2007; 196:5 –e1.
254. **el-Roeiy A, Myers SA, Gleicher N:** The relationship between autoantibodies and intrauterine growth retardation in hypertensive disorders of pregnancy.*Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:1253–1261.
255. **Bobst SM, Day MC, Gilstrap III LC** et al. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens* 2005; 18:330–336.
256. **Wallukat G, Homuth V, Fischer T** et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103:945–952.
257. **Zhou CC, Ahmad S, Mi Tet** et al. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin / nuclear factor of activated T-cells signaling.*Hypertension* 2008; 51:1010–1019.
258. **Dechend R, Viedt C, Muller DN** et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 2003; 107:1632–1639.
259. **Thway TM, Shlykov SG, Day MC** et al. Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization through angiotensin receptor activation.*Circulation* 2004; 110:1612–1619.
260. **Irani RA, Zhang Y, Zhou CC** et al. Autoantibody mediated angiotensin receptor

- activation contributes to preeclampsia through tumor necrosis factor-alpha signaling. *Hypertension* 2010; 55:1246–1253.
261. **Dechend R, Gratz P, Wallukat G** et al. Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension* 2005; 45:742–746.
262. **Herse F, Staff AC, Hering L** et al. AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia. *J Mol Med* 2008; 86:697–703.
263. **Duckitt K, Harrington D**. Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330:565.
264. **Pierangeli SS, Liu X, Barker JH** et al. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1995; 74:1361-1367.
265. **Bulíková A, Crha I**. Antifosfolipidové protilátky a antifosfolipidový syndrom v porodnictví. *Praktická gynekologie* 2001; 4: 6-10.

# 11 Publikační činnost

## 11.1 Články v časopisech

1. **Hradecký L**, Subrt I, Ulcova Gallova Z. Urgent termination of pregnancy in preclampsia and panel of antiphospholipid antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology* 62, 2009 412- 417.
2. Ulcova-Gallova Z, Brabcova H, Kokes V, **Hradecký L**, Novotny Z, Rokyta Z. History of incidence of autoimmune and oncological diseases in identical female twins. *Am J Reprod Immunol.* 2009 Dec, 2(6):349-51.
3. Subrt I, Ulcova- Gallova Z, Bibkova K, Micanova Z, Hejnalova M, Cerna M, **Hradecký L**, Novotny Z. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in czech women. *American Journal of Reproductive Immunology* 59,2008,193-200.
4. Šigutová P, Hajsmanová Z, Slechtová J, Subrt I, **Hradecký L**, Ulcová-Gallová Z. Sledování hemokoagulačních změn v průběhu těhotenství žen s opakovaným potrácením v závislosti na podávání nízkomolekulárního heparinu. *Česka Gynekol.* 2009;74(5):348-54.
5. Suchá R, Uher P, **Hradecký L**, Kralíčková M, Rokyta Z, Prodloužená kultivace prvojader do blastocyt u kryocyklů. *Praktická gynekologie.* 2005,6, 27.
6. **Hradecký L.**, Suchá R., Uher P., Ulčová-Gallová Z., Rokyta Z.: Intracytoplasmic Morfologically Selected Sperm Injection (IMSI) – a New Method in the Treatment of Andrological Factor of Infertility. XII. Symposium českých reprodukčních imunologů s mezinárodní účastí, Žďár nad Sázavou, 2006, abstrakt.
7. Ulčová-Gallová Z., Brabcová H., Kokeš V., **Hradecký L.**, Novotný Z., Rokyta Z.: Autoimunitní a onkologická onemocnění u jednovaječných dvojčat ženského pohlaví (kazuistika). XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 2010, abstrakt.
8. Ulcova-Gallova Z., Brabcova H., Kokes L., **Hradecký L.**, Novotny Z., Rokyta Z.: Autoimmune and oncological diseases in identical female twins (case report). 8th European Congress on Reproductive Immunology, Munich, 2010 abstract in *J.Reprod.Immunol.*86, 2010, 106.

## **11.2 Postery**

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

## **11.3 Přednášky**

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