

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Eva Mitášová

2013

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Lékařská imunologie

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

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

Mgr. Eva Mitášová

Školitel: doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové,.....2013

Poděkování

Tímto bych velice ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Ctiradu Andrysovi, Ph.D. za cenné připomínky, trpělivost a čas, který obětoval pro zrod disertační práce. Také prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za jeho hodnotné rady, vstřícnost a pochopení během studia. Paní Haně Kotlandové velmi děkuji za pěkné a přehledné grafické zpracování. Poděkování patří rovněž celému kolektivu Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK za poskytnutí přátelského zázemí.

Vyzdvihnout a velice poděkovat bych chtěla MUDr. Marianu Kacerovskému, Ph.D. z Porodnické a gynekologické kliniky FN HK, který přinesl myšlenku spolupráce mezi oběma klinikami, za poskytnutí informací, pomoc a motivaci během doktorského studia.

Nakonec bych ráda poděkovala svým rodičům za neustálou podporu a své rodině za pochopení pro práci, kterou dělám.

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

Obsah

| | |
|---|----|
| Použité zkratky | 6 |
| 1. Úvod | 9 |
| 1.1. Základní principy fungování imunitního systému | 10 |
| 1.2. Těhotenství | 13 |
| 1.2.1. Vývoj placenty | 13 |
| 1.2.2. Funkce placenty | 16 |
| 1.2.3. Plodové obaly | 17 |
| 1.2.4. Plodová voda | 19 |
| 1.2.5. Pupečník | 19 |
| 1.2.6. Pupečnicková krev | 20 |
| 1.3. Tolerance - imunitní systém v těhotenství | 20 |
| 1.3.1. Invaze trofoblastu a složky imunitního systému | 20 |
| 1.3.2. Děloha - imunologicky privilegované místo | 22 |
| 1.3.3. Th1/Th2 posun | 23 |
| 1.3.4. T regulační lymfocyty | 23 |
| 1.4. Termínový porod a imunitní systém | 24 |
| 1.5. Předčasný porod a předčasný odtok plodové vody | 25 |
| 1.5.1. Intraamniální infekce - IAI | 26 |
| 1.5.1.1. HCA a funisitida | 27 |
| 1.5.1.2. Diagnostika PPRM | 29 |
| 1.5.1.3. Management PPRM | 30 |
| 1.6. Stanovované markery | 31 |
| 1.6.1. Receptory pro nebezpečné vzory | 31 |
| 1.6.1.1. Solubilní Toll-like receptor 2 | 32 |
| 1.6.1.2. Solubilní vycytávací receptor CD163 | 33 |
| 1.6.1.3. Pentraxin 3 – protein akutní fáze | 34 |
| 1.6.2. Prozáněťové molekuly | 36 |
| 1.6.2.1. Interleukin 6 | 36 |
| 1.6.2.2. Interleukin 8 | 37 |
| 1.6.2.3. Matrixová metaloproteáza 8 | 38 |
| 2. Cíle disertační práce | 40 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3. | Soubor pacientek a metodika | 41 |
| 3.1. | Soubor pacientek..... | 41 |
| 3.2. | Sběr vzorků | 41 |
| 3.3. | Diagnostika | 42 |
| 3.3.1. | Stanovení předčasného odtoku plodové vody | 42 |
| 3.3.2. | Stanovení HCA a funisitidy | 42 |
| 3.3.3. | Stanovení MIAC | 42 |
| 3.4. | Stanovení koncentrace markerů v pupečnickové krvi | 43 |
| 3.4.1. | ELISA metoda..... | 44 |
| 3.5. | Statistika..... | 44 |
| 4. | Výsledky | 45 |
| 4.1. | Demografické a klinické výsledky..... | 45 |
| 4.1.1. | Soubor pacientek pro analýzu interleukinů IL-6, IL-8, matrixové metaloproteázy 8, pentraxinu 3 a solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 | 45 |
| 4.1.2. | Soubor pacientek pro analýzu solubilní formy Toll like receptoru 2..... | 45 |
| 4.2. | Koncentrace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi | 46 |
| 4.2.1. | Koncentrace solubilního Toll like receptoru 2 v pupečnickové krvi..... | 46 |
| 4.2.2. | Koncentrace solubilního vychytávacího receptoru CD163 v pupečnickové krvi | 47 |
| 4.2.3. | Koncentrace pentraxinu 3 v pupečnickové krvi..... | 48 |
| 4.2.4. | Koncentrace interleukinu 6 v pupečnickové krvi | 49 |
| 4.2.5. | Koncentrace interleukinu 8 v pupečnickové krvi | 50 |
| 4.2.6. | Koncentrace matrixové metaloproteázy 8 v pupečnickové krvi..... | 51 |
| 4.3. | Korelace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi..... | 53 |
| 4.3.1. | Vzájemná korelace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi..... | 53 |
| 4.4. | ROC křivky identifikovaných markerů v pupečnickové krvi..... | 56 |
| 4.4.1. | ROC křivky markerů v pupečnickové krvi k diagnostice HCA | 56 |
| 4.4.2. | ROC křivka markerů v pupečnickové krvi k diagnostice funisitidy..... | 56 |
| 5. | Diskuze..... | 60 |
| 6. | Závěr | 74 |
| 7. | Použitá literatura | 75 |
| 8. | Přílohy | 100 |

Použité zkratky

| | |
|------------------|---|
| ADCC | Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách |
| AP | Aktivátorový protein |
| APC | Antigen prezentující buňka |
| AUC | Plocha pod ROC křivkou |
| BAL | Bronchoalveolární laváž |
| BMI | Body mass index |
| CD | Diferenční antigen |
| COX | Cyklooxygenáza |
| CRL | Temenkostrční délka plodu |
| CRP | C reaktivní protein |
| CXC | Chemokinová rodina |
| CXCR | Chemokinový receptor |
| DAF | Komplementová regulační molekula |
| DAMP | Endogenní signály nebezpečí |
| DC | Dendritické buňky |
| ECM | Extracelulární matrix |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| FasL | Fas ligand |
| FIRS | Syndrom fetální zánětlivé odpovědi |
| GDP | Guanosindifosfát |
| GTP | Guanosintrifosfát |
| hCG | Lidský choriový gonadotropin |
| HCA | Histologická chorioamnionitidu |
| HCA ^a | skupina žen s diagnostikovanou HCA bez funisitidy |
| HLA | Lidský histokompatibilní antigen |
| Hp-Hb | Haptoglobin-hemoglobinový komplex |
| HSP | Protein teplotního šoku |
| HUVECs | Lidské umbilikální vaskulární endotelové buňky |
| IAI | Intraamniální zánět |
| IFN | Interferon |
| Ig | Imunoglobulin |
| IGFBP | Insulin-like Growth Factor Binding Protein |

| | |
|----------------|---|
| IL | Interleukin |
| IQR | Interkvartilový rozsah |
| JAK | Janus tyrosinkinázy |
| KIR | Inhibiční receptor NK buněk |
| LIF | Leukemický inhibiční faktor |
| LPS | Lipopolysacharid |
| LR | Věrohodnostní poměr |
| M-CSF | Faktor stimulující kolonie makrofágů |
| MAPK | Mitogeny aktivované proteinkinázy |
| mDC | myeloidní dendritické buňky |
| MCP/CD46 | Membránový kofaktorový protein |
| MCP | Chemotaktický protein monocytů |
| MHC | Hlavní histokompatibilní komplex |
| MIAC | Mikrobiální invaze amniální dutiny |
| MMP | Matrixová metaloproteáza |
| NET | Neutrofilní extracelulární pasti |
| NF- κ B | Nukleární faktor kappa B |
| NK | Přirozený zabíječ |
| PAMP | Struktury charakteristické pro patogeny |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| PG | Prostaglandin |
| PR | Receptor progesteronu |
| PRG | Progesteron |
| PRR | Receptory pro nebezpečné vzory |
| PPROM | Předčasný odtok plodové vody |
| PTX | Pentraxin |
| ROC | Graf prahové operační charakteristiky |
| sCD163 | solubilní molekula CD163 |
| sTLR | solubilní Toll like receptor |
| TIMP | Tkáňové inhibitory metaloproteáz |
| SAP | Sérový amyloid P |
| SOCS | Supresor cytokinové signalizace |
| SP | Surfaktový protein |
| SRCR | Scavenger receptor cysteine-rich |

| | |
|------|---|
| STAT | Signální transduktory a aktivátory transkripce |
| TCR | T buněčný receptor |
| TGF | Růstový transformující faktor |
| Tc | Cytotoxický T lymfocyt |
| Th | T pomocný lymfocyt |
| TIMP | Tkáňový inhibitor matrixové metaloproteázy |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |
| Treg | T regulační lymfocyty |
| TSG | Tumor necrosis factor-stimulated gene sequences |

1. Úvod

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

Předčasný porod představuje jeden z nejzávažnějších problémů současného porodnictví. Významně se podílí na perinatální mortalitě a morbiditě novorozenců. Předčasný odtok plodové vody je zodpovědný zhruba za jednu třetinu předčasných porodů a jeho přesná etiologie není zcela objasněna. Intraamniální infekce/zánět je nejčastější rizikový faktor asociovaný s předčasným porodem a předčasným odtokem plodové vody. Infekce bývá asymptomatická, zapříčiněná ascendentní invazí bakterií z vagíny. Mikrobiální invaze do amniální dutiny může způsobit zvrát v doposud bezproblémovém těhotenství a vést k intraamniálnímu zánětu, který je následován rozvojem subklinické histologické chorioamnionitidy. Její nejzávažnější forma, zánět pupečníku (funisitida), odráží zánětlivou odpověď plodu.

Zvýšené koncentrace prozáněťových markerů v pupečnickové krvi a v plodové vodě jsou pozorovány u předčasného porodu zkomplikovaného přítomným zánětem. Na základě tohoto zjištění jsme se rozhodli vyšetřit v pupečnickové krvi koncentrace interleukinu IL-6, IL-8, matrixové metaloproteázy 8 (MMP-8), pentraxinu 3, solubilního Toll-like receptoru 2 a solubilního scavenger receptoru pro hemoglobin (sCD163) a určit jejich vztah k intraamniální infekci. Tyto molekuly jsou považovány za markery zánětu, jejichž koncentrace se zvyšuje při aktivaci imunitního systému. Námi zvolené ukazatele by mohly být využívány k včasné diagnostice histologické chorioamnionitidy a funisitidy a pomoci při správné lékařské intervenci.

1.1. Základní principy fungování imunitního systému

Imunitní systém lze vystihnout jako základní soustavu organismu k udržení stálého vnitřního prostředí, který spolupracuje s dalšími tělními soustavami zejména s neuroendokrinní. Změny, které by narušily homeostatickou integritu, je schopen rozpoznat a adekvátně na ně reagovat. Takovým podnětem může být vniknutí infekčních agens, proti kterým dokáže imunitní systém účinně bojovat. Obranschopnost patří mezi základní funkce imunitního systému. Identifikovat dokáže nejen patogeny ale také abnormální struktury na vlastních tkáních. Zmutované, nádorové či jinak poškozené buňky imunitní systém odstraňuje. Mluvíme o tzv. imunitním dozoru [1]. Dále dokáže rozeznat vlastní tkáně, vůči kterým udržuje toleranci. Imunitní soustava je schopna přijmout řadu různorodých podnětů pomocí svých receptorů, zpracovat je a odpovědět efektorovou aktivitou. Všechny úkony jsou přitom přísně regulovány.

Imunitní systém můžeme z fylogenetického a funkčního hlediska rozdělit na dvě hlavní větve. Evolučně starší, s receptory předem připravenými a reagující ihned, se nazývá imunita vrozená, nebo také imunita přirozená či nespecifická. Její základní funkcí je okamžitá obrana proti patogenům. Naopak evolučně mladá, vytvářející receptory na jakýkoliv antigen a reagující se zpožděním je imunita specifická, též zvaná adaptivní. Ta se navíc vyznačuje imunologickou pamětí. Tedy přetrváním antigenně specifických klonů T a B lymfocytů v těle. Obě linie spolu kooperují, pozitivně i negativně se regulují a jsou na sobě závislé [2].

Aktivace přirozeného imunitního systému nastává po rozpoznání povrchových a intracelulárních struktur charakteristických pro patogeny (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP). Děje se tak za pomoci speciálních receptorů, které identifikují nebezpečné vzory mikroorganismů (Pathogen Pattern Receptors, PPRs) [3]. PPRs mají ve svých membránách zabudované fagocytující buňky, což jsou monocyty, makrofágy, neutrofilní a eosinofilní granulocyty a antigen prezentující buňky. Po navázání PAMP na PRR dochází k aktivaci signálních drah uvnitř buňky, jenž spouští mnoho efektorových funkcí. Kromě zahájení procesu fagocytózy a likvidace pohlceného materiálu, buňky začínají produkovat a do svého okolí uvolňovat látky zvané cytokiny [4]. Tyto působky mají informační a regulační charakter a spolupodílí se na následném průběhu odstranění patogenů. Mezi důležité molekuly, které zprostředkují systémovou odpověď organismu na zánět, patří IL-1 β , IL-6 a tumor nekrotizující faktor

TNF- α [5]. Jejich působením dochází k syntéze proteinů akutní fáze zánětu či aktivaci buněk přirozené imunity [6]. Pro aktivaci složek specifické imunity je významná molekula IL-12. Dalším nepostradatelným cytokinem je IL-8, který slouží jako chemoatraktant pro imunokompetentní buňky a podporuje jejich infiltraci do míst zánětu. Pro plnou aktivaci monocytů/makrofágů je zapotřebí zpětné vazby od T pomocných lymfocytů typu 1 (Th1) v podobě sekretovaných cytokinů, zejména interferonu (IFN)- γ . Po jeho působení se spouští velice účinný likvidační enzymový komplex, který produkuje oxid dusnatý se silným mikrobicidním účinkem [7].

Pro boj s virovou infekcí nebo k rozpoznání abnormálních buněk má vrozená imunita speciální populaci „přirozených zabíječů“, NK buněk (Natural Killer). Na jejich povrchu se vyskytují aktivační a inhibiční receptory. Inhibiční receptory rozpoznávají např. MHC glykoproteiny I. třídy (Major Histocompatibility Complex, MHC gp I), které exprimují všechny jaderné buňky. NK buňky rozeznávají také neklasické MHC glykoproteiny I. třídy, jež exprimují buňky různých tkání a váží např. peptidy pocházející z klasických MHC gp I. Mezi neklasické MHC gp I patří např. lidský leukocytární antigen (Human Leukocyte Antigen, HLA)-G vyskytující se pouze na buňkách trofoblastu. Pokud buňka exprimuje pozměněné MHC gp I nebo žádné, chybí NK buňkám inhibiční signál a aktivují se s cílem alterovanou buňku zničit [8]. Aktivační receptory NK buněk identifikují stresové proteiny a opsoniny na povrchu ostatních buněk. Výsledná reakce NK buněk závisí na převaze inhibičního či aktivačního signálu. Po aktivaci NK buňky zahajují cílenou likvidaci terčové buňky navozením apoptózy a současně začínají produkovat IFN- γ , silné antivirotikum, které stimuluje ostatní NK buňky k proliferaci [9].

Velmi významnou složkou imunitního systému je komplementový systém. Skládá se z různých plasmatických proteinů, které v konkrétních krocích mezi sebou reagují v proteolytické kaskádě, na jejímž konci mnohdy dochází ke zničení patogenu. Mezi základní součásti komplementového systému se řadí proteiny C1 – C9. Kromě cytolyzy buněk má komplementový systém ještě další funkce. Meziprodukty v kaskádě reakcí slouží jako chemotaktické (C5a C3a) a opsonizační (C3b) molekuly, jež modulují odpověď vrozené i adaptivní imunity [10]. K aktivaci komplementového systému může dojít několika způsoby. Jsou objasněny klasická, alternativní a lektinem vázajícím mannosu cesty. K nim patří klasická, alternativní a lektinová cesta. Všechny tři způsoby mají společné štěpení C3 a C5 proteinu, které jsou nutné ke všem zmiňovaným funkcím

a všechny končí sestavením komplexu atakujícího membránu (MAC) a lýzou cílové buňky [11].

Zapojení specifické imunity do odstranění patogenů bývá opožděné. Počátek reakce nastává po předložení fagocytovaných a již zpracovaných patogenních antigenů na antigen prezentujících buňkách (Antigen Presenting Cell, APC). Nejeftektivněji prezentují antigeny dendritické buňky (Dendritic Cell, DC). APC vystavují pohlcené fragmenty na povrchových glykoproteinech MHC II. třídy, jenž mohou být rozpoznány T buněčným receptorem (TCR) a jeho koreceptorem CD4 na Th lymfocytech [12]. Pokud APC uvolňuje do okolí IL-12, Th0 lymfocyty determinuje tento cytokin k diferenciaci do Th1 subsetu [13]. Aby došlo k plné aktivaci Th1 T lymfocytů jsou nutné ještě další stimuly jako např. kontakt adhezivních molekul nebo propojení kostimulačních receptorů obou buněk. Až poté, co jsou všechny tyto podmínky splněny, začíná Th1 buňka produkovat cytokiny. Pro makrofágy je esenciální sekrece IFN- γ a pro samotné Th1 je důležitý cytokin IL-2, který slouží jako autokrinní růstový faktor nezbytný pro přetrvání aktivované formy Th1 [14].

Pokud se Th buňky setkají s APC uvolňující do okolí IL-4 (často B lymfocyt) předurčuje to jejich diferenciaci do Th2 subsetu. Opět je potřeba vytvořit mezi buňkami signalizační, adhezivní a kostimulační kontakty, které vyvolají aktivační procesy v Th2 lymfocytech. Poté Th2 buňky sekretují cytokiny IL-4, IL-5 a IL-6, jenž napomáhají v přeměně B lymfocytů na plasmocyty, buňky produkující vysoce antigenně specifické protilátky. Zároveň uvolňují molekuly IL-10, které inhibují vývoj Th1 lymfocytů. Stejně tak produkty Th1 buněk (hlavně IFN- γ) zamezuje vývoji okolních Th lymfocytů do Th2 linie. Cytokinové prostředí, v kterém se ocitne naivní Th buňka, způsob prezentace antigenních peptidů a následná vzájemná regulace Th1 a Th2 linií ovlivňuje výslednou imunitní odpověď [15].

Pokud se během imunitní reakce vytvoří cytokinové prostředí kombinující IL-6, IL-23 a růstový transformující faktor (TGF)- β , vývoj Th0 lymfocytů je směřován do větve T pomocných lymfocytů typu 17 (Th17). Tento typ lymfocytů podporuje zánět a obranu proti mikroorganismům indukci produkce cytokinu IL-17. Je zapojen do mnoha patogenních stavů (autoimunita, chronický zánět) [16].

Th lymfocyty se mohou v přítomnosti IL-10 a TGF- β , jenž pak samy produkují, diferencovat do klonu Th3 a Tr1. Jedná se o indukované T regulační lymfocyty (iTreg), jejichž hlavním úkolem je korigovat imunitní odpověď a zabránit tak případné

nadměrné imunitní reakci [17]. V lidském organismu se také vyskytují přirozené T regulační lymfocyty, jenž stejně jako iTreg mírní imunitní odpověď, brání rozvoji autoimunitní imunopatologické reaktivity a mají nezastupitelnou úlohu v mateřské toleranci plodu (viz T regulační lymfocyty).

Kromě pomocných T lymfocytů je součástí specifické imunity populace cytotoxických CD8 pozitivních T lymfocytů (Tc), která antigen rozpoznává v kontextu MHC gp I. Efektorovou funkcí Tc je přímá destrukce cílové buňky navozením apoptózy a produkce cytokinů IFN- γ , TNF- α a IL-2 [18].

Výše popsané mechanismy imunitního systému jsou vylíčeny stručně a ve vztahu k problematice řešené dále v disertační práci. Nejsou zde zohledněny veškeré buněčné populace a humorální složky.

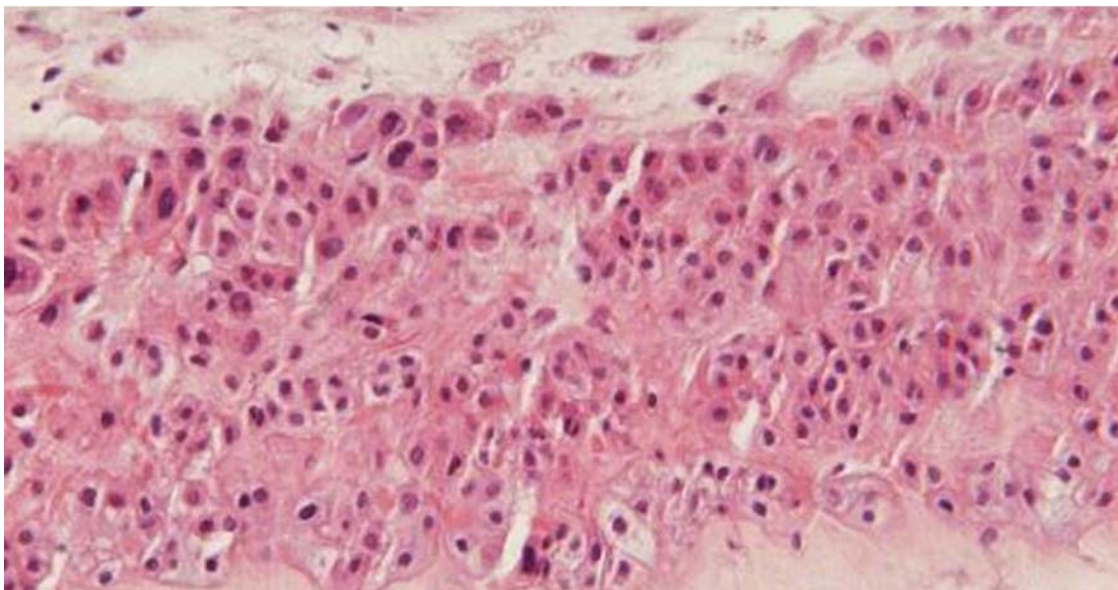
1.2. Těhotenství

Těhotenství je fyziologický stav, který trvá od početí až po narození dítěte, kdy se z oplodněného vajíčka stává zárodek embrya a vyvíjí se ve zralý plod. Průměrná doba trvání je 10 lunárních měsíců, 40 týdnů, tj. 280 dnů od 1. dne poslední menstruace. Tato doba se dělí na tři trimestry. Těhotenství je spojeno s výraznými změnami v organismu matky. Většina změn je zapříčiněna navyšující se koncentrací hormonů (progesteronu, estradiolu, kortizolu, aldosteronu). Dochází ke změnám v krevním oběhu, ke zvýšenému prokrvování dělohy, k zvětšení objemu tekutin či zrychlení srdeční činnosti. Důsledkem rostoucí dělohy, která svoji hmotnost zvýší až na jeden kilogram z původních asi 50-70 g, jsou utlačovány žíly v pánevní oblasti a dochází ke zhoršenému odtoku krve z dolních končetin. Krev může být anemická. Dále se mohou objevit problémy jako je ranní nevolnost, pálení žáhy, zácpa či psychické změny vlivem měnících se hodnot hormonů [19].

1.2.1. Vývoj placenty

Placenta je nepostradatelnou součástí pro zdárný vývoj zárodku ve zralý plod. Zajišťuje výměnu plynů, výživu plodu a produktů metabolismu. Představuje významný zdroj hormonů udržující těhotenství a v neposlední řadě plní funkci imunologické bariéry [20].

Vývoj placenty začíná po uhníždění blastocysty ve velmi raném embryonálním stadiu. Na vzniku placenty se podílí mateřská decidua a embryonální tkáň trofoblastu. Po nidaci se spouští v endometriu dělohy tzv. deciduální reakce, při které dochází k přeměně fibroblastových buněk na velké deciduální buňky (obr. 1) s minimem mezibuněčné hmoty, v kterých se hromadí glykogen a kapénky lipidů. Deciduální reakce se šíří od místa implantace na celé endometrium. Vzniká membrána decidua. Přímo pod zárodkem se decidua nazývá bazální, jedná se o místo budoucí placenty [21].



Obrázek 1

Histologický preparát detailu deciduálních buněk. Obarveno eosin-hematoxylinem.

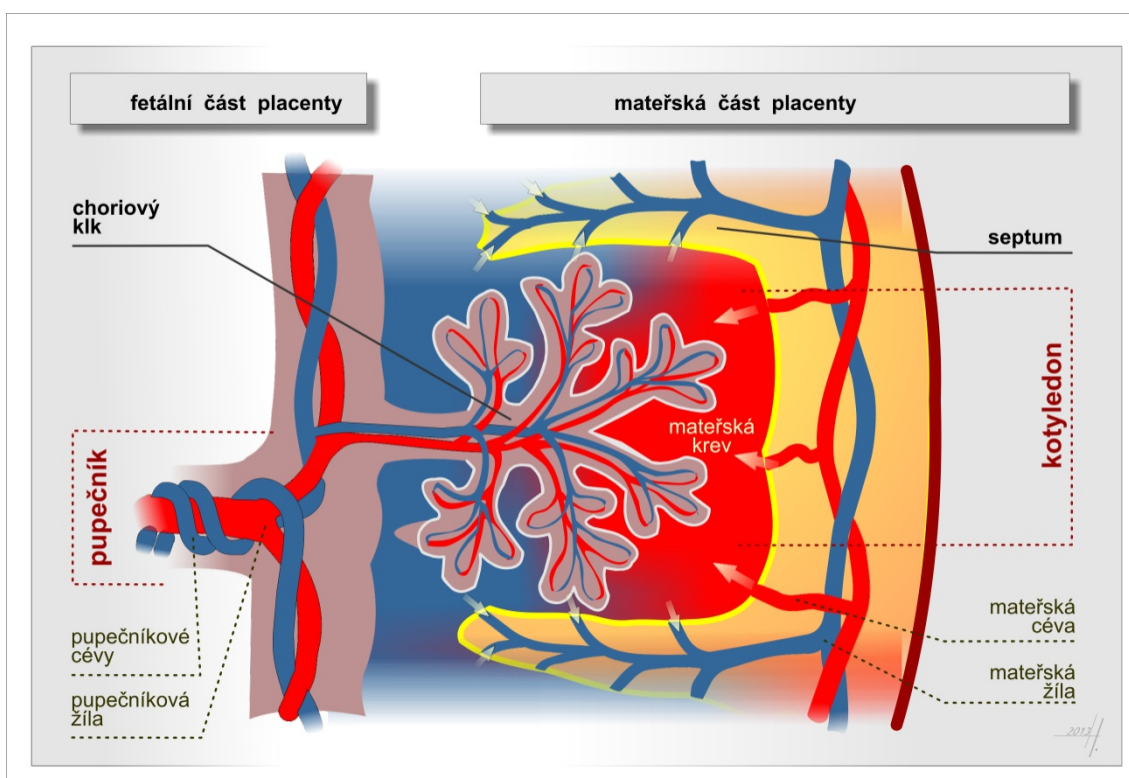
Obrázek byl pořízen ve spolupráci s mjr. MUDr. Jarolavem Pejchalem, Ph.D.

Trofoblast je zevní stěna blastocysty, která je nejprve zodpovědná za uhníždění blastocysty v endometriu dělohy a posléze se morfologicky i funkčně diferencuje na dvě části. Zevní částí zůstává vrstva zvaná syncytiotrofoblast, jež enzymaticky narušuje děložní tkáň a expanduje v podobě prstovitých výběžků. Později narušuje mateřské artérie a mění jejich stěny tak, že ztrácejí schopnost kontrakce. Zároveň vytváří dutiny splývající v intervilózní prostor, do kterého se vylévá mateřská krev. Syncytiotrofoblast je v přímém kontaktu s mateřskou krví, kterou je trvale omývá [22]. Vnitřní část trofoblastu je tvořena jednojadernými elementy cytotrofoblastu. Jedná se o rychle se dělicí vrstvu, jež slouží jako zdroj buněčných komponent pro bezprostředně naléhající syncytiotrofoblast.

Penetrující trofoblast vytváří klky, které jsou postupem vývoje vyplněny extraembryonálním mezenchymem a krevními fetálními cévami (terciární choriové klky). Hovoříme o hemochoriálním typu placentace, typickým pro člověka a hlodavce [23].

Choriové klky prorůstající do bazální deciduální tkáně jsou zachovány v rozsahu stávající placenty (chorion frondosum), klky v ostatních oblastech deciduy postupně degenerují (chorion laeve). Místem vyrůstajících klků chorion frondosum je choriová ploténka, tvořena rosolovitým vazivem, v němž vedou pupečnickové cévy. Ze strany plodu je choriová ploténka ohraničena amniovým epitelem, z mateřské strany je kryta syncytiotrofoblastem [24]. Důsledkem invadujícího trofoblastu vznikají v decidue struktury zvané kotyledony, které jsou od sebe odděleny placentárními septy (obr. 2).

Placenta je složena z mateřské bazální deciduy, deciduální ploténky, placentárních sept a fetální choriové ploténky s choriovými klky.



Obrázek 2

Schéma hemochoriálního typu placentace.

1.2.2. Funkce placenty

Vzhledem k zajištění veškerých úkonů k přežití plodu, jsou funkce placenty velmi rozmanité. V první řadě placenta slouží jako transportní orgán kyslíku, vody a živin pro plod. Opačným směrem transportuje kysličník uhličitý a odpadní metabolické produkty plodu [20].

Placenta je důležitým zdrojem hormonů. V choriových klcích je produkován choriový gonadotropin (human Chorionic Gonadotropin, hCG), jeden z nejdůležitějších hormonů těhotenství. hCG napomáhá diferenciaci cytotrofoblastu na syncytiotrofoblast, podílí se na vazodilataci děložních cév a angiogenezi. Zajišťuje přiměřené zvětšování dělohy k rostoucímu plodu a svým imunosupresivním účinkem chrání invadující choriové klky proti imunitní reakci. hCG brání degeneraci žlutého tělíska a podporuje jeho produkci progesteronu [25].

Steroidní hormon progesteron je zásadní již před početím, kdy připravuje sliznici endometria na implantaci blastocysty. Po 4. týdnu těhotenství se stává dominujícím producentem progesteronu placenta. Během těhotenství progesteron inhibuje syntézu prostaglandinů a tím tlumí kontraktilitu myometria. Je nezbytný pro udržení těhotenství [26].

Mezi další hormony produkované placentou patří choriový thyreotropin (TSH), lidský placentární laktogen (HPL), adrenokortikotropní hormon (ACTH), folikuly stimulující hormon, estrogen, oxytocin, vazopresin, relaxin a další [27].

Placenta zastává funkci bariéry, jež brání mísení mateřské a fetální krve. Neplatí to však stoprocentně. Pro přestup látek z mateřské krve do krve fetální je potřeba překonat plasmatickou membránu, cytoplasmu a posléze bazální membránu syncytiotrofoblastu. Membrány syncytiotrofoblastu představují nejdůležitější bariéru v transportu. Poté molekuly přestupují skrz stroma choriových klků a endotelu kapilár do fetální cirkulace. Většina látek přes placentu přechází prostou či usnadněnou difúzí (kyslík, glukóza) pro některé jsou zapotřebí transportní membránové proteiny a pumpy (aminokyseliny, ionty Na^+ , K^+). Látky obsahující velké molekuly jako fosfolipidy, lipoproteiny nebo imunoglobuliny G (IgG) jsou resorbovány pinocytózou. IgG poskytuje plodu pasivní imunitu po porodu a napomáhá k překlenutí doby, než je imunitní systém novorozence schopen produkce svých protilátek [28].

Selektivní propustnost placenty se uplatňuje i v případě pronikání mikroorganismů. Zejména viry mohou lehce pronikat přes placentu a vážně plod

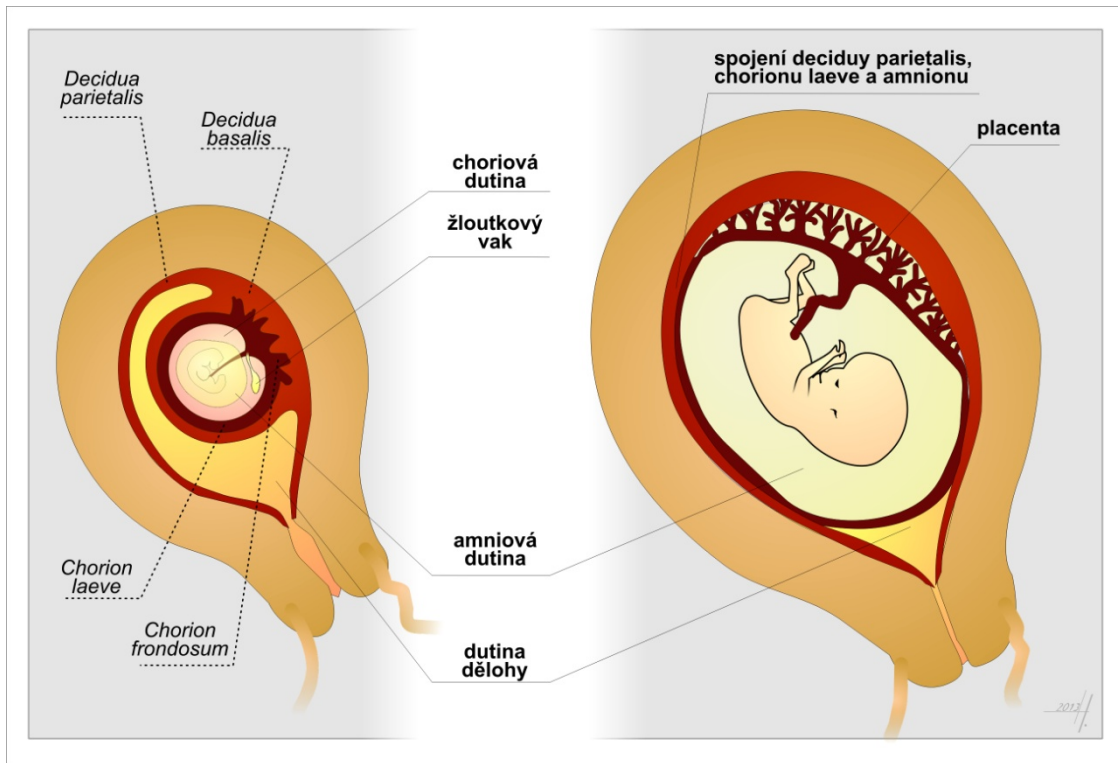
poškodit. Velmi nebezpečné pro plod jsou viry spalniček, zarděnek, cytomegaloviru nebo HIV [29, 30].

1.2.3. Plodové obaly

Plodové obaly amnion a chorion se začínají tvořit již ve stadiu blastocysty. Na konci těhotenství vytváří plochu 1 000 – 1 200 cm², z toho 30 % spočívá v oblasti placenty. Vnitřní plodový obal – amnion, je průsvitná blána, která je v přímém kontaktu se zárodkem/plodem a ohraničuje amniální dutinu. Vzniká přiložením vazivové vrstvy extraembryonálního mezodermu k ektodermu amnia. Není inervován ani vaskularizován. Amnion se skládá z epitelové vrstvy, bazální membrány z mesodermu a tzv. spongiózní vrstvy, která doléhá na chorion a vyznačuje se vysokým obsahem kolagenu typu III, glykoproteinů a proteoglykanů, což zajišťuje stabilitu v tahu. Epitel amnia je schopen produkovat bioaktivní faktory, např. růstové faktory a cytokiny. Před nástupem porodu začíná produkovat velké množství PGE₂ a enzymy nutné k jeho syntéze, čímž se podílí na spouštění a průběhu porodu [31].

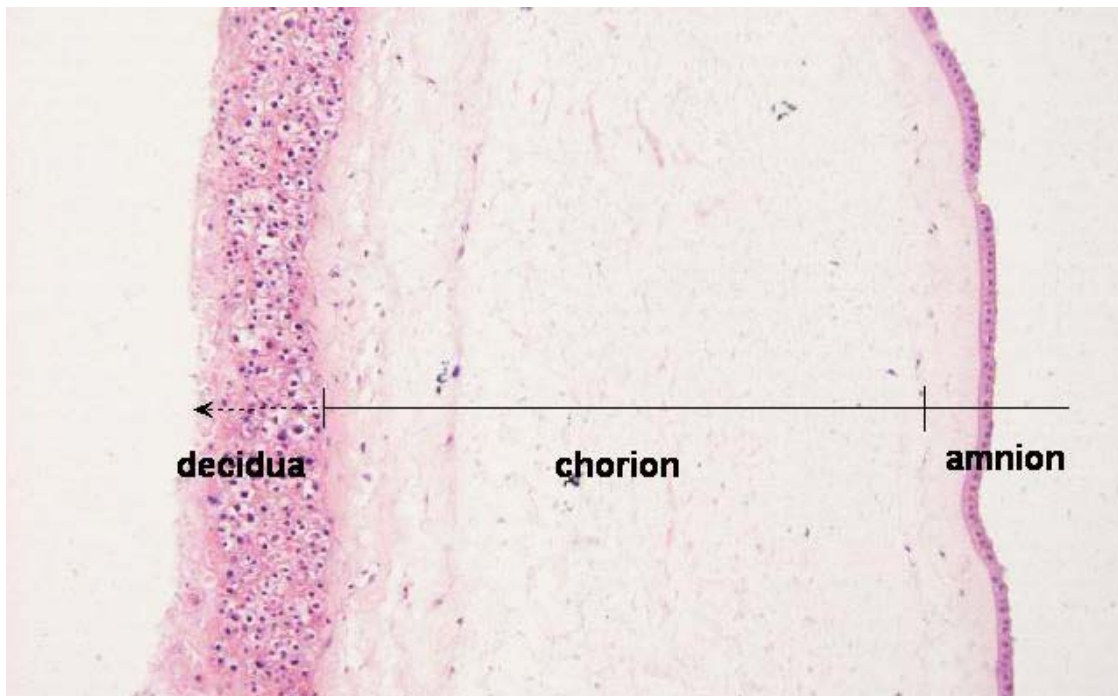
Chorion je vnější plodový obal. Tvoří se přiložením extraembryonálního mezodermu k trofoblastu. Je tvořen vrstvou mesenchymu a trofoblastových buněk. Chorion vyskytující se mimo placentu neobsahuje žádné cévy ani nervy. Buňky trofoblastu syntetizují mnoho molekul, např. cévní růstový endotelový faktor, který výrazně podporuje angiogenezi [32]. Chorion vybíhá v choriové klky, jenž pronikají do deciduy (postupně převládají v decidua basalis jako chorion frondosum).

Amnion a chorion jsou spojeny v zárodečném stvolu a zhruba v jedné třetině těhotenství srůstají v jednotný obal amniochorion. Představují rozsáhlou plochu pro potenciální transport vody a nízkomolekulárních molekul (glukóza, urea), čímž významně regulují složení plodové vody [33]. Amniochorion poté srůstá s membránou deciduy a vzniká plodový vak (obr. 3, 4).



Obrázek 3

Schématický vývoj plodových obalů.



Obrázek 4

Histologický preparát plodových obalů srostlých v plodový vak. Vzorek zčásti zbaven vrstvy deciduy. Obarveno eosin-hematoxylinem.

Obrázek byl pořízen ve spolupráci s mjr. MUDr. Jarolavem Pejchalem, Ph.D.

1.2.4. Plodová voda

Plodová voda je nezbytnou tekutinou, která se nachází v amniální dutině a udržuje optimální prostředí pro vyvíjející se plod. Chrání jej proti otřesům, zabraňuje srůstům amnia s povrchem plodu a účastní se transportu látek. Až z 99 % je tvořena vodou. Objem plodové vody s postupem těhotenství přibývá od 30 ml v 10. gestačním týdnu po 780 ml v 32. - 35. gestačním týdnu. Do 20. týdne těhotenství je plodová voda tvořena mateřskou tekutinou prosáklou přes pupečník a tekutinou produkovanou fetální membránou amnia. V druhé polovině těhotenství je hlavním zdrojem plodové vody moč. Tu plod začíná vylučovat mezi 8. – 11. gestačním týdnem a v ten stejný okamžik začíná plodovou vodu polykat. Plicní tkáň nebo ústní a nosní dutina také přispívají k zmnožení plodové vody [34]. Přes plodovou vodu prochází voda a rozpustné látky ve vodě, čímž se stává tato tekutina velice bohatou na proteiny [35].

Plodová voda je velice cenným materiálem k prenatalní diagnostice vývojových vad, které se vyšetřují z uvolněných kožních buněk zárodku. V poslední době dochází k nadějnému výzkumu pluripotentních kmenových buněk izolovaných z plodové vody [36].

Plodová voda je za normálních okolností sterilní a izolace mikroorganismů svědčí o mikrobiální invazi amniální dutiny [37].

1.2.5. Pupečník

Pupečník je vaskularizovaný provazec spojující plod s placentou. Jeho vývoj začíná již ve 4. týdnu těhotenství spolu s placentou a zahrnuje následující formace: zárodečný stvol (útvár mezi zárodkem a cytotrofoblastem obsahující pupečnickové cévy), ductus omphaloentericus (spojka mezi trávicí trubicí a zbytkem žloutkového váčku) a pupečnickový coelom (kanál spojující intra- a extraembryonální coelom) [38]. Jedná se o poměrně složitý proces vývoje s několika mezistupni. V 10. týdnu těhotenství se zárodečný stvol spojuje s ductus omphaloentericus v primitivní pupečník a koncem 4. lunárního měsíce je vyvinut definitivní pupečník. Jeho povrch je kryt epitelem amnia. Vyplněn je extraembryonálním mezodermem, který se přeměňuje na rosolovité vazivo, tzv. Whartonův rosol, v němž jsou uloženy tři pupečnickové cévy. Směrem k placentě putuje krev ve dvou pupečnickových tepnách, směrem k plodu vede krev v jedné pupečnickové žíle. S postupujícím těhotenstvím se pupečník prodlužuje až na 50 cm a šroubovitě se stáčí převážně levotočivě [39].

1.2.6. Pupečnicková krev

Pupečnickovou krví rozumíme krev obsaženou v placentě a pupečnicku, jejíž původ je fetální. Zajišťuje přísun živin a zároveň odvod metabolických látek přes placentu. Pupečnicková krev je oproti krvi dospělého jedince bohatá na hematopoetické kmenové buňky a mezenchymální kmenové buňky, které začínají mít obrovský význam v novodobých transplantacích a v odvětví regenerativní medicíny [40]. Odběr pupečnickové krve se provádí ihned po porodu placenty a podvázání pupečnicku z pupečnickové žíly.

1.3. Tolerance - imunitní systém v těhotenství

Místem vzniku imunitních buněk je kostní dřeň, nicméně jejich působení je ve všech tělních tkáních, včetně reprodukčních orgánů. Jak se ukazuje, již samotné početí je podmíněno správně fungující imunitou. Během těhotenství dochází k významným změnám v imunitním systému, které hrají zásadní roli při procesech, jakými jsou zdárná implantace plodového vejce, vývoj placenty a zejména dlouhodobá tolerance plodu. Přítomný plod se jeví imunitnímu systému matky jako semialogenní vlivem částečně rozdílných alelických forem molekul HLA, které jsou z poloviny otcovské. Mohou být rozeznávány mateřským imunitním systémem jako cizí a může proti nim být zahájena imunitní odpověď. Tato reakce by mohla být pro plod fatální a vyústit až v jeho záhubu. Proto jsou zde potřebné regulační mechanismy, které velice dobře kooperují s efektorovými imunitními mechanismy a zajišťují maximální ochranu plodu proti útoku mateřského imunitního systému. Je třeba vyzdvihnout, že imunitní systém neprochází supresí, ale cílenou imunomodulací [41].

1.3.1. Invaze trofoblastu a složky imunitního systému

Ač to může působit paradoxně, počátek tolerance zárodku začíná zánětovou reakcí. Pro implantaci je děložní endometrium přizpůsobené mezi 19. a 23. dnem menstruačního cyklu a v této době je schopné transformovat své buňky na větší ovoidní buňky deciduální. Jak se blastocysta orientuje v děložním prostředí, není zcela známo, nicméně se objevila zajímavá hypotéza o chemokinovém gradientu. Ta dokazuje produkci chemokinů endometriálním epitelem a expresi příslušných chemokinových receptorů na blastocystě, díky kterým blastocysta nachází optimální místo pro nidaci

[42]. Během invaze trofoblastové buňky narušují endometrium dělohy, která se následně regeneruje a remodeluje rostoucí placentou, což je silně spojeno se zánětovou Th1 imunitní odpovědí [43]. V této době převládají prozánětové cytokiny IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , leukemický inhibiční faktor (LIF) a angiogenické faktory [44, 45]. Takové cytokinové prostředí zároveň indukuje produkci adhezivních molekul mezi plodem a mateřskou tkání [46].

Důležitou úlohu při implantaci blastocysty mají makrofágy, které svojí fagocytární činností odstraňují apoptotický materiál a skrze produkovaný TNF- α kontrolují rozsah invaze trofoblastu. Nadměra uvolňovaného TNF- α z aktivovaných makrofágů může být jednou z příčin preeklampsie, která se klinicky manifestuje endoteliální dysfunkcí. Na druhou stranu určitá míra kontroly invazivity trofoblastu je nutná a brání agresivnímu pronikání [47, 48].

Vzniklá membrána decidua je imunologicky aktivní tkáň, která obsahuje dynamicky se měnící populace mateřských imunitních buněk v závislosti na stádiích těhotenství [49]. Nejvyšší podíl mají v deciduální tkáni tzv. uterinní NK (uNK) buňky, které tvoří 40 % populace imunitních buněk. Makrofágy jsou zastoupeny 20-25 %, T lymfocyty 5-10 % a dendritické buňky (DC) 2 %. B lymfocyty nejsou v decidue přítomny [50]. Během prvního trimestru se uNK buňky, DC, stejně jako již zmiňované makrofágy akumulují kolem invadujícího trofoblastu a mají zřejmě nezbytnou funkci v jeho formování v deciduální tkáni.

Z infiltrované lymfocytární populace tvoří uNK v deciduální tkáni 70 % [51]. Jsou detekovatelné ihned po implantaci blastocysty. uNK jsou specializovanou populací a od NK buněk v periferní krvi se liší rozdílnými povrchovými markery a schopnostmi. Populace uNK vzniká nejpravděpodobněji z extrauterinních progenitorových buněk [52]. Uvolňují do okolí chemokin IL-8 a angiogenické růstové faktory a napomáhají tak invazi buněk trofoblastu. Při experimentálních pokusech s deplecí uNK buněk se ukázalo, že trofoblast nebyl schopen se správně propojit s vaskulárním systémem v endometriu [53]. Podobně eliminace populace DC vedlo k inhibici tvorby nového cévního systému v deciduální tkáni [54]. Ukazuje se, že DC a uNK vzájemně komunikují a ovlivňují se produkovanými cytokiny, například DC uvolňují IL-12 a IL-15 a přispívají k maturaci uNK. Obě populace působí synergisticky na děložní tkáň, zejména pro-angiogenicky [55].

Aby zanořující se blastocysta nebyla napadána komplementovým systémem, mají na svém povrchu trofoblastové buňky vyjádřeny protektivní molekuly,

komplementovou regulační molekulu DAF (Decay-Accelerating Factor), membránový kofaktorový protein MCP (Membrane Cofactor Protein) a molekulu CD59, díky kterým komplementová kaskáda nemůže být dokončena [56]. Přítomnost ochranných proteinů je velice důležitá, jelikož za fyziologického těhotenství dochází ke zvýšené aktivitě komplementového systému, jenž zřejmě kompenzuje mírně sníženou aktivitu adaptivního imunitního systému [11].

1.3.2. Děloha - imunologicky privilegované místo

V průběhu těhotenství se z dělohy stává do značné míry imunologicky privilegovaný orgán. Přestup lymfocytů z krve do takových míst je znemožněn, nebo téměř minimalizován mechanickou bariérou. Mezi imunologicky privilegované orgány v lidském těle patří rovněž mozek, přední komora oční nebo varlata. Přerod dělohy na imunologicky privilegované místo začíná po zanoření blastocysty do tkáně endometria a po zahájení deciduální reakce. Působením hormonů hCG a progesteronu dochází na povrchu buněk endometria k expresi Fas ligandu (FasL) [57]. Stejně tak ve svrchní vrstvě placenty, konkrétně na povrchu trofoblastových buněk, se objevuje FasL, čímž se placenta stává imunologickou bariérou [58]. FasL je součástí superrodiny proteinů tumor nekrotizujících faktorů, který po navázání na svůj povrchový buněčný receptor (Fas), indukuje v takové buňce programovanou smrt, apoptózu [59]. Fas receptor se vyskytuje na aktivovaných imunitních buňkách a slouží jako negativní regulátor imunitní odpovědi. FasL na trofoblastu má protektivní úlohu a podílí se na vývoji dělohy v imunologicky privilegovaný orgán.

Povrchové receptory MHC gp I a II předkládají proteinové fragmenty k identifikaci Tc a Th lymfocytům. Pokud by MHC gp expimoval na svém povrchu trofoblast, znamenalo by to přímé odhalení otcovských antigenů a okamžitý zásah imunitního systému. Z tohoto důvodu se MHC gp I a II na buňkách trofoblastu nevyskytují (kromě malého množství molekul HLA-C) a jsou tak nerozpoznatelné pro T lymfocyty [60]. NK buňkám by se však „holé“ trofoblastové buňky jevily jako infikované či abnormální a zahájily by cytolytickou reakci ADCC. Proto extravilózní trofoblast, jenž je v přímém kontaktu s mateřskou krví, exprimuje s vysokou hustotou na svém povrchu neklasické MHC gp HLA-G. Ty reagují s inhibičními receptory KIR (rozpoznávají i HLA-C) přítomných na NK buňkách a brání jejich aktivaci. Glykoprotein HLA-G se vyskytuje pouze na materno-fetálním rozhraní. Oproti

klasickým HLA molekulám I. třídy je jeho alelická variabilita nízká, ale jeho proteinová struktura rozmanitější [61]. Zajištění tolerance ze strany NK buněk se jeví být velmi důležité vzhledem k tomu, že NK buňky se stávají během těhotenství dominující buněčnou populací imunitního systému v děloze [51].

1.3.3. Th1/Th2 posun

Regulačním mechanismem útlumu specifické, buňkami zprostředkované imunitní odpovědi je fyziologický přesmyk od převažující aktivity subsetu Th1 k převaze funkcí subsetu Th2. Molekulu IL-4, která podněcuje vývoj naivních Th lymfocytů do Th2 linie, produkují samotné buňky trofoblastu, vrstvy amnia a chorionu a placenta [62]. Syncytiotrofoblast slouží jako velký imunomodulační orgán. V přítomnosti placentálního trofoblastu dochází u T-lymfocytů k signifikantnímu poklesu produkce prozáněťových cytokinů IL-2, IL-17 a TNF- α , zatímco produkce regulačních molekul IL-4 a IL-10 není změněna [63]. Dalším zdrojem IL-10 spolu s protizáněťovým transformujícím růstovým faktorem beta (TGF- β) jsou $\gamma\delta$ T-lymfocyty. Jedná se o CD4 a CD8 negativní T-lymfocyty, jejichž počty se v těhotenství významně navyšují jak v deciduální tkáni, tak v periferní krvi matky, a přispívají rovněž k vývoji Th2 větve T-lymfocytů a vývoji placenty [64]. Imunomodulační vliv na vývoj Th2 buněk mají zvýšené hodnoty hormonu progesteronu v těhotenství [65]. V takovém cytokinovém prostředí se zároveň inhibuje prozáněťová populace Th17 [63].

K ustanovení Th1/Th2 přesmyku a protizáněťového stavu dochází ve druhém trimestru. Je to optimální doba pro růst a vývoj plodu a pro matku nejkomfortnější období během těhotenství.

1.3.4. T regulační lymfocyty

Na spoluvytváření mateřské tolerance vůči plodu se také podílí přirozené T regulační buňky (Treg). Jedná se o specializovanou subpopulaci T-lymfocytů reprezentující tolerogenní imunitní odpověď. Jejich specifickým markerem se jeví být transkripční faktor z rodiny ‚fox-head box‘ proteinů FoxP3, který je vyžadován pro vývoj a správnou funkci Treg lymfocytů [66]. Aktivace, proliferace a udržení Treg buněk v děložní tkáni jsou zapříčiněny fetálními antigen-specifickými stimuly, hormonálními změnami (zvýšená hladina estradiolu, produkce hCG), cytokiny a chemokiny [67]. K výraznému vzestupu Treg lymfocytů dochází v prvním trimestru

těhotenství, kdy jsou zřejmě nepostradatelné v procesu implantace a invaze placentálních buněk do mateřské tkáně [68]. Nedostačující počet Treg lymfocytů nebo jejich snížená funkčnost je asociována s komplikacemi, například se samovolným potratem [69].

Modulace imunitního systému matky nesmí zapříčinit neodpovídavost na ostatní podněty a tím ji zbavit rezistence vůči infekcím a ohrožit ji na životě. Také je nutné zachovat rovnováhu mezi uhnízděním blastocysty, růstem placenty a agresivní migrací trofoblastových buněk.

1.4. Termínový porod a imunitní systém

Na ukončení těhotenství porodem se do značné míry podílí imunita. Dokonce se objevují názory, že porod je výsledkem zánětové odpovědi. Ke konci těhotenství dochází k masivní infiltraci myometria a děložního čípku makrofágy, neutrofilů a T lymfocytů. Příval leukocytů je souběžný s počátkem termínového porodu a koreluje se zvýšenými hladinami cytokinů [70]. Cytokiny jsou primárně produkovány infiltrovanými buňkami imunitního systému. Jedná se o prozánětové molekuly IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF α , jejichž koncentrace korelují s hustotou leukocytární populace. mRNA těchto cytokinů byla také objevena v myometriu, děložním krčku, amnionu a chorio-decidue. Cytokiny hrají důležitou roli v parakrinní a autokrinní regulační síti ovlivňující placentu. Ke konci těhotenství se zapojují do procesů růstu placenty, při porodu podporují děložní kontrakce, rupturu obalů a rozvolnění děložního čípku [71].

Porod je vyvolán signifikantním nárůstem prostaglandinu E2 (PGE2), jehož syntéza je katalyzována enzymem cyklooxygenázou typu 2 (COX-2), a poklesem vlivu progesteronu tlumícího myometriální aktivitu. Hlavním zdrojem lidského PRG je membrána amnia. Proteosyntéza COX-2 je pod kontrolou signální dráhy transkripčního faktoru NF- κ B. Experimentální studie na amniálních buňkách plodových obalů poukázala na vzájemné negativní působení transkripčního faktoru NF- κ B a progesteronového receptoru (PR). Buňky odebrané před nástupem porodu vykazovaly nízkou aktivitu NF- κ B a zvýšenou koncentraci PR, který potlačuje NF- κ B dependentní transkripci. Expozicí buněk IL-1 β došlo k zesílení aktivity NF- κ B a syntéze COX-2 a zároveň k represí PR exprese [72].

Spolupůsobením molekul imunitního systému a dalších faktorů, jakými jsou například infekce a zánět, může těhotenství skončit předčasně.

1.5. Předčasný porod a předčasný odtok plodové vody

Porod je proces, při kterém plod opouští dělohu matky a zároveň dochází k vypuzení placenty včetně plodových obalů.

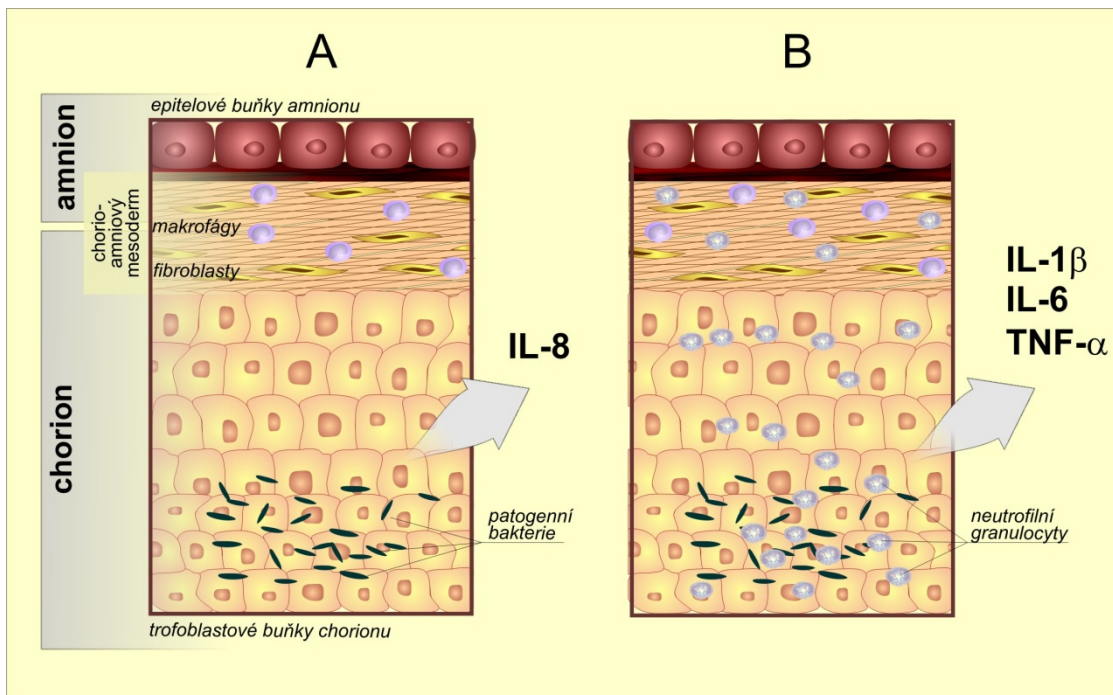
Porod je definován jako vypuzení či vynětí plodu z dělohy o porodní hmotnosti 500 gramů a více. Pokud má novorozenec hmotnost nižší než 500 gramů, pak přežije-li 24 hodin po porodu. O předčasném porodu hovoříme tehdy, je-li porod před dokončeným 37. týdnem. Jeho četnost má vzrůstající tendenci a stává se tak častou komplikací současného porodnictví. V Evropě postihuje zhruba 5 % všech těhotenství, ve Spojených státech amerických je jeho četnost více jak dvojnásobná a v některých afrických státech šplhá výskyt předčasných porodů k 20 % [73].

Zhruba za jednu třetinu předčasných porodů je zodpovědný předčasný odtok plodové vody (Preterm Premature Rupture Of Membranes, PPRM). Ten je definován jako porušení integrity plodových obalů s následným odtokem plodové vody, který předchází minimálně 2 hodiny před nástupem děložních kontrakcí. Důsledkem ztenčujících se plodových obalů a následného PPRM je usnadněn průnik bakterií do intrauterinního prostoru. Rozvoj infekce, resp. zánětlivé odpovědi na infekci, je asociován s více než 50% případů PPRM [74]. Vzniklý intraamniální zánět/infekce (Intra-Amniotic Infection/Inflammation, IAI) má velký dopad na následující průběh těhotenství. Je spojen se zánětem placenty a plodových obalů, tzv. chorioamnionitidou, či její nejtěžší formou zánětem pupečníku, funisitidou. Změny způsobené obrannou imunitní reakcí proti přítomným mikroorganismům mohou vyústit až v předčasný porod. PPRM nesou pro matku nejen vysoké riziko infekce, ale také možnost abrupce placenty a komprese pupečníku. Pravděpodobnost předčasného porodu dále zvyšují cervikální inkompetence, vícečetná těhotenství, předčasný porod v anamnéze, nízký socioekonomický status či nízký BMI. [75]

1.5.1. Intraamniální infekce - IAI

Zda je infekce příčina nebo důsledek předčasného porodu je stále diskutovaným tématem, které rozděluje porodníky na dvě skupiny. Bezesporu přijímanou tezí je IAI jako příčina předčasného porodu. Invaze bakterií probíhá ve většině případů ascendentní cestou z vagíny skrze cervikální kanál. Následným transplacentárním přenosem bakterie prostupují přes plodové obaly plodu do plodové vody a v nejzávažnějších případech až do fetální krve. Alternativní možností je invaze bakterií z matčiny krve přes placentu do plodových membrán [76]. Pomocí molekulární metody polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) byly odhaleny nejčastěji se vyskytující bakterie v plodové vodě u žen s předčasným porodem. Jednalo se především o *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus mitis* či *Fusobacterium nucleatum* [77]. Hovoříme o mikrobiální invazi amniální dutiny (Microbial Invasion of the Amniotic Cavity, MIAC), která doprovází IAI a bývá často asociována s PPRM. Je třeba si uvědomit, že samotná přítomnost bakterií či dokonce pouhý průkaz specifických genových sekvencí technikou PCR neznamena automaticky infekci obalů a plodu.

Nejen samotný výskyt a působení patogenů na okolní tkáň matky a plodu, ale i narušení imunologické homeostázy může zapříčinit mnoho obtíží v těhotenství [78]. IAI spouští kaskádu zánětlivého procesu infiltrací leukocytů z intravaskulárního prostoru do děložní dutiny. Vstup buněk je závislý na sekreci chemokinů, rodině cytokinů o nízké molekulární hmotnosti, které chemotakticky působí na imunitní buňky a podporují je v prozáněťové aktivaci. Uvolnění chemokinů představuje první biochemické propojení mezi infekcí a následnými strukturálními modifikacemi plodových obalů a děložního krčku, jenž může vyústit v předčasný porod. Chemokin zodpovědný za vstup neutrofilů do tkání chorionu, amnionu a placenty se nazývá IL-8. Asociace mezi infekcí a předčasným porodem je zjevná a většina studií se přiklání k hypotéze, že infekcí indukovaná lokální exprese prozáněťových cytokinů IL-1 β , IL-6, TNF- α a IL-8 v intraamniální dutině vede ke zvýšené produkci prostaglandinů plodovými obaly, jenž podněcují mateřské myometriální buňky ke kontraktilní aktivitě a indukují zralost děložního čípku (obr. 5) [79].



Obrázek 5

Schematické znázornění počátku zánětu v plodových obalech (chorioamnionitidy). **A.** Mikrobiální invaze indukuje v buňkách plodových obalů produkci interleukinu (IL)-8. **B.** Odpovědí na zvýšené hladiny IL-8 jsou infiltrující neutrofilní granulocyty do tkání plodových obalů. Spolu s placentálními makrofágy syntetizují prozáněťové cytokiny IL-1 β , IL-6 a tumor nekrotizující faktor (TNF) α .

1.5.1.1. HCA a funisitida

Zánětlivou odezvou na IAI je chorioamnionitida, zánět plodových obalů, placenty a pupečníku. Chorioamnionitida se při výskytu celkových známek infekce a zánětu (horečka, tachykardie matky a plodu, výtok) nazývá klinická a lze ji snadno rozpoznat. Na rozdíl od histologické chorioamnionitidy (Histological ChorioAmnionitis, HCA), definované histologickým průkazem zánětlivých změn v placentě, kterou lze odhalit až histopatologickým vyšetřením placenty po porodu. Pacientky s HCA jsou asymptomatické, bez horečky, bolestí v podbřišku, mateřské či fetální tachykardie. Jedná se o tzv. subklinickou HCA. Přitom HCA je asociována s neonatální sepsí a v nejtěžších případech i se smrtí novorozence [80].

Typickým znakem HCA jako projevu mateřské lokální zánětlivé odpovědi je difúzní infiltrát zánětlivých buněk, nekrotické buňky, edém tkáně či stopy po jejím zhojení. Diagnóza HCA se potvrzuje histopatologicky přítomností difúzní infiltrace

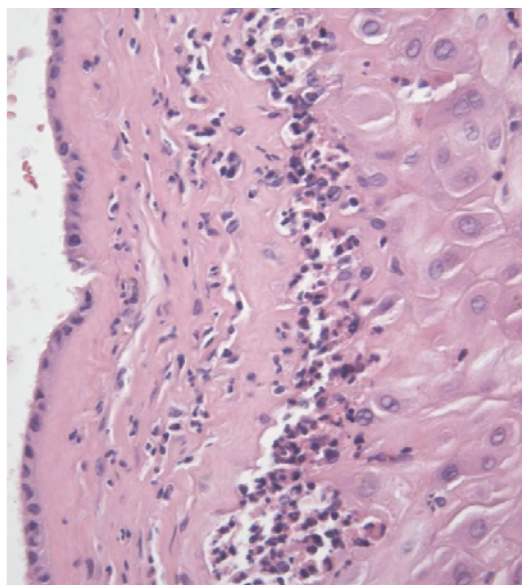
neutrofilů v konkrétních kompartmentech placenty, pupečníku a plodových obalů (obr. 6) a je nejčastěji hodnocena dle klasifikace Salafia a kol. Intenzita je hodnocena stupni – grady 1 až 4. Diagnóza je tedy možná až po porodu [81, 82]. Je nutné si uvědomit, že HCA nemusí být vyprovokována pouze přítomností IAI, ale i z jiných příčin, např. fetální hypoxií, změnou pH plodové vody, meconiem a jinými nespecifickými příčinami. Nicméně u více než 70 % případů HCA je přítomná zároveň IAI [80]. Pro diagnózu HCA je možné udělat další, doplňková vyšetření, jakým je mikrobiální kultivace nebo biochemické vyšetření plodové vody na přítomnost prozáněťových cytokinů [83]. Zejména IL-6 se považuje za vhodný prediktor záněťových pochodů v intraamniální dutině [84, 85].

U pacientek s HCA byly potvrzeny zvýšené hodnoty cytokinů IL-6 dále IL-1 β a TNF- α v plodové vodě, které indukují produkci chemoatraktantu IL-8 v deciduální tkáni a zároveň aktivují matrixové metaloproteázy (MMP) a apoptózu buněk plodových obalů. Extracelulární matrix plodových obalů je degradována, oslabována jejich elasticita a zvyšuje se tak pravděpodobnost PPRM a předčasného porodu [86-88].

Přestup infekce na plod může být aspirační nebo cévní cestou. Fetální zánětlivá odpověď se projevuje zánětem pupečníku, funisitidou, která je spojena se zvýšeným rizikem poškození plodu a novorozence. Histologický nález funisitidy lze stanovit *post partum* a je podobně jako HCA nejčastěji hodnocena dle stupnice Salafia a kol. [82]. Zvýšené hodnoty prozáněťových cytokinů a MMP, jenž se vyskytují v krvi plodu během zánětu, působí cytotoxicky a mohou rozvolňovat přirozené bariéry orgánů. Důsledkem může být poškození bílé hmoty mozku (mozková obrna) [89] nebo chronická plicní onemocnění [90], která mají dlouhodobý dopad na zdraví novorozence. V pupečnickové krvi jsou detekovatelné zvýšené hodnoty proinflamačních cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF- α [91, 92].

Po porodu mají novorozenci exponovaní infekci *in utero* horší skóre dle Apgarové. Klasifikace podle doktorky Virginie Apgarové zahrnuje ohodnocení pěti tělesných funkcí novorozence 5 minut a 10 minut po porodu (srdeční frekvence, dýchání, svalové napětí, odpověď na podněty a barva kůže). Každá funkce se hodnotí 0-2 body a výsledné skóre je součtem všech pěti položek, tedy 0-10 bodů [93].

Funisitida není záležitostí pouze předčasných porodů, ale nalezneme ji také u 4 % termínových porodů, kde je její výskyt asociován s MIAC a IAI. V tomto případě však nejsou následky pro plod fatální [94].

A**B****Obrázek 6**

Histologické preparáty plodových obalů. **A.** Zdravé plodové obaly. **B.** Plodové obaly postižené zánětem s typickým infiltrátem polymorfonukleárních buněk. Obarveno eosin-hematoxylinem.

Obrázky byly pořízeny ve spolupráci s mjr. MUDr. Jarolavem Pejchalem, Ph.D. a MUDr. Helenou Hornychovou, Ph.D.

1.5.1.2. Diagnostika PPRM

V současné době je nejvíce používaným testem k průkazu PPRM tzv. actim PROM test, kterým se identifikuje fosforylovaný IGFBP-1 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1) v cervikálním hlenu. Ten se fyziologicky vyskytuje v plodové vodě a jeho přítomnost v hlenu svědčí o odtoku plodové vody. Poslední studie dokazují, že senzitivitu a specificitu IGFBP-1 testu předčila identifikace placentálního α -mikroglobulinu-1, který se v České republice zatím rutinně netestuje [95]. Hojně je stále využíván Temešváryho test, jenž měří pH vaginálního hlenu. Plodová voda je alkalická a v takovém prostředí se indikátor 5% bromthymol zbarví modrozeleně. Temešváryho test je méně spolehlivý než actim PROM test a proto se od něho upouští. Nezastupitelnou roli hraje ultrazvukové vyšetření, kterým se hodnotí množství plodové vody, a vaginální ultrazvuk hodnotící změny na děložním krčku (cervikometrie).

Pro zjištění PPRM se někdy používá test přítomnosti fetálního fibronektinu v cervikovaginálním hlenu, který je uvolňován při poruše celistvosti plodových obalů.

Jedná se o komponentu extracelulárního matrix plodových obalů. Pozitivní výsledek upozorňuje na blížící se porod, bohužel jeho negativní výsledek nevylučuje počátek porodu [96].

Prozatím neexistuje objektivní ukazatel používaný v rutinní praxi, jehož změna by měla význačnou vypovídací hodnotu v prenatalní diagnostice HCA u pacientek s těhotenstvím komplikovaným PPRM. Informace o přítomnosti zánětu je přitom zcela zásadní v klinických intervencích u pacientek s PPRM. Pouze v případech s vyloučením přítomnosti HCA je možno zvolit konzervativní postup se snahou o prodloužení gravidity umožňující dokončení kompletní léčby kortikosteroidy, které jsou nezbytné k indukci maturace plicní tkáně plodu. V opačných případech je nutné těhotenství neodkladně ukončit.

1.5.1.3. Management PPRM

Při PPRM a podezření na HCA neexistuje jasné doporučení optimální doby k ukončení těhotenství. Je vždy třeba přistupovat individuálně a zhodnotit rizika pro matku a plod. Největším nebezpečím u žen s PPRM jsou IAI, abrupce placenty, komprese pupečníku, oligohydramnion a nezralost plodu.

Rutinně jsou pacientkám s PPRM podávány antibiotika, kortikosteroidy a tokolytika.

Léčba kortikosteroidy je doporučována ženám v rozmezí 24+0 až 34+6 gestačního týdne. Jeden cyklus dávky (bethametazon, dexamethazon) trvá 48 hodin. Kortikosteroidy urychlují tvorbu povrchového surfaktantu II nutného ke snížení povrchového napětí v alveolech a umožňující rozpětí plic po narození. Deficit surfaktantu je u těchto dětí příčinou vzniku syndromu dechové tísně a je nutná umělá plicní ventilace [97]. Podáváním kortikosteroidů se může výrazně snížit neonatální mortalita [98]. Při pozitivním nálezů zánětových markerů je třeba zvážit přínos léčby proti rizikům poškození plodu zánětem.

Období, kdy plod výrazně profituje z oddálení porodu, je považováno do 34. týdne těhotenství. K prodloužení gravidity až o 48 hodin jsou používány látky zvané tokolytika, která tlumí děložní kontraktilitu a relaxují děložní cévy. Nejčastěji podávanými léky s tokolytickým účinkem jsou β_2 -sympatomimetika, magnézium sulfát a antagonisté oxytocinu [99].

1.6. Stanovované markery

Biomarker, který je možné používat v klinické praxi, musí splňovat několik požadavků. Podle oficiální definice National Institutes of Health USA se jedná o veličinu, jež je objektivně měřitelná a uznávaná jako indikátor normálních či patologických pochodů nebo odpovědi na terapeutický zásah [100]. Na biomarker jsou kladeny požadavky vysoké senzitivity, která vyjadřuje úspěšnost zachycení sledovaného stavu (je určena počtem falešně negativních výsledků), a vysoké specificity, jenž vyjadřuje pravděpodobnost, jak velká část z těch, kteří danou diagnózu nemají, byla správně diagnosticky rozpoznána (počet falešně pozitivních výsledků).

Žádoucí je korelace biomarkeru s klinickým stavem pacienta. Zároveň je potřeba zohlednit možnost stanovení biomarkeru v klinické rutinní praxi, jeho standardizaci a časovou nenáročnost, snadné vyhodnocení výsledků a ekonomické hledisko.

1.6.1. Receptory pro nebezpečné vzory

Klíčovou úlohu při průniku mikrobiální infekce má vrozená imunita, která u člověka zaujímá první obrannou linii. Jedná se o archaický způsob obrany, který je fylogeneticky konzervovaný na molekulární úrovni [101].

K identifikaci patogenních agens a počátku imunitní odpovědi dochází pomocí buněk vrozené imunity nesoucích receptory pro nebezpečné vzory PRRs. Na základě buněčné lokalizace jsou PRRs děleny na dvě základní skupiny. První zahrnuje membránově vázané PRRs, jakými jsou TLR, vychytávací (scavengerové) receptory nebo nitrobuněčné receptory zvané NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) [102, 103]. Druhou skupinou jsou humorální a opsonizační molekuly, které se dají připodobnit k protilátkám adaptivní imunity, např. CRP, pentraxin 3 (PTX3) [104]. Do této kategorie spadají také odštěpené solubilní molekuly z buněčného povrchu jako solubilní TLR (sTLR) nebo solubilní vychytávací receptor CD163 (sCD163).

Receptory PRR jsou v urogenitálním traktu ženy vyjádřeny v různé denzitě na buňkách imunitní i „neimunitní“ povahy. Na výsledné protiinfekční odpovědi se tak podílí imunitní systém a molekuly produkované tkáněmi reprodukčního systému.

1.6.1.1. Solubilní Toll-like receptor 2

TLRs jsou esenciální receptory indukující vrozenou imunitní odpověď, které rozeznávají různorodé ligandy mikroorganismů jako lipopolysacharidy (LPS), peptidoglykan, flagellin, jedno- a dvojitě vláknovou RNA a také „signály poškození“ buněk, např. HSP70 [105].

První Toll receptor byl objeven v devadesátých letech 20. století jako základní receptor v boji proti plísňovým infekcím u mušek *Drosophila*, které disponují pouze přirozenou imunitou [106]. O rok později byl nalezen lidský homolog Toll receptoru (pojmenován TLR4), jenž indukoval v buňkách prozánětovou dráhu NF- κ B stejně jako u *Drosophily* [107]. Nyní již známe deset lidských TLRs [108].

Aby nedocházelo k hyperaktivaci imunitního systému při infekci, a tím možnému poškození orgánů a chronickým zánětům, musí být odpověď přísně regulována [109]. Jedním z mechanismů kontroly TLR aktivace je tvorba solubilní formy TLR (sTLR). Producenty sTLR jsou buňky, které exprimují TLR (makrofágy, monocyty).

TLR2 zaujímá speciální místo mezi TLRs. Jeho schopnost rozeznávat patogeny je dobře probádaná a zahrnuje širokou škálu bakterií, virů, plísní, mykobakterií a parazitů [110]. Mnohostrannost v rozpoznávání ligandů je umožněna schopností TLR2 vytvářet heterodimery s TLR1 nebo TLR6 [111, 112]. TLR2 má svoji solubilní formu (sTLR2), která byla nalezena v plasmě, v mateřském mléku, ve slinách a v plodové vodě [113-115].

Polypeptidový řetězec sTLR2 se vyskytuje v lidské plasmě v několika velikostech (většina 66 kDa, minoritně 83, 40, 38, 25 kDa). Uvažuje se, že různé velikosti sTLR2 souvisí s rozdílným způsobem jeho vzniku. Zatím jsou popsány dva způsoby vzniku solubilní formy. První možností je pohlcení povrchových TLRs zpět do buňky, kde jsou TLRs post-translačně modifikovány na solubilní formu a poté uskladněny v intracelulárním váčku. V případě potřeby je buňka uvolní do prostoru exocytózou. Uvolnění sTLR2 může být první velmi rychlá regulace TLR2-zprostředkované odpovědi [114]. Druhým způsobem vzniká sTLR odštěpením TLR z povrchu buňky proteázami (tzv. shedding) [116].

Existuje několik způsobů, kterými sTLR2 dokáže tlumit aktivaci imunitního systému. sTLR2 interferuje s membránově vázaným TLR2 a brání jeho přesunu do specializovaných signalizačních míst na membráně, tzv. lipidových raftů. Dále je schopen se vázat na koreceptor CD14, čímž omezuje interakci TLR2-CD14 nutnou

k přenosu signálu. V neposlední řadě sTLR2 funguje jako decoy receptor, jenž se poutá k mikrobiálním komponentám. Vzniká tak kompetice o mikrobiální ligandy mezi TLR2 vázanými na povrchu buněk a sTLR2. Účinnost TLR2 signalizace je ve výsledku redukována. Zároveň sTLR2 ovlivňuje efektorové funkce imunitních buněk při mikrobiální infekci. Potlačuje fagocytózu, produkci superoxidů a chemoatraktantů. Buňky, které uvolňují velké množství sTLR2 do svého okolí, se ukázaly být hyposenzitivní k TLR2-stimulantům [117].

Zvýšené hladiny sTLR2 byly nalezeny v plodové vodě u pacientek s PPRM s MIAC a/nebo s HCA [118].

1.6.1.2. Solubilní vychytávací receptor CD163

Transmembránový protein CD163 slouží jako receptor pro vychytávání haptoglobin-hemoglobinových (Hp-Hb) komplexů, který je exprimován výhradně na makrofázích a monocytech. Byl identifikován na konci 80. let 20. století jako člen superrodiny vychytávacích receptorů s doménou bohatou na aminokyselinu cystein (Scavenger Receptor Cysteine-Rich, SRCR). Tuto superrodinu dělíme podle struktury a funkce na skupiny A a B. CD163 patří do skupiny B, kterou definují tandemově řazené domény SRCR vždy s osmi cysteiny a která je kódována pouze jedním exonem. Jeho molekulární hmotnost je 130 kDa [119].

Expres molekuly CD163 je regulována pro- a protizáněťovými mediátory. Při působení $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-4 nebo LPS je exprese CD163 na makrofázích/monocytech snížena, zatímco IL-6, IL-10 a glukokortikoidy expresi navyšují [120]. Vysokou denzitu glykoproteinu CD163 vykazují makrofágy subtypu M2, které představují protizáněťový typ makrofágů. Produkují cytokin IL-10 tlumící aktivaci imunitního systému nebo arginázu inhibující NO syntézu. M2 makrofágy fagocytují apoptotické buňky a buněčnou debris [121].

Hlavní funkcí CD163 je endocytovat navázaný komplex Hp-Hb, který se v krevním řečišti rychle hromadí při zvýšené hemolýze erytrocytů, jenž může být způsobena přítomností mnoha infekčních agens a zánětu. Makrofágy/monocyty exprimující CD163 jsou hlavní regulační složkou hladin volného hemoglobinu a jsou zásadní v jeho odklizení. Internalizace hemoglobinu předchází toxickému působení

železa v krevní cirkulaci, podílí se na recyklaci hemové molekuly a brání pomnožení patogenů, pro které je železo limitujícím růstovým faktorem [122].

Solubilní forma CD163 (sCD163) vzniká odštěpením extracelulární části receptoru za pomoci metaloproteázy z povrchu makrofágů/monocytů. Odštěpení je indukováno antigeny patogenů např. LPS, které stimulují TLR makrofágů/monocytů, ale i dalšími prozáněťovými faktory (TNF α). Konkrétně TLR2, TLR4 a TLR5 vyvolávají „shedding“ proteinu CD163 [123]. Přesná funkce sCD163 není ještě zcela probádána. Z dosavadních studií vyplývá, že při zánětu a aktivaci makrofágů koncentrace sCD163 intenzivně stoupá a tím tlumí stimulaci makrofágů/monocytů k nadbytečné imunitní odpovědi. U experimentálně navozené sepse došlo k rychlému navýšení sCD163, zatímco povrchový CD163 makrofágů/monocytů byl silně redukován [124]. sCD163 by mohl být využit jako marker syndromu aktivovaných makrofágů, onemocnění jater nebo systémové záněťové odpovědi organismu a sepse [125, 126]. sCD163 je rizikovým ukazatelem u řady chronických zánětlivých onemocnění a silně asociován s rozvojem diabetu 2. typu [125].

sCD163 se vyskytuje v lidské plasmě a v různých tělních tekutinách. Byl zaznamenán v synoviální tekutině, cerebrospinálním moku nebo moči [127-130].

U pacientek s PPRM a přítomným zánětem HCA byly pozorovány signifikantně zvýšené hladiny sCD163 v plodové vodě [131].

1.6.1.3. Pentraxin 3 – protein akutní fáze

Mezi proteiny akutní fáze se automaticky řadí CRP a sérový amyloid P (SAP), které spadají mezi tzv. krátké pentraxiny. Zároveň do této skupiny patří dlouhé pentraxiny s nejvýznamějším zástupcem pentraxinem 3 (PTX3), jehož koncentrace rychle stoupají po zahájení imunitní odpovědi. Charakteristickým rysem primární sekvence superrodiny pentraxinů je přítomnost vysoce konzervovaného motivu na C-konci, jenž je složen asi z 200 aminokyselin (pentraxin-like domain) [132].

Glykoprotein PTX3 byl objeven v 90. letech 20. století jako cytokiny indukovaný protein uvolňovaný endotelovými buňkami a fibroblasty. Na konci pentraxinové domény jsou připojeny další aminokyseliny, proto hovoříme o dlouhém pentraxinu. Na rozdíl od krátkých pentraxinů je gen PTX3 lokalizovaný na jiném chromosomu, s odlišnou genovou organizací [133]. PTX3 má multimerickou strukturu

složenou z osmi identických protomerů, jež jsou vzájemně drženy nekovalentními vazbami a disulfidickými můstky. Jeho hlavním zdrojem jsou myeloidní dendritické buňky (mDC), dále je produkován monocyty, makrofágy, endotelovými buňkami, fibroblasty a mnoha různými tkáňovými typy buněk [134, 135]. PTX3 je dokonce konstitutivně skladován ve speciálních granulích neutrofilních buněk a následně velmi rychle uvolňován po stimulaci membránových TLR antigeny mikroorganismů [136].

Nejúčinnějším cytokinem indukujícím produkci PTX3 je IL-1 β , zatímco spouštěče syntézy CRP a SAP, ke kterým patří IL-6, aktivátory monocytů jako chemotaktický protein monocytů (Monocyte Chemotactic Protein 1, MCP-1), stimulační růstový faktor makrofágů (Macrophage-Colony Stimulating Factor, M-CSF) nebo IFN γ nemají významný vliv na produkci PTX3 [137]. K syntéze PTX3 mohou vést v různých typech buněk odlišné signální dráhy. Za standardní cestu indukovanou IL-1 β a TNF α je považována NF- κ B dráha [138].

Struktura PTX3 dovoluje interagovat se širokou škálou molekul a patogenních agens. Jeho vlastnosti jsou pro- i protizáněťové. Vyvazuje složku komplementové kaskády protein C1q a brání jeho navázání na apoptotické buňky, čímž snižuje fagocytózu apoptotických částí dendritickými buňkami a nepřímo tak snižuje aktivaci imunitního systému [139]. Na druhou stranu PTX3 rozeznává gram-positivní a gram-negativní bakterie, viry a plísňe, na jejichž povrchy se váže a slouží jako opsonin aktivující komplement. Při invazi patogenů amplifikuje imunitní odpověď [140].

Vliv PTX3 však přesahuje imunitní pochody. Díky své oligomerické struktuře interaguje se součástí extracelulárního matrix (ECM), molekulou označovanou TSG-6 (Tumor necrosis factor-Stimulated Gene sequences), a společně propojují a stabilizují polymerní kyselinu hyaluronovou v ECM. Formování ECM je klíčové při vzniku Graafova folikulu a uvolnění zralého vajíčka. Samotná část folikulu cumulus oophorus (hrbolek čnící do dutiny Graafova folikulu) produkuje PTX3. Na pokusech s PTX3 deficientními myši se ukázalo, že folikul nebyl schopen stabilně zformovat ECM a takové myši byly neplodné [141].

Během těhotenství se hladiny PTX3 v krvi matky zvyšují, což může souviset s počáteční záněťovou odpovědí na invadující trofoblast. Výrazné navýšení PTX3 bylo zaznamenáno u žen s preeklampsii [142, 143]. Jeho signifikantně zvýšené koncentrace v plodové vodě jsou asociovány s IAI a HCA a proto se PTX3 jeví jako vhodný ukazatel těchto zánětlivých změn u žen s PPRM [144].

1.6.2. Prozáněťové molekuly

Aby byla imunitní odpověď co nejefektivnější, je potřeba vzájemné komunikace mezi jednotlivými složkami imunitního systému. Tuto regulaci zastávají cytokiny, které ovlivňují všechny buňky s příslušným receptorem. Cytokiny, jež uvolňují do svého okolí buňky jako reakci na přítomnou infekci, se označují prozáněťové. Mají aktivační vliv na imunitní systém a podporují jej v boji proti infekci. Takových cytokinů je celá škála, mezi nejvýznamnější patří TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-22 a další.

1.6.2.1. Interleukin 6

Molekula IL-6 byla objevena hned několikrát. Jednou jako faktor indukující tvorbu protilátek B buňkami, podruhé jako produkt fibroblastů a potřetí jako hepatocyty stimulační látka a růstový faktor plazmocytomu. Posléze vyšlo najevo, že se jedná o tutéž molekulu. To naznačuje, jaké široce pleiotropní účinky má IL-6 v regulaci imunitního systému, zánětu a hematopoéze.

IL-6 je tvořen 184 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 22-27 kDa . Spadá do rodiny cytokinů IL-6, kam patří několik dalších molekul, např. leukemický inhibiční faktor (LIF), onkostatin M, IL-11 aj. Společné mají nejen aminokyselinové sekvence ve své struktuře, ale také signální dráhy, skrze které působí na cílové buňky [145]. Klíčovou molekulou je signální glykoprotein (gp) 130. Tato převodní molekula aktivuje dvě signální dráhy: JAK-STAT (JAnus family tyrosine Kinase–Signal Transducer and Activator of Transcription) a Ras-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), které mají silný prozáněťový dopad [146].

Produkce IL-6 je vyvolána infekcí, stresem, úrazem nebo při neoplazii. Mezi hlavní producenty patří Th2 lymfocyty, makrofágy, fibroblasty, endotelové buňky, adipocyty.

Funkce IL-6 jsou velice rozmanité. V první řadě IL-6 podněcuje hepatocyty k syntéze proteinů akutní fáze (CRP, SAP) a funguje jako endogenní pyrogen. Je způsobilý k přestupu hematoencefalické bariéry do centrálního nervového systému, kde následně stimuluje hypotalamus k produkci prostaglandinu E2 (PGE2), který zvyšuje tělesnou teplotu skrze termosenzitivní neurony [147]. IL-6 podporuje katabolický metabolismus, např. aktivuje osteoklasty, které zvyšují apoptózu osteocytů a přestavují kostní tkáň [148]. Dále IL-6 ovlivňuje produkci protilátek B lymfocyty, napomáhá

jejich přeměně na plasmocyty a indukuje v nich syntézu protilátek [145]. IL-6 je růstovým faktorem myelomů [149]. Ukázalo se, že přítomný IL-6 spolu s TGF- β je determinantem vývoje lymfocytů typu Th17, zatímco samotná přítomnost faktoru TGF- β stimuluje lymfocyty k přeměně na Treg subpopulaci [150]. IL-6 tím působí jako antagonist a vývoje Treg buněk. Díky široké škále působení IL-6 jej najdeme v patogenezi mnoha autoimunitních či maligních onemocnění (revmatoidní artritida, Castlemanova choroba) [151, 152].

Vliv IL-6 na makrofágy je tlumen inhibiční signální dráhou SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signalling), která se aktivuje při současném výskytu např. LPS a TNF α . Jedná se zřejmě o regulační systém, jenž zajišťuje přiměřenou imunitní odpověď [153]. Inhibičně na produkci IL-6 působí také estrogény a androgeny.

Během těhotenství jsou IL-6 schopny produkovat epiteliální buňky endometria, které zároveň exprimují IL-6R. Tento receptor byl také objeven na buňkách embrya od stadia blastocysty [154]. U žen s HCA produkují IL-6 také deciduální buňky a buňky fetálních plodových obalů amnion a chorion. V buňkách amnionu například indukuje IL-6 uvolňování MMP-2 a MMP-9 [155-157].

1.6.2.2. Interleukin 8

IL-8 je prozáněťový cytokin patřící do podskupiny chemokinů. Jedná se o molekulu s chemotaktickým účinkem, která cestou přes svůj receptor řídí pohyb cílové buňky do místa s nejvyšší koncentrací chemoatraktantu. Chemokiny jsou rozděleny podle chemické struktury na N-konci do čtyř skupin, přičemž IL-8 spadá mezi chemokiny CXC (dva cysteiny odděleny jednou aminokyselinou) spolu s destičkovým faktorem 4, chemotaktickým faktorem pro makrofágy 2 (Macrophage Inflammatory Protein, MIP) aj. IL-8 je kódován na chromosomu 4 a jeho molekulární hmotnost činí zhruba 10 kDa. [158, 159].

Producentem IL-8 je mnoho buněčných typů, které exprimují TLRs (zejména monocyty a makrofágy) a některé nádorové buňky (gliom). Produkce IL-8 začíná po rozpoznání nebezpečných signálů, jakými jsou bakteriální a virové produkty, stresové buněčné proteiny nebo cytokiny IL-1 a TNF. Následně se aktivují transkripční faktory NF- κ B a AP-1, které aktivují proteosyntézu IL-8. Inhibičně na produkci IL-8 působí IL-4 nebo IL-10 [160].

Hlavní funkcí IL-8 je atrahovat neutrofilů do místa zánětu tím, že buňky polarizuje, aktivuje a mobilizuje cytoskeletální proteiny k tvorbě pseudopodií a podporuje je v expresi adhezivních povrchových molekul. Neutrofilů poté mohou lépe adherovat na endoteliální buňky a migrovat z krevního řečiště do napadených tkání [161]. Primárním cílem IL-8 jsou neutrofilů, ale ovlivňuje i T lymfocyty, makrofágy, endotelové buňky, keratinocyty a proangiogenní pochody (i u tumorů) [162].

Aby byla buňka senzitivní k IL-8, musí na svém povrchu exprimovat příslušný receptor. Receptory CXCR1 a CXCR2 váží IL-8 s největší afinitou. Všechny chemokinové receptory jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem, který prochází sedmkrát membránou, a náleží do rodiny receptorů asociovaných s G proteiny. Trimerní G protein se skládá z podjednotky α , která váže GDP/GTP a signál přenáší do nitra buňky, a z podjednotek β a γ , jež aktivují enzymy vyskytující se pod membránou buňky. Jeden chemokinový receptor může vázat různé chemokiny v rámci stejné chemické skupiny. Je identifikováno přes 50 chemokinů a pouze 18 chemokinových receptorů [163].

Během těhotenství při HCA jsou hlavním zdrojem IL-8 tkáně chorionu a deciduy, které jsou jako první kolonizovány patogeny při ascendentní intrauterinní infekci [164]. Bylo zjištěno, že pacientky s PPRM a potvrzenou HCA mají výrazně vyšší koncentrace IL-8 v plodové vodě v porovnání se skupinou bez histologických známek zánětu [165]. Proto se uvažuje o IL-8 jako o možném časném prognostickém markeru předčasného porodu a PPRM. Hladinu IL-8 je možné také stanovit v cervikálním hlenu, kde jeho koncentrace pozitivně koreluje s rozvojem IAI a/nebo HCA [166].

1.6.2.3. Matrixová metaloproteáza 8

Matrixové metaloproteázy (MMP) je skupina zinek dependentních endopeptidáz, které primárně degradují hmotu ECM a tím remodelují pojivové tkáně a usnadňují migraci imunokompetentních buněk do místa zánětu. Ve své struktuře obsahují zinek, jenž je vyžadován pro jejich správnou funkci.

MMP se syntetizují ve formě inaktivního zymogenu, aby nedocházelo k naštěpení vlastních struktur buňky. Až po stimulaci je odštěpen fragment na konci molekuly a MMP se stává plně aktivní. Pokud je třeba aktivitu MMP inhibovat, slouží

k tomuto účelu endogenní tkáňové proteiny TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), které se váží na MMP. K dnešnímu dni známe 23 lidských MMP. [167, 168]

Kromě rozkladu ECM mohou MMP modifikovat molekuly charakteru růstových faktorů a růstových receptorů, cytokiny, chemokiny, povrchové adhezivní molekuly a řadu enzymů. MMP se tak podílí na biologických procesech jako je ontogeneze, angiogeneze, akutní a chronický zánět nebo buněčné interakce s okolím [169].

MMP-8 neboli neutrofilní kolagenáza-2 proteolyticky rozkládá kolagen typu I, II, III a V. Dlouho se předpokládalo, že jediným zdrojem MMP-8 jsou neutrofilní granulocyty, nyní je již známo, že zdrojem enzymu jsou také makrofágy, fibroblasty, epitelové buňky aj. Chemokiny podněcují degranulaci MMP-8 neutrofilů, která je následně proteolyticky aktivovaná. MMP-8 společně s MMP-9 zvyšují chemoatraktivní vlastnosti IL-8 odštěpením N-koncové domény, čímž dochází k dalšímu uvolnění MMP-8 z neutrofilů (pozitivní zpětná vazba) [170].

Navýšené hodnoty MMP-8 byly zaznamenány v plodové vodě ve skupině pacientek s PPRM a MIAC na rozdíl od pacientek s PPRM bez infekce [171].

2. Cíle disertační práce

Mezi hlavní cíle disertační práce patří:

- stanovení koncentrace receptorů pro nebezpečné vzory v pupečnickové krvi u žen s PPRM
 - změřit hladiny solubilní formy Toll like receptoru 2
 - změřit hladiny solubilního vychytávacího receptoru pro haptoglobin-hemoglobinový komplex (sCD163)
 - změřit hladiny pentraxinu 3

- stanovení koncentrace prozáněťových molekul v pupečnickové krvi u žen s PPRM
 - změřit hladiny interleukinu 6
 - změřit hladiny interleukinu 8
 - změřit hladiny matrixové metaloproteázy 8

- zjištění vztahu stanovovaných markerů v pupečnickové krvi u žen s PPRM
 - k histologické chorioamnionitidě a
 - k funisitidě

- určení prediktivní hodnoty stanovovaných molekul v pupečnickové krvi u žen s PPRM
 - k diagnostice histologické chorioamnionitidy a
 - k diagnostice funisitidy.

3. Soubor pacientek a metodika

3.1. Soubor pacientek

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

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

3.2. Sběr vzorků

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

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

3.3. Diagnostika

3.3.1. Stanovení předčasného odtoku plodové vody

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

3.3.2. Stanovení HCA a funisitidy

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

3.3.3. Stanovení MIAC

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

3.4. Stanovení koncentrace markerů v pupečnickové krvi

Koncentrace sTLR2 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl prováděn podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský sTLR2 (Uscn Life Science & Technology Company, Čína). Detekční limit pro sTLR2 byl 0.098 ng/mL. Absorbance měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

Koncentrace sCD163 byla určena metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu sCD163 (Macro163™, Trillium Diagnostics, LLC, Brewer, USA). Detekční limit pro sCD163 byl 0.23 ng/mL. Všechny vzorky pupečnickové krve byly naředěny 1:250. Absorbance měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

Koncentrace PTX3 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl prováděn podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský PTX3 (Quantikine Human Pentraxin 3/TSG-14, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro PTX3 byl 0.025 ng/mL. Absorbance měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

Koncentrace IL-6 byla měřena metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu pro IL-6 (Human IL-6 Quantikine, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro IL-6 byl 0.7 pg/mL. Absorbance měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

Koncentrace IL-8 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský IL-8 (Human CXCL8/IL-8 Quantikine, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro IL-8 byl 3.5 pg/mL. Absorbance měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

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

měřena na Multiskan RC ELISA reader (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

3.4.1. ELISA metoda

Princip ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) metody je založen na bázi imunoenzymatické reakce a vysoké specifické vazby mezi antigenem a protilátkou, díky kterým lze kvantitativně stanovit antigen ve vzorku. ELISA metoda existuje v několika variantách a probíhá v několika krocích. V případě použití komerčních kitů ELISA je v každé z 96 jamek polystyrenové mikrotitrační destičky kovalentně navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Do jamky je přidán vzorek s hledaným antigenem a po jeho inkubaci a odmytí nezreagovaných složek vzorku je přidán konjugát, což je protilátka s navázaným enzymem. Tento konjugát se váže na odlišný epitop antigenu než protilátka absorbovaná na destičce a po opětovné inkubaci a promytí nenavázaného konjugátu se výsledná reakce vizualizuje přidáním substrátu. Enzym navázaný na konjugátu štěpí substrát na barevný produkt, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci antigenu. Jde o tzv. sandwich ELISA. Přesné určení koncentrace antigenu se provádí po změření absorbancí na spektrofotometru (ELISA readeru) pomocí kalibrační křivky.

3.5. Statistika

Normalita dat byla testována Kolmogorov-Smirnov testem. Demografické a klinické charakteristiky znaků s kontinuální variabilitou byly hodnoceny parametrickým t-testem (uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka) nebo neparametrickým Wilcoxonovým testem (uvedeny jako medián [interkvartilový rozsah]). Znaky s kategoričnou binární variabilitou byly hodnoceny Fisherovým exaktním testem a byly uvedeny jako počet (%). Jelikož koncentrace sTLR2, sCD163, PTX3, IL-6, IL-8 a MMP-8 v pupečnickové krvi nespĺňovaly normální distribuci dat, byl pro jejich vyhodnocení použit neparametrický Wilcoxon test a výsledky presentovány jako medián (interkvartilový rozsah). Za statisticky významné byly považovány rozdíly s $p < 0.05$. Všechny p -hodnoty byly zpracovány v softwarovém programu MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgie).

4. Výsledky

4.1. Demografické a klinické výsledky

Náběr vzorků probíhal ve dvou etapách, proto je kohorta pacientek rozdělena na dvě skupiny. Pacientky s PPRM byly rozčleněny na základě přítomnosti nebo absence HCA a přítomnost funisitidy. Demografické a klinické charakteristiky žen a novorozenců jsou uvedeny v Tabulce 1A, 1B a v Tabulce 2A 2B v Příloze.

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

V první skupině pacientek byla z celkových 84 pacientek HCA diagnostikována u 41 (49 %) žen a funisitida u 13 (15 %) žen. Pouze HCA bez funisitidy byla stanovena u 28 pacientek (33 %). Bez známek zánětu bylo 43 žen (51 %). Medián gestačního stáří pacientek s HCA při přijetí na kliniku a při porodu byl nižší než u pacientek bez HCA. Také medián gestačního stáří pacientek s funisitidou při přijetí a při porodu byl signifikantně nižší než u žen bez známek HCA. Hmotnost novorozenců pacientek s funisitidou byla nižší ve srovnání s hmotností novorozenců žen bez HCA. MIAC byl diagnostikován téměř u 70 % pacientek s funisitidou, což bylo podstatně více v porovnání s pacientkami bez HCA (Tab. 1A, Tab. 2A v Příloze).

4.1.2. Soubor pacientek pro analýzu solubilní formy Toll like receptoru 2

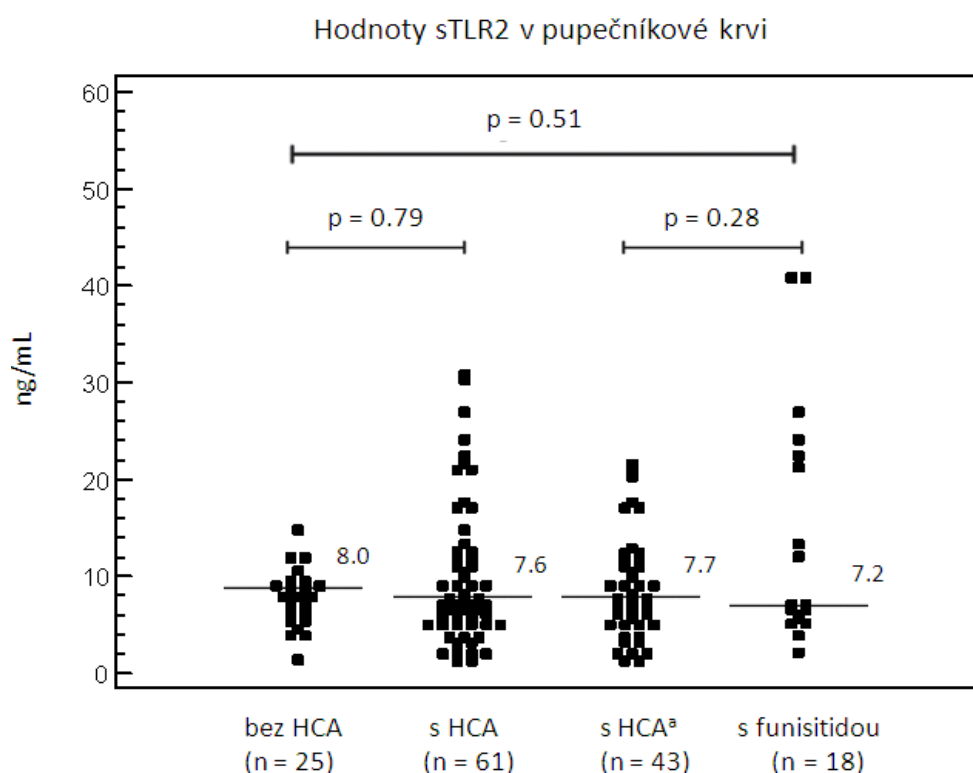
V druhé skupině pacientek byla z celkových 86 pacientek HCA diagnostikována u 61 (71 %) žen a funisitida u 18 (21 %) žen. Pouze HCA bez funisitidy byla stanovena u 43 pacientek (50 %). Bez známek zánětu bylo 25 žen (29 %). Věkový průměr žen postižených HCA byl zřetelně vyšší v porovnání s ženami bez HCA. Medián gestačního stáří pacientek s HCA při přijetí na kliniku a při porodu byl nižší než u pacientek bez HCA. Rovněž medián gestačního stáří pacientek s funisitidou při přijetí a při porodu byl nižší než u žen bez známek HCA. Vzhledem k nízkému gestačnímu věku pacientek s funisitidou byly většině podány kortikosteroidy (89 %). Hmotnost novorozenců pacientek s funisitidou byla nižší ve srovnání s hmotností novorozenců žen bez HCA (Tab. 1B, Tab. 2B v Příloze).

4.2. Koncentrace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi

4.2.1. Koncentrace solubilního Toll like receptoru 2 v pupečnickové krvi

Hladiny sTLR2 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečnickové krve. Mediány koncentrace sTLR2 byly u pacientek s HCA a u pacientek bez HCA naměřeny na podobných hodnotách (s HCA: medián 7.6 ng/mL, IQR 5.1 – 12.3 vs. bez HCA: medián 8.0 ng/mL, IQR 6.0 – 9.4; $p = 0.79$). Statistická významnost nebyla zjištěna.

Při porovnávání výsledků ve skupině pacientek s funisitidou se skupinou pacientek bez HCA taktéž nebyla nalezena statistická významnost (s funisitidou: medián 7.2 ng/mL, IQR 5.5 – 22.3 vs. bez HCA: medián 8.0 ng/mL, IQR 6.0 – 9.4; $p = 0.51$) (Graf 1, Tab. 3A, 3B).



Graf 1.

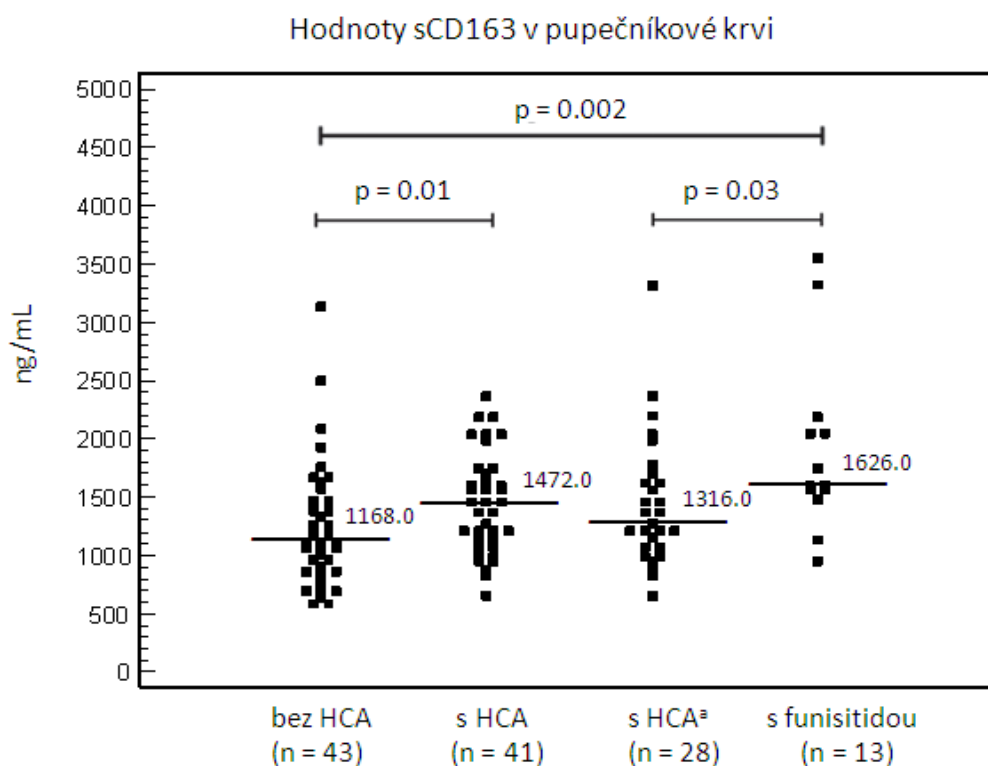
Koncentrace sTLR2 v pupečnickové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody rozdělených podle přítomnosti a absence histologické chorioamnionitidy (HCA) a přítomnosti funisitidy. Nenalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinami pacientek. Vodorovnou značkou označeny mediány. HCA^a – skupina pacientek s potvrzenou HCA bez funisitidy.

4.2.2. Koncentrace solubilního vycytávacího receptoru CD163 v pupečnickové krvi

Koncentrace sCD163 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečnickové krve. Hladiny sCD163 u pacientek s HCA byly vyšší oproti pacientkám bez HCA (s HCA: medián 1472.0 ng/mL, IQR 1139.8 – 1828.0 vs. bez HCA: medián 1168.0 ng/mL, IQR 891.8 – 1487.5; $p = 0.01$).

Ještě signifikantnější rozdíl byl nalezen v hodnotách sCD163 v pupečnickové krvi mezi skupinami pacientek s funisitidou a bez HCA (s funisitidou: medián 1626.0 ng/mL, IQR 1530.5 – 2090.3 vs. bez HCA: medián 1168.0 ng/mL, IQR 891.8 – 1487.5; $p = 0.002$).

Hladiny sCD163 v pupečnickové krvi se odlišovaly u žen s HCA^a oproti ženám s funisitidou (s HCA^a: medián 1316.0 ng/mL, IQR 1077.5 – 1672.0 vs. s funisitidou: medián 1626.0 ng/mL, IQR 1530.5 – 2090.3; $p = 0.03$) (Graf 2, Tab. 3A, 3B).



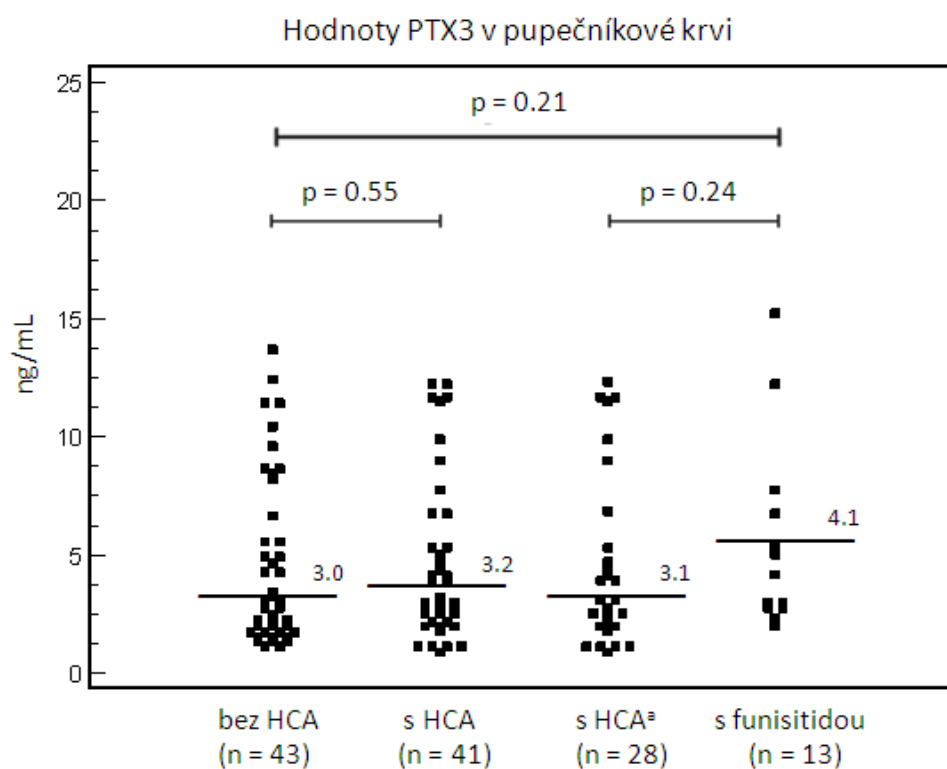
Graf 2.

Koncentrace sCD163 v pupečnickové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody. U pacientek s PPRM a HCA byly naměřeny výrazně vyšší koncentrace sCD163 v porovnání s pacientkami bez HCA. Skupina žen s PPRM a funisitidou měla signifikantně vyšší medián sCD163 než skupina žen s HCA bez funisidity^a a bez HCA. Vodorovnou značkou označeny mediány.

4.2.3. Koncentrace pentraxinu 3 v pupečnickové krvi

Hladiny PTX3 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečnickové krve. Mediány koncentrace PTX3 byly u pacientek s PPRM a HCA a u pacientek bez HCA naměřeny na podobných hodnotách (s HCA: medián 3.2 ng/mL, IQR 2.2 – 6.8 vs. bez HCA: medián 3.0 ng/mL, IQR 1.7 – 6.4; $p = 0.55$). Statistická významnost nebyla zjištěna.

Při porovnávání výsledků ve skupině pacientek s funisitidou se skupinou pacientek bez HCA nebyly nalezeny statistické významnosti (s funisitidou: medián 7.3 ng/mL, IQR 1.4 – 100.5 vs. bez HCA: medián 3.0 ng/mL, IQR 1.7 – 6.4; $p = 0.21$) (Graf 3, Tab. 3A, 3B).



Graf 3.

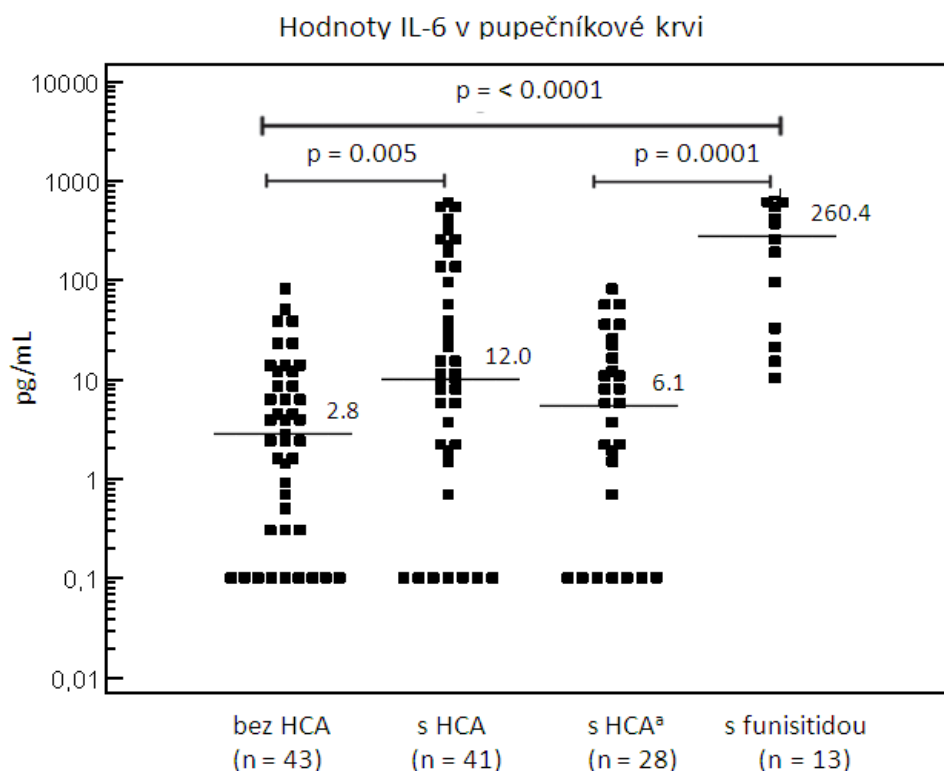
Koncentrace PTX3 v pupečnickové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody rozdělených podle přítomnosti a absence histologické chorioamnionitidy (HCA) a přítomné funisitidy. Nenalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinami pacientek. Vodorovnou značkou označeny mediány. HCA^a – skupina pacientek s potvrzenou HCA bez funisitidy.

4.2.4. Koncentrace interleukinu 6 v pupečnickové krvi

Koncentrace IL-6 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečnickové krve. Hladiny IL-6 u pacientek s PPROM a HCA byly zvýšené oproti pacientkám bez HCA (s HCA: medián 12.0 pg/mL, IQR 2.1 – 153.5 vs. bez HCA: medián 2.8 pg/mL, IQR 0.3 – 11.5; $p = 0.005$).

Ještě výraznější rozdíl v hodnotách IL-6 byl nalezen v pupečnickové krvi mezi skupinami pacientek s funisitidou a pacientkami bez HCA (s funisitidou: medián 260.4 pg/mL, IQR 29.5 – 562.8 vs. bez HCA: medián 2.8 pg/mL, IQR 0.3 – 11.5; $p < 0.0001$).

Hodnoty IL-6 se také značně lišily u žen s HCA^a (skupina žen pouze s diagnostikovanou HCA bez funisidity) a u žen s funisitidou (s HCA^a: medián 6.1 pg/mL, IQR 0.4 – 20.9 vs. s funisitidou: medián 260.4 pg/mL, IQR 29.5 – 562.8; $p = 0.0001$) (Graf 4, Tab. 3A, 3B).



Graf 4.

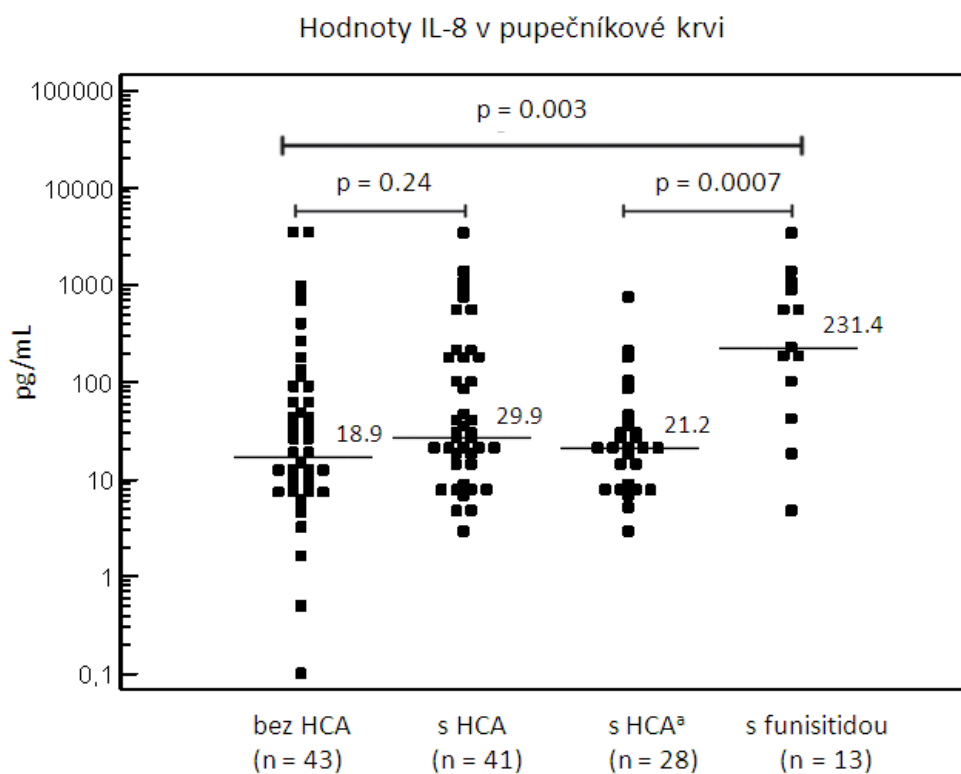
Koncentrace IL-6 v pupečnickové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody. U pacientek s PPROM a HCA byly naměřeny vyšší koncentrace IL-6 v porovnání s pacientkami bez HCA. Skupina žen s PPROM a funisitidou měla signifikantně vyšší medián IL-6 než skupina žen s HCA bez funisidity^a a bez HCA. Vodorovnou značkou označeny mediány.

4.2.5. Koncentrace interleukinu 8 v pupečnickové krvi

Hladiny IL-8 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečnickové krve. Koncentrace IL-8 v pupečnickové krvi u pacientek s PPROM a HCA nebyly navýšené oproti pacientkám bez HCA (s HCA: medián 29.9 pg/mL, IQR 14.0 – 184.0 vs. bez HCA: medián 18.9 pg/mL, IQR 8.2 – 91.5; $p = 0.24$).

Zásadnější rozdíl v hodnotách IL-8 v pupečnickové krvi byl nalezen mezi skupinami pacientek s funisitidou a pacientkami bez HCA (s funisitidou: medián 231.4 pg/mL, IQR 84.5 – 920.6 vs. bez HCA: medián 18.9 pg/mL, IQR 8.2 – 91.5; $p < 0.003$).

Hladiny IL-8 v pupečnickové krvi se nejvýznamněji odlišovaly u žen s HCA^a oproti ženám s funisitidou (s HCA^a: medián 21.2 pg/mL, IQR 8.6 – 37.9 vs. s funisitidou: medián 231.4 pg/mL, IQR 84.5 – 920.6; $p = 0.0007$) (Graf 5, Tab. 3A, 3B).



Graf 5.

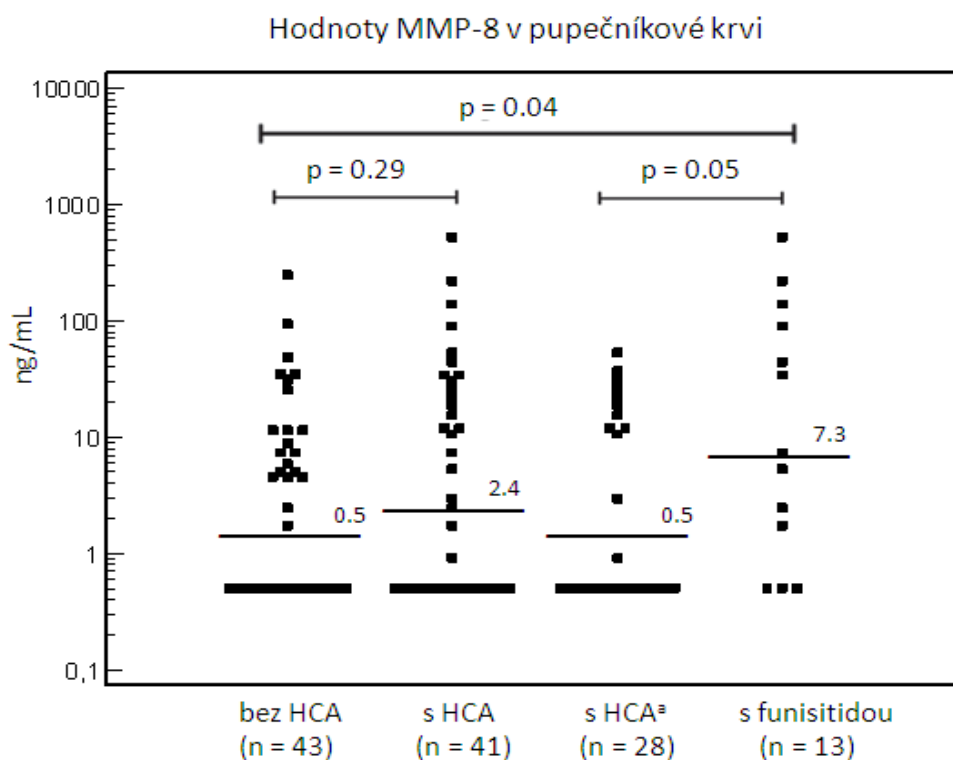
Koncentrace IL-8 v pupečnickové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody. Mezi pacientkami s PPROM a s HCA a pacientkami bez HCA nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v koncentraci IL-8 v pupečnickové krvi. Zatímco skupina žen s PPROM a funisitidou vykazovala signifikantní navýšení hladin IL-8 v pupečnickové krvi v porovnání se skupinou žen s přítomnou HCA bez funisidity^a a žen bez HCA. Vodorovnou značkou označeny mediány.

4.2.6. Koncentrace matrixové metaloproteázy 8 v pupečníkové krvi

Hodnoty MMP-8 byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích pupečníkové krve. Koncentrace MMP-8 v pupečníkové krvi u pacientek s PPROM a HCA nebyly zvýšené oproti pacientkám bez HCA (s HCA: medián 2.4 ng/mL, IQR 0.5 – 24.2 vs. bez HCA: medián 0.5 ng/mL, IQR 0.5 – 8.4; $p = 0.29$).

Rozdíl v hodnotách MMP-8 v pupečníkové krvi byl nalezen mezi skupinami pacientek s PPROM a funisitidou a pacientkami bez HCA (s funisitidou: medián 7.3 ng/mL, IQR 1.4 – 100.5 vs. bez HCA: medián 0.5 ng/mL, IQR 0.5 – 8.4; $p = 0.04$).

Koncentrace MMP-8 v pupečníkové krvi se rovněž lišily u žen s HCA^a oproti ženám s funisitidou (s HCA^a: medián 0.5 ng/mL, IQR 0.5 – 16.8 vs. s funisitidou: medián 7.3 ng/mL, IQR 1.4 – 100.5; $p = 0.05$) (Graf 6, Tab.3A, 3B).



Graf 6.

Koncentrace MMP-8 v pupečníkové krvi u žen s předčasným odtokem plodové vody. Mezi pacientkami s PPROM a s HCA a pacientkami bez HCA nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách MMP-8 v pupečníkové krvi. Na rozdíl od skupiny žen s PPROM a funisitidou, která vykazovala zvýšení koncentrace MMP-8 v pupečníkové krvi v porovnání se skupinou žen s přítomnou HCA bez funisidity^a a žen bez HCA. Vodorovnou značkou označeny mediány.

Tabulka 3

A.

Hladiny markerů v pupečnickové krvi ve vztahu k přítomnosti nebo absenci HCA a přítomnosti funisitidy u žen s předčasným odtokem plodové vody.

| | Přítomnost HCA | Absence HCA | <i>p</i> - hodnota ¹ | Přítomnost funisitidy | <i>p</i> - hodnota ² |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| IL-6 (pg/mL) | 12.0 (2.1 – 153.5) | 2.8 (0.3 – 11.5) | 0.005 | 260.4 (29.5 – 562.8) | < 0.0001 |
| IL-8 (pg/mL) | 29.9 (14.0 – 184.0) | 18.9 (8.2 – 91.5) | 0.24 | 231.4 (84.5 – 920.6) | 0.003 |
| MMP-8 (ng/mL) | 2.4 (0.5 – 24.2) | 0.5 (0.5 – 8.4) | 0.29 | 7.3 (1.4 – 100.5) | 0.04 |
| PTX3 (ng/mL) | 3.2 (2.2 – 6.8) | 3.0 (1.7 – 6.4) | 0.55 | 4.1 (2.8 – 7.0) | 0.21 |
| sCD163 (ng/mL) | 1472.0 (1139.8 – 1828.0) | 1168.0 (891.8 – 1487.5) | 0.01 | 1626.0 (1530.5 – 2090.3) | 0.002 |
| sTLR2 (ng/mL) | 7.6 (5.1 – 12.3) | 8.0 (6.0 – 9.4) | 0.79 | 7.2 (5.5 – 22.3) | 0.51 |

B.

Hladiny markerů v pupečnickové krvi ve vztahu k přítomnosti HCA bez funisitidy a přítomné funisitidy u žen s předčasným odtokem plodové vody.

| | Přítomnost HCA ^a | Přítomnost funisitidy | <i>p</i> ³ - hodnota |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| IL-6 (pg/mL) | 6.1 (0.4 – 20.9) | 260.4 (29.5 – 562.8) | 0.0001 |
| IL-8 (pg/mL) | 21.2 (8.6 – 37.9) | 231.4 (84.5 – 920.6) | 0.0007 |
| MMP-8 (ng/mL) | 0.5 (0.5 – 16.8) | 7.3 (1.4 – 100.5) | 0.05 |
| PTX3 (ng/mL) | 3.1 (2.0 – 6.1) | 4.1 (2.8 – 7.0) | 0.24 |
| sCD163 (ng/mL) | 1316.0 (1077.5 – 1672.0) | 1626.0 (1530.5 – 2090.3) | 0.03 |
| sTLR2 (ng/mL) | 7.7 (5.0 – 11.3) | 7.2 (5.5 – 22.3) | 0.28 |

Hladiny markerů byly hodnoceny neparametrickým Wilcoxonovým testem (uvedeny jako medián [interkvartilový rozsah]).

Vysvětlivky: HCA - histologická chorioamnionitida; HCA^a - skupina pacientek s potvrzenou HCA bez funisitidy; IL – interleukin; IQR – interkvartilový rozsah; MMP – matrixová

metaloproteáza; PTX – pentraxin; sCD163 – solubilní forma vychytávacího receptoru CD163; sTLR2 – solubilní forma Toll-like receptoru 2.

¹*p*-hodnota – porovnání skupin s přítomností a absencí HCA.

²*p*-hodnota – porovnání skupiny s přítomnou funisitidou a skupinou bez HCA.

³*p*-hodnota – porovnání skupiny s přítomnou HCA (bez funisidity) a skupinou s funisitidou. Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.

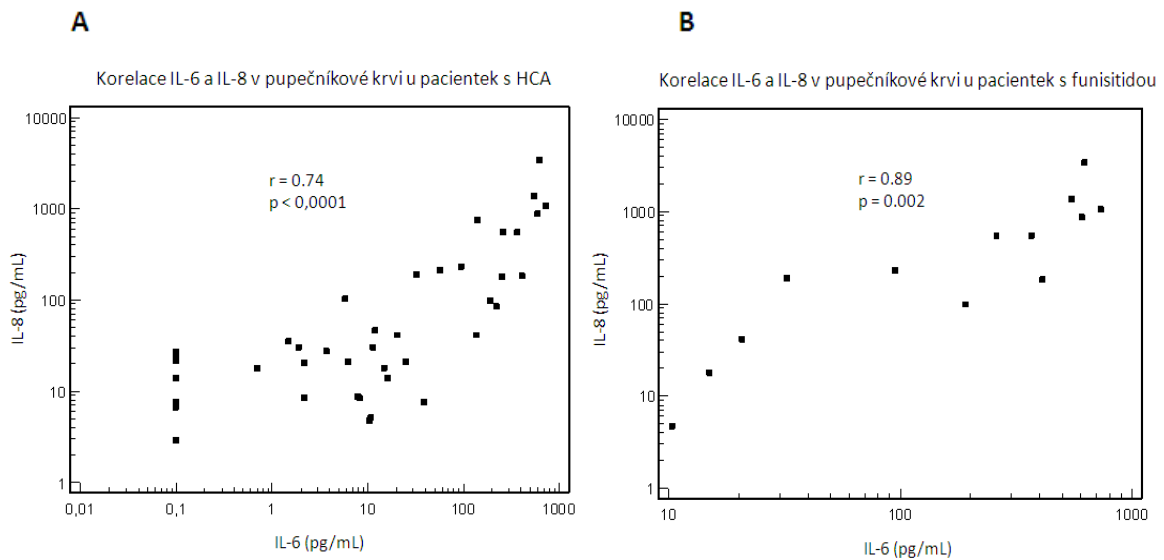
4.3. Vzájemná korelace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi

Ve skupině pacientek s PPRM a přítomnou HCA byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace mezi koncentracemi IL-6 a IL-8 v pupečnickové krvi (Spearmanův koeficient $r = 0.74$, $p < 0.0001$) (Graf 7A). Na stejné hladině významnosti byla objevena v této skupině žen pozitivní korelace mezi hodnotami MMP-8 a sCD163 v pupečnickové krvi (Spearmanův koeficient $r = 0.58$, $p < 0.0001$) (Graf 8A). Koncentrace sCD163 pozitivně korelovaly i s dalšími markery, a sice s IL-6 (Spearmanův koeficient $r = 0.45$, $p = 0.005$) a IL-8 (Spearmanův koeficient $r = 0.42$, $p = 0.009$). Hladina PTX3 pozitivně korelovala u pacientek s HCA pouze s IL-8 (Spearmanův koeficient $r = 0.42$, $p = 0.008$) (Tab. 4).

Ve skupině pacientek s diagnostikovanou funisitidou byla nalezena pozitivní korelace mezi hodnotami IL-6 a IL-8 v pupečnickové krvi (Spearmanův koeficient $r = 0.89$, $p = 0.002$) (Graf 7B). Další pozitivní korelace u žen s funisitidou byla objevena mezi koncentracemi sCD163 a MMP-8 v pupečnickové krvi (Spearmanův koeficient $r = 0.69$, $p = 0.02$) (Graf 8B, Tab. 4).

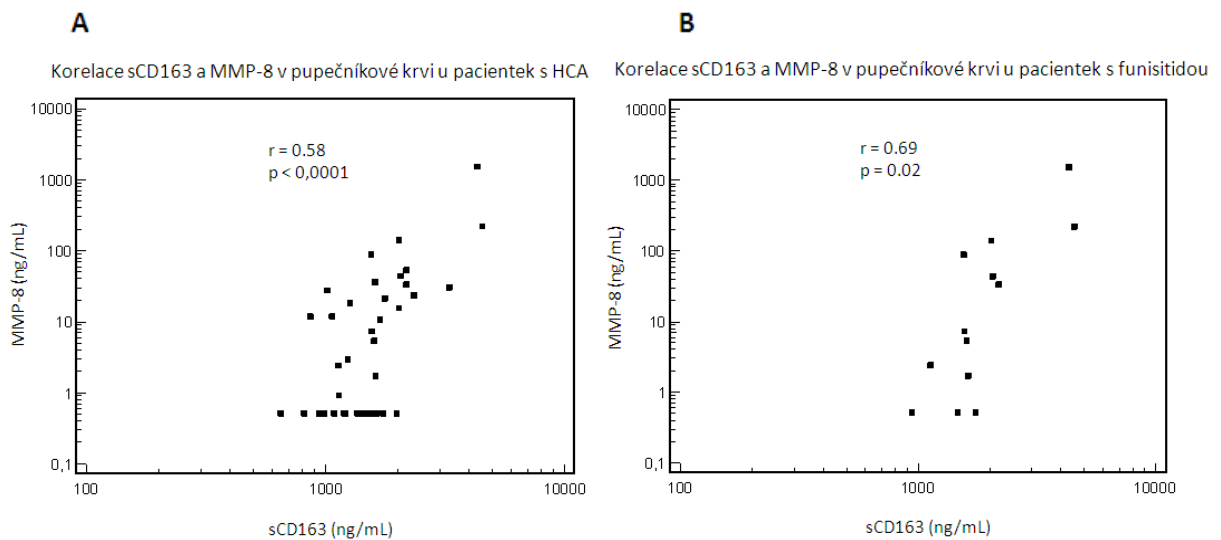
Mezi nejvýznamnější korelace u žen bez HCA patřily pozitivní korelace mezi hladinami molekul MMP-8 a PTX3 (Spearmanův koeficient $r = 0.38$, $p = 0.02$), MMP-8 a IL-8 (Spearmanův koeficient $r = 0.35$, $p = 0.02$) a IL-6 a IL-8 (Spearmanův koeficient $r = 0.35$, $p = 0.02$).

Koncentrace sTLR2 nemohly být použity ke korelační analýze, jelikož jejich hodnoty byly měřeny z jiného souboru pacientek než zbylé markery.



Graf 7.

Korelace molekul interleukinu 6 a interleukinu 8 v pupečníkové krvi u pacientek s PPRM a s histologickou chorioamnionitidou (**A**) a s funisitidou (**B**).



Graf 8.

Korelace solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 a matrixové metaloproteázy 8 v pupečníkové krvi u pacientek s PPRM a histologickou chorioamnionitidou (**A**) a funisitidou (**B**).

Tabulka 4.

Souhrn všech vzájemných korelací identifikovaných markerů v pupečnickové krvi, vyjma molekuly solubilního Toll like receptoru 2.

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

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

r značí Spearmanův korelační koeficient.

p -hodnota – hladina významnosti.

¹ – korelace mezi jednotlivými markery u pacientek s HCA.

² – korelace mezi jednotlivými markery u pacientek s funisitidou.

Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.

4.4. ROC křivky identifikovaných markerů v pupečnickové krvi

K vyhodnocení kvality testovaných markerů pro stanovení HCA a funisitidy byla využita ROC (Receiver Operating Characteristic) křivka, graf prahové operační charakteristiky. Ten znázorňuje vztah mezi senzitivitou a specificitou, tj. mezi správnou pozitivitou a falešnou pozitivitou. Závislost senzitivity a specificity závisí na zvoleném optimálním hraničním bodu testu (cut-off value) a na vlastnostech testované skupiny pacientek. Plocha pod ROC křivkou (Area Under the Curve, AUC) vyjadřuje efektivitu testu diagnostikovat HCA/funisitidu. AUC nad 75 % lze považovat za uspokojivě diskriminující test.

Věrohodnostní poměr (Likelihood Ratio, LR) byl použit k vyjádření změny pravděpodobnosti výskytu HCA/funisitidy v závislosti na pozitivním (LR+) výsledku testu. LR+ nám říká přibližně kolikrát je pravděpodobnější, že test bude pozitivní u pacientky s nemocí oproti pacientce bez nemoci.

4.4.1. ROC křivky markerů v pupečnickové krvi k diagnostice HCA

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

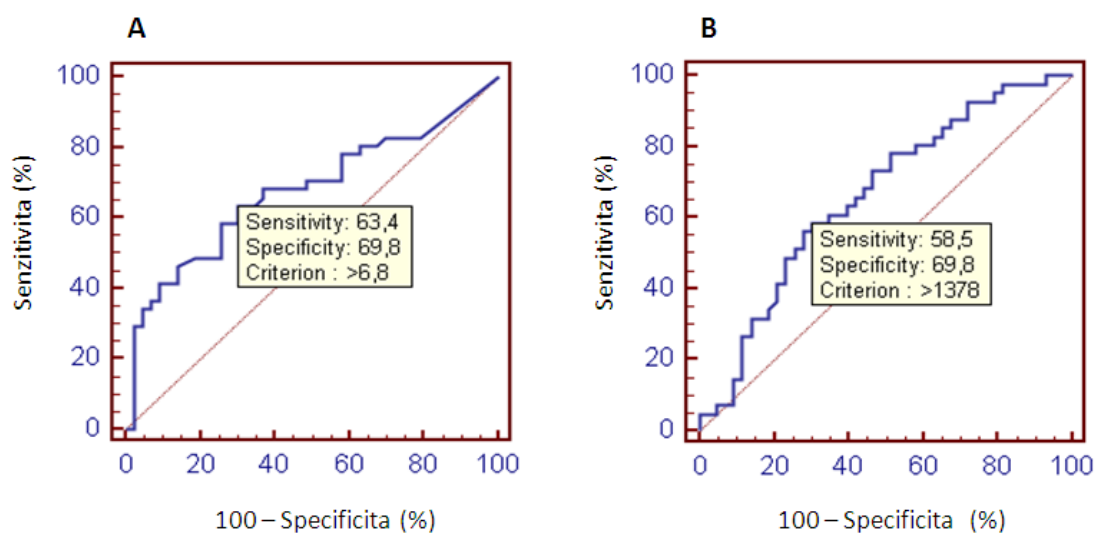
K nim patří IL-6 a sCD163. ROC křivky jsou znázorněny v Grafu 9. Optimální hraniční koncentrace IL-6 v pupečnickové krvi pro diagnózu HCA byla stanovena na 6.8 pg/mL, pro marker sCD163 byla hladina v pupečnickové krvi pro diagnózu HCA vypočítána na 1378.0 ng/mL. AUC však u obou molekul nesplňovala požadavek diagnostické efektivitu testu, tedy dosažení alespoň 75 % plochy (Tab. 5).

4.4.2. ROC křivka markerů v pupečnickové krvi k diagnostice funisitidy

Rovněž zde byly vyhodnoceny pouze ty markery v pupečnickové krvi, jejichž p hodnoty byly v porovnání se skupinou bez HCA statisticky významné ($p \leq 0.05$).

Byly to IL-6, IL-8, sCD163 a MMP-8. ROC křivky jednotlivých molekul jsou znázorněny v Grafu 10. Optimální hraniční hodnota IL-6 v pupečnickové krvi pro diagnózu funisitidy byla stanovena na 13.9 pg/mL, pro IL-8 na 92.5 pg/mL, pro sCD163 byla vypočítána na 1462.0 ng/ml a pro MMP-8 na 30.8 ng/mL. AUC větší než 75 % byla zaznamenána u IL-6, IL-8 a sCD163 (Tab. 6).

ROC křivka molekul IL-6 a sCD163 v pupečnickové krvi ke stanovení HCA



Graf 9.

Graf prahové operační charakteristiky (Receiver Operating Characteristic, ROC) pro molekuly interleukinu 6 (A) a solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 (B) v pupečnickové krvi k určení přítomnosti histologické chorioamnionitidy.

A. Plocha pod ROC křivkou (Area Under the Curve, AUC) interleukinu 6 zaujímá 68 %; $p = 0.003$.

B. AUC solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 zaujímá 66 %; $p = 0.003$

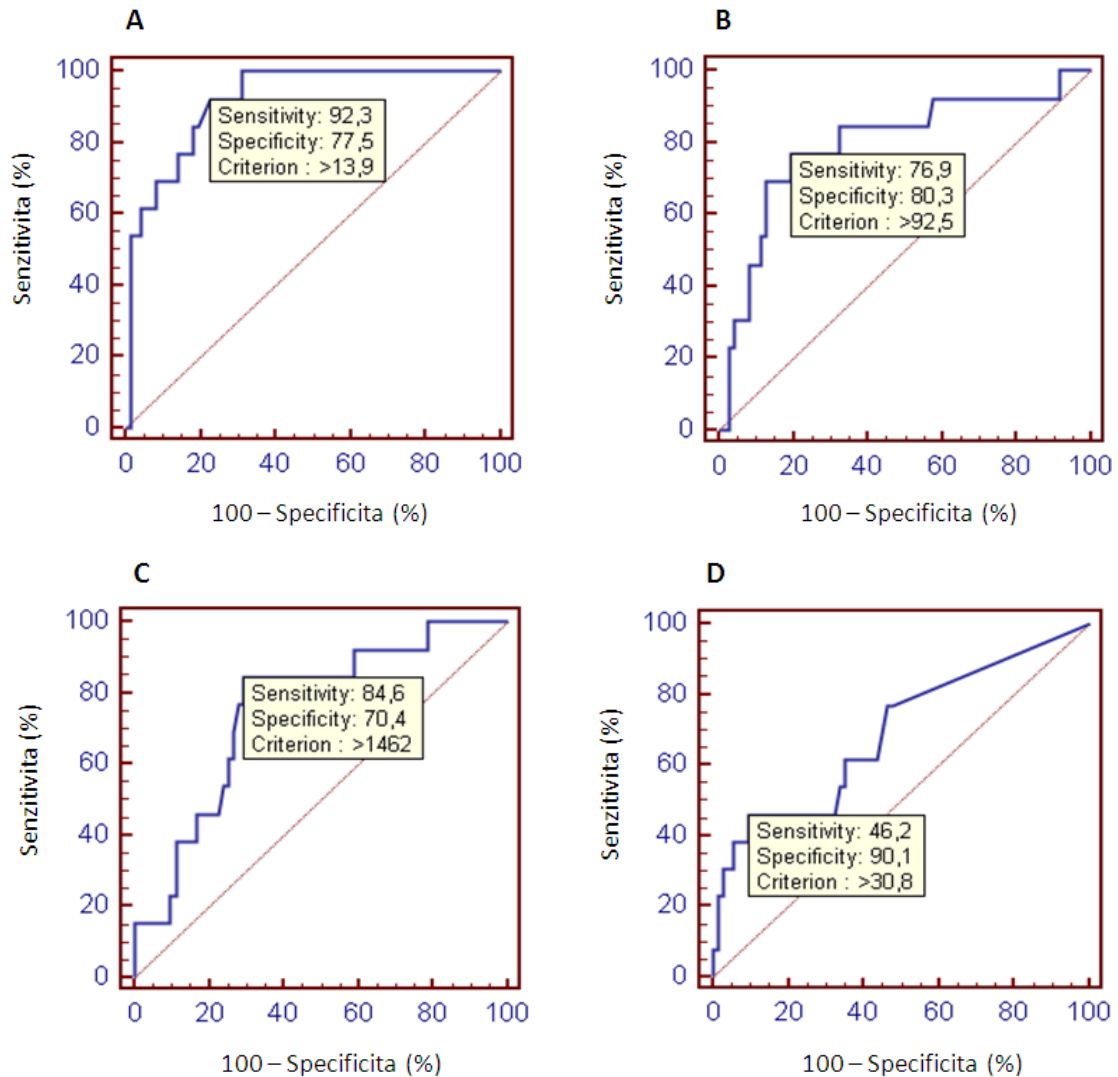
Tabulka 5.

Předpokládané hodnoty testu koncentrací interleukinu 6 a solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 v pupečnickové krvi pro diagnostiku histologické chorioamnionitidy.

| | Hraniční bod | Senzitivita | Specifická | Likelihood ratio+ | AUC |
|---------------|--------------|-------------|------------|-------------------|------|
| IL-6 | 6.8 pg/mL | 63 % | 70 % | 2.1 | 68 % |
| sCD163 | 1378.0 ng/mL | 59 % | 70 % | 1.94 | 66 % |

Vysvětlivky: AUC – plocha pod ROC křivkou; IL – interleukin; Likelihood ratio+ – pozitivní věrohodnostní poměr; sCD163 – solubilní forma vychytávacího receptoru CD163.

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



Graf 10.

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

- A. Plocha pod ROC křivkou (Area Under the Curve, AUC) interleukinu 6 zaujímá 92 %; $p < 0.0001$.
- B. AUC interleukinu 8 zaujímá 80 %; $p = 0.0001$.
- C. AUC solubilní formy vycytávacího receptoru CD163 zaujímá 75 %; $p = 0.0003$.
- D. AUC matrixové metaloproteázy 8 zaujímá 69 %; $p = 0.03$.

Tabulka 6.

Předpokládané hodnoty testu koncentrací interleukinu 6, interleukinu 8, solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 a matrixové metaloproteázy 8 v pupečnickové krvi pro diagnostiku funisitidy.

| | Hraniční bod | Senzitivita | Specificita | Likelihood ratio+ | AUC |
|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------------|------|
| IL-6 | 13.9 pg/mL | 92 % | 77 % | 4.10 | 92 % |
| IL-8 | 92.5 pg/mL | 77 % | 80 % | 3.90 | 80 % |
| sCD163 | 1462.0 ng/mL | 85 % | 70 % | 2.86 | 75 % |
| MMP-8 | 30.8 ng/mL | 46 % | 90 % | 4.68 | 69 % |

Vysvětlivky: AUC – plocha pod ROC křivkou; IL – interleukin; Likelihood ratio+ – pozitivní věrohodnostní poměr; sCD163 – solubilní forma vychytávacího receptoru CD163; MMP – matrixová metaloproteáza.

5. Diskuze

Předčasný porod představuje jeden z nejčastěji diskutovaných problémů moderního porodnictví. Celosvětově narůstající počet předčasných porodů vede řadu vědeckých skupin k bádání nad molekulárními příčinami této velmi závažné komplikace. Jeho management je mnohdy zkomplikován přítomností intraamniálního zánětu (IAI), který koreluje s HCA a/nebo s funisitidou. Zánětové změny v intraamniální dutině se silně podílí na zvýšení perinatální morbidity a mortality novorozenců. Jako důsledek oslabených plodových obalů a PPROM může být infekce a rozvinutí HCA doprovázená narušením jemné imunologické rovnováhy mezi prozánětovými a protizánětovými markery. Regulace počátku porodu je již delší dobu spojována s vlivem imunitního systému. Nedávná studie poukázala na signifikantně vyšší koncentrace IL-6, IL-8 a TNF- α v plodové vodě a častější známky chorioamnionitidy u žen, které rodily spontánně v termínu oproti ženám, jež rodily plánovaným císařským řezem [172]. Spouštěčem spontánního termínového porodu se tak jeví zánětová odpověď.

Ač placenta představuje fyzikální a imunologickou bariéru proti vstupu infekčních agens, její ochranná funkce není zcela bezvýhradní. Proto imunitní systém matky v těhotenství i nezralý imunitní systém plodu jsou způsobilí k obranné reakci při ascendentním či retrográdním průniku mikroorganismů do amniální dutiny. V obraně zastávají jednu z nejdůležitějších rolí mechanismy vrozené imunity, jež okamžitě odpovídají na přítomnost mikroorganismů. Rozpoznání patogenů receptory PRR na povrchu buněk je první krok k jejich eliminaci. Patogenní bakterie stimulují hostitelské tkáně a infiltrující imunokompetentní buňky přes PRR k navýšení produkce proteinů akutní fáze CRP, PTX3 a prozánětových cytokinů IL-1 β , IL-6, TNF- α a IL-8. Tyto působky slouží jako primární signální síť, která následně podněcuje zejména buňky myometria k produkci efektorových molekul jako jsou prostaglandiny nebo MMPs. Trofoblastové buňky pod vlivem cytokinů zvyšují tvorbu prostaglandinů, cyklooxygenázy a oxytocinových receptorů, což ve výsledku může vést k předčasnému porodu [79]. Probíhající imunitní odpověď je nutné usměrňovat, aby reakce příliš nepoškodila tkáně matky a plodu. Jako jeden z regulátorů imunitní odpovědi slouží rozpustné formy receptorů, jež brání nepřiměřené zánětové reakci.

Koncentrace výše uvedených prozánětových a regulačních molekul je možné sledovat v plodové vodě, kde mají větší či menší vypovídací hodnotu o přítomnosti IAI.

I naše skupina zkoumala hladiny řady markerů v plodové vodě, které výrazně korelovaly s přítomnou HCA a/nebo s funisitidou, např. IL-8 [165]. Nevýhodou je nutnost provést invazivní vyšetření k získání plodové vody, které s sebou nese určité riziko pro matku a její dítě. Namísto toho odběr a následné sledování vytipovaných markerů v pupečnickové krvi je naprosto bezbolestná, bezriziková procedura, z které můžeme rychle získat informace o klinickém stavu plodu i matky.

Recentní rozsáhlá studie se zaměřila na koncentrace mnoha imunologických markerů v pupečnickové krvi zdravých novorozenců při termínovém spontánním porodu beze stop HCA. Objevili, že samotná expozice plodu procesu porodu není spojena se zvýšenými hodnotami cytokinů IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α a TNF- β , IFN- α a IFN- γ , IFN-inducibilního proteinu 10 a faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů v pupečnickové krvi v porovnání s novorozenci, jejichž matky podstoupily císařský řez. Normální porod nevyvolává systémovou aktivaci imunitního systému u zdravého dítěte [173]. Za patologické situace, jakou je přítomnost HCA během těhotenství, se však hodnoty mnoha molekul v pupečnickové krvi mohou měnit.

Unikátnost předkládané práce spočívá v identifikaci koncentrací sTLR2, sCD163, PTX3 a MMP-8 v pupečnickové krvi ve vztahu k HCA, což dosud nebylo zkoumáno v této tekutině. Jelikož jsme hledali vztah mezi přítomnou HCA a hladinami prozáněťových molekul, jako další markery jsme zvolili typické představitele prozáněťových cytokinů IL-6 a IL-8. Ve všech testovaných vzorcích byly detekovány všechny zmiňované markery. Jejich vztah k HCA byl poměrně rozmanitý.

Největším přínosem práce je bezesporu objevení silné závislosti mezi přítomnou HCA a koncentrací sCD163. Signifikantní nárůst primárního vychytávacího receptoru pro hemoglobin v pupečnickové krvi byl zaznamenán u pacientek nejen s PPRM a s HCA ale i s funisitidou ve srovnání žen bez HCA. Také při srovnání pacientek pouze s diagnostikovanou HCA (bez funisitidy) a pacientkami s funisitidou byl nalezen významný rozdíl v hladinách sCD163.

K tomu aby došlo k výraznému navýšení sCD163 je třeba delšího trvání zánětu. Cytokiny, které převládají v časně fázi zánětu, jeho produkci značně potlačují. Až v pozdní fázi akutního zánětu je v monocytech a makrofázích indukována exprese CD163, která je zapříčiněna zvýšenou hemolýzou a potřebou degradovat Hp-Hb komplexy. Ukazuje se, že vychytávání Hp-Hb komplexů není jedinou funkcí molekuly

CD163. Je zároveň schopen rozpoznávat Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie a podporuje produkci prozáněťových cytokinů makrofágy. Tím se funkčně přibližuje TLR receptorům [174]. Vysoké hodnoty proteolyticky odštěpené formy CD163 byly nalezeny v plasmě během bakteriální sepse a mnoha jiných akutních i chronických záněťových stavech, kde jsou plně aktivované monocyty/makrofágy [125, 175]. Prozáněťové vlastnosti CD163 jsou zřejmě i hlavním důvodem jeho odštěpování z povrchu monocytů/makrofágů, způsob regulace vlastní aktivity v pozdní fázi záněťové reakce.

Produkty rozkladu Hp-Hb komplexů (oxid uhelnatý, biliverdin – posléze bilirubin, volné železo) mají silné antioxidační, antiapoptotické a protizáněťové vlastnosti, např. v buňkách zprostředkovávají sekreci IL-10 [176, 177]. Na druhou stranu uvolněný IL-10 v kombinaci s IL-6, který se v místě zánětu vyskytuje, dále zesilují proteosyntézu CD163 [120]. Protein CD163 a jeho solubilní forma jsou molekuly s modulačními vlivy na imunitní systém.

Potvrdilo se ve shodě s dřívějšími výše zmiňovanými studiemi, že ve skupině pacientek s PPRM a s funisitidou, kde zánět byl nejzávažnější a postihl i pupečník, byly hodnoty sCD163 nejvyšší. Hodnoty sCD163 v pupečnickové krvi byly stratifikované v závislosti na stupni zánětu.

Zda část sCD163 není původu mateřského nelze stoprocentně vyloučit, jelikož aktivní přestup této molekuly transportními systémy z mateřské krve nebyl nikdy zkoumán. Nicméně dvě práce Vogelové a kol. se zabývaly koncentracemi sCD163 v periferní krvi předčasně rodících žen. Mediány sCD163 dosáhly hodnot 2.4 mg/mL a 3.4 mg/mL [178, 179]. Při srovnání s hodnotami v pupečnickové krvi (1168.0 ng/mL bez HCA, 1626 ng/mL s funisitidou) můžeme alespoň vyloučit přestup sCD163 přes placentu pasivní difúzí.

Na základě výsledků soudobé studie, která pozorovala *in vitro* zvýšení mRNA CD163 ve fetálních Hofbauerových buňkách vyskytujících se v placentě (cytologickými znaky odpovídají makrofágům) po stimulaci kortizolem nebo dexamethasomem, byla zpracována analýza vlivu kortikosteroidů na koncentrace sCD163 [180]. Kortikosteroidy se využívají v porodnictví k indukci maturace plicní tkáně u nezralých plodů. Podávají se pacientkám v gestačním týdnu nižším než 34+6. Patří ovšem mezi imunosupresivní léky, jež potlačují produkci řady aktivačních molekul v imunitních buňkách. Sekundární analýza porovnávala skupinu žen s HCA a bez HCA a skupinu žen s funisitidou a bez funisitidy, kterým byly kortikosteroidy podány (gestační stáří \leq

34+6) a těmi, které kortikosteroidy nedostaly (gestační stáří $\geq 35+0$). Nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách sCD163 mezi skupinami pacientek, které kortikosteroidy dostaly (s HCA vs. bez HCA: $p = 0.45$, s funisitidou vs. bez funisitidy: $p = 0.13$) a které nikoliv (s HCA vs. bez HCA: $p > 0.1$, s funisitidou vs. bez funisitidy: pro nízký počet vzorků nehodnotitelné).

Překvapení nastalo při hodnocení výsledků koncentrací sTLR2 v pupečnickové krvi u pacientek s PPRM a s HCA nebo s funisitidou, kde nebyl potvrzen významný nárůst jeho hladin oproti ženám bez HCA. Mediány koncentrace sTLR2 byly u všech skupin naměřeny na podobných hodnotách.

Přitom nárůst koncentrací sTLR2 byl zaznamenán v plodové vodě při IAI a také v případě jiných zánětlivých onemocnění byly naměřeny výrazně vyšší hladiny sTLR2. Například u pacientů s ulcerózní kolitidou byly *in vitro* produkované vyšší koncentrace sTLR2 mononukleárními buňkami odebranými z vrstvy střevní sliznice lamina propria nebo u pacientů se zánětem orální mukózy (lichen planus, syndrom pálení v ústech) docházelo ke zvýšení koncentrace sTLR2 ve slinách oproti zdravým kontrolám [113, 118, 181].

Proč se podařilo objevit elevaci hladin sTLR2 v plodové vodě v závislosti na zánětu a v pupečnickové krvi nikoliv, můžeme odůvodnit více teoriemi. Vysvětlení můžeme hledat v různých buněčných zdrojích, které uvolňují sTLR2 do plodové vody a do pupečnickové krve. TLR2 je v době těhotenství u žen vyjádřen nejen na imunitních buňkách, tj. na dendritických buňkách, monocyttech, placentálních makrofázích a děložních NK buňkách, ale i na buňkách neimunní povahy. TLR2 je exprimován na buňkách amnionu, chorion-deciduální membrány nebo na buňkách trofoblastu. Navíc v případě diagnostikované HCA a při bakteriální či virové infekci u předčasných porodů ve srovnání s plodovými obaly bez infekce dochází k signifikantnímu nárůstu exprese TLR2 na povrchu buněk amnionu, chorionu a deciduy [182-184]. Buněčné zdroje sTLR2 v plodové vodě mohou být velmi různorodé, na rozdíl od pupečnickové krve, kde jsou zřejmě hlavním producentem sTLR2 monocyty. Dalším zdrojem sTLR2 by mohly být fetální NK buňky, ale zastoupení TLR2 na jejich povrchu je v porovnání s NK buňkami dospělého jedince zanedbatelné [185]. Také v endoteliálních buňkách se může po aktivaci indukovat exprese TLR2 a i ony mohou být zřejmě zdrojem sTLR2 v plasmě. Zda je TLR2 vyjádřen i na endotelu cév v pupečnicku nejsou publikovány

žádné práce až na jednu čínskou studii. Ta potvrdila pouze genovou expresi mRNA molekuly TLR2 v endoteliálních buňkách pupečnickové žíly [186].

Ještě klíčovější se jeví objev Shena a kol., jež zjistili, že exprese TLR2 na monocytech izolovaných z pupečnickové krve ihned po vaginálním porodu vykazovala signifikantní navýšení oproti vzorkům odebraných z pupečnicku po císařském řezu. Nadcházející přirozený porod je zřejmě spojován s konceptem „přípravy“ přirozeného imunitního systému plodu na obranu při prvním kontaktu s externím prostředím. Zdá se, že buňky plodu nesoucí TLR2 jsou spíše podněcovány k jeho vyjádření než k jeho odštěpení, a to i v případě infekce. [187].

Dalším důvodem k udržení TLR2 na povrchu fagocytujících buněk je vysoká náchylnost novorozenců k bakteriálním infekcím. Po *in vitro* stimulacích pupečnickové krve ligandy TLR bylo zjištěno, že produkce regulačních Th1/Th2 cytokinů (IL-12, IL-13, IL-10) byla signifikantně snížena v porovnání s krví dospělých. Naproti tomu prozáněťové cytokiny IL-1 β , IL-6 a IL-8 vykazovaly výrazné navýšení hladin oproti dospělé kontrolní skupině. Abnormální TLR odpověď s nárůstem prozáněťových cytokinů může do určité míry kompenzovat nevyzrálou adaptivní imunitu. Zvýšení exprese TLR2 na monocytech podporuje také prostředí značně bohaté na imunomodulační hormony, jež byly v pupečnickové krvi objeveny (endorfin, katecholamin, kortizol) [188-190].

Navázáním ligandů na TLR2 je v buňce indukována exprese molekuly CD163. Následuje odštěpení CD163 z povrchu buňky, tzv. TLR-zprostředkované odštěpení [191]. Uvážíme-li, že k odvržení TLR2 v pupečnickové krvi dochází v omezené míře i za přítomnosti zánětu, buňka získává silné stimuly k odvrhování CD163 ze své plasmatické membrány.

V neposlední řadě je potřeba zmínit možný vliv dávek kortikosteroidů na uvolňování sTLR2 v pupečnickové krvi. Proto byla provedena sekundární analýza. Ta porovnávala skupinu žen s HCA a bez HCA a skupinu žen s funisitidou a bez funisidity, kterým byly kortikosteroidy podány (gestační stáří $\leq 34+6$) a těmi, které kortikosteroidy nedostaly (gestační stáří $\geq 35+0$). Nebyly nalezeny významné rozdíly v hladinách sTLR2 mezi skupinami pacientek, které kortikosteroidy dostaly (s HCA vs. bez HCA: $p = 0.81$, s funisitidou vs. bez funisidity: $p = 0.54$) a které nikoliv (s HCA vs. bez HCA: $p > 0.1$, s funisitidou vs. bez funisidity: pro nízký počet vzorků nehodnotitelné).

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

Již více studií sledovalo koncentrace PTX3 v mateřské krvi v závislosti na porodu, IAI, preeklampsii nebo intrauterinní růstové restrikci. Cruciani a kol. objevili, že koncentrace PTX3 v mateřské krvi významně vzrůstá s gestačním stářím žen a při spontánním termínovém porodu byly jeho hodnoty signifikantně zvýšené v porovnání s ženami v termínu, u kterých porod ještě nezačal. Zároveň odhalili značně zvýšené hladiny PTX3 u žen s PPROM ve srovnání s ženami bez této komplikace. Zajímavým zjištěním bylo, že hladinu PTX3 v mateřské krvi neovlivnila přítomnost IAI u předčasně rodících žen ani u žen s PPROM. Navýšení PTX3 v mateřské krvi je zřejmě spojeno spíše s procesem porodu než s přítomnou IAI [192, 193]. Recentní studie dále potvrdila navýšení hodnot PTX3 v mateřské krvi u žen s preeklampií, jehož koncentrace korelovala se závažností onemocnění. Také intrauterinní růstová restrikce plodu je spojována s nárůstem hladiny PTX3 v mateřské krvi. Zvýšené hodnoty jsou zřejmě spojeny s hypoxickým prostředím, které vzniká z důvodů pozměněné endotelové funkce mateřských cév. Právě endotelové buňky budou v tomto případě hlavním zdrojem PTX3 [194].

PTX3 slouží jako protein akutní fáze k aktivaci vrozené imunity, jehož koncentrace lokálně vzrůstá zhruba za 7.5 hodin při infekčním a zánětovém stavu (pro srovnání CRP svého vrcholu dosáhne po 24 hodinách) z původních ≤ 2 ng/mL na 200-800 ng/mL v plasmě dospělého jedince. PTX3 byl například určen jako časný indikátor šokového stavu u pacientů s meningokokovou infekcí [195-197]. Po rapidním nárůstu koncentrace PTX3 a dosažení vrcholu, může v plasmě následovat pokles hladin. Poločas rozpadu PTX3 není přesně znám. Vezmeme-li v potaz, že poločas rozpadu tzv. krátkých pentraxinů CRP a SAP je 46, respektive 35 hodin, poločas rozpadu PTX3 se bude zřejmě pohybovat v podobném rozmezí a po určité době v plasmě nemusí být zjištěny jeho vysoké hodnoty [198]. Dalším důvodem, proč zvýšené koncentrace PTX3 nebyly naměřeny v krvi mateřské ani pupečnickové při potvrzené HCA, může být jeho lokální produkci v místě zánětu. V krevní cirkulaci poté mohlo docházet k rozředění produkovaného PTX3.

Naopak v plodové vodě u pacientek s PPROM při stanovené HCA a/nebo funisitidě byly koncentrace PTX3 signifikantně zvýšené v porovnání s ženami bez

zánětu [144]. Během těhotenství je PTX3 syntetizován epitelovými buňkami amnionu, mesodermálními buňkami chorionu, trofoblastovými klky a perivaskulárním stroma placenty [143]. Při aktivaci buněk je PTX3 uvolňován do plodové vody, kde se může akumulovat a být dobře detekovatelný. PTX3 je také uvolňován do plodové vody při apoptóze a nekróze buněk, jež probíhá při HCA a na počátku porodu ve zvýšené míře [196, 199].

V pupečnickové krvi jsou zdroje PTX3 zřejmě také různorodé (monocyty, DC, endotelové buňky aj.). Ovšem jeho produkce by mohla být snížena působením mediátoru prostaglandinu E2, který během porodu dominuje v krevní cirkulaci matky a který, jak bylo zjištěno, inhibuje TLR-indukovanou produkci PTX3 v myeloidních DC. Další molekulou inhibující produkci PTX3 je IFN- γ , jež je uvolňován při rozpoznání infikovaných buněk zejména fetálními Th1 lymfocyty [200, 201].

K vyloučení vlivu dávek kortikosteroidů na hladiny PTX3 v pupečnickové krvi, byla provedena přídatná analýza dat. Ta porovnávala skupinu žen s HCA a bez HCA a skupinu žen s funisitidou a bez funisidity, kterým byly kortikosteroidy podány (gestační stáří $\leq 34+6$) a těmi, které kortikosteroidy nedostaly (gestační stáří $\geq 35+0$). Nebyly nalezeny rozdíly v hladinách PTX3 mezi skupinami pacientek, které kortikosteroidy dostaly (s HCA vs. bez HCA: $p = 0.71$, s funisitidou vs. bez funisidity: $p = 0.87$) a které nikoliv (s HCA vs. bez HCA: $p > 0.1$, s funisitidou vs. bez funisidity: pro nízký počet vzorků nehodnotitelné).

Nebylo velkým překvapením, že nejsignifikantnější rozdíl koncentrací v pupečnickové krvi mezi pacientkami s PPRM a s HCA ve srovnání s pacientkami bez zánětu byl zaznamenán u IL-6. Jeho hodnoty se nejvýrazněji lišily mezi skupinami pacientek s funisitidou a bez HCA. Také při porovnávání pacientek pouze s HCA (bez funisidity) s pacientkami s potvrzenou funisitidou vykazoval IL-6 v pupečnickové krvi signifikantní diferenci. U IL-6 v pupečnickové krvi bylo možné pozorovat odstupňovanost jeho koncentrací v závislosti na klinickém stavu pacientky a novorozence.

Naše závěry jsou shodné s výsledky ostatních vědeckých skupin. Při potvrzené HCA a/nebo funisitidě dochází ke zvýšené produkci IL-6 v pupečnickové krvi [202-205].

Zdrojem IL-6 v pupečnickové krvi je několik buněčných typů. Jedním z důležitých producentů u žen s PPRM jsou endotelové buňky. Při pokusu *in vitro* na lidských umbilikálních vaskulárních endotelových buňkách (Human Umbilical

Vein Endothelial Cells, HUVECs) vyšlo najevo, že po přidání fetální plasmy získané z pupečnickové krve novorozenců od pacientek s PPRM, vykazovaly HUVECs signifikantní navýšení mRNA IL-6 v porovnání se vzorky pocházejícími od žen, které rodily v termínu [206]. Přitom vysoké hodnoty IL-6 při HCA v krevní cirkulaci plodu mohou mít až toxické účinky a bývají asociovány se zvýšeným rizikem intracerebrálního krvácení, periventrikulární leukomalacie, syndromu systémové zánětové odpovědi nebo nekrotizující enterokolitidy. Nejrizikovější skupinou perinatálních postižení jsou novorozenci narození před 32. gestačním týdnem [207-209].

Navýšené koncentrace IL-6 byly detekovány při HCA v různých tekutinách během těhotenství. Tento cytokin se ukázal být jedním z nejlepších markerů v plodové vodě pro diagnózu HCA [210, 211]. Jeho koncentrace byly zkoumány v mateřské krvi u žen s PPRM a s HCA, kde bylo zjištěno významné navýšení IL-6 oproti zdravé kontrole. Murtha a kol. předkládají IL-6 v mateřské krvi jako prediktivní marker možného rozvoje funisitidy u žen s PPRM. Satar a kol. dokonce objevili silnou korelaci mezi koncentrací IL-6 v pupečnickové krvi a koncentrací IL-6 v séru matek s PPRM. Překážkou k používání IL-6 v mateřské krvi jako markeru HCA a funisitidy je jeho nízká specifita, která většinou nedosahuje 50 % [92, 212, 213]. IL-6 byl také identifikován v cervikovaginálním hlenu a prokázal spojitost s HCA a s IAI. V porovnání s jinými markery (IL-1 β , TNF- α , GM-CSF) vykazoval IL-6 nejlepší prediktivní hodnoty. Nicméně pro rutinní prokazování IL-6 v cervikovaginálním hlenu je překážkou nízká senzitivita testů, která se pohybuje kolem 50 % [214, 215].

Produkce IL-6 je indukována IL-1 β a TNF- α . Aktivuje buňky imunitního systému a podporuje prozánětový stav v organismu (např. produkci proteinů akutní fáze, produkci protilátek). Navíc jeho vliv přesahuje hranice imunity a je schopen stimulovat buňky myometria k expresi oxytocinových receptorů. Tím dochází ke zvýšené odpovědnosti tkáně na oxytocin a uspíšení procesu porodu [216]. Na druhou stranu je třeba zmínit i pozitivní účinek IL-6 u předčasně narozených dětí. Zvýšené koncentrace IL-6 urychlují dozrávání fetální plicní tkáně stimulací alveolárních buněk typu II k expresi surfaktantového proteinu A (SP-A), jehož hladiny korelují se zralostí plodu a iniciací porodu. Hlavní funkcí SP-A je snižování povrchového napětí na styku vodní fáze a vzduchu v alveolech. Tím IL-6 nepřímo přispívá ke snížení incidence syndromu dechové tísně novorozenců [217].

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

IL-8 byl již dříve identifikován jako potenciální marker HCA v plodové vodě, kde jsou jeho hladiny značně navýšeny v porovnání s pacientkami bez HCA [165, 218]. Pozoruhodná studie srovnávala koncentrace IL-8 v žaludeční tekutině novorozenců (< 35. gestační týden), které byly signifikantně zvýšené u žen s funisitidou oproti ženám bez zánětu a které korelovaly s koncentracemi IL-8 v plodové vodě. Vzhledem k neustálému polykání amniové tekutiny plodem můžeme poměrně lehce vzniklou korelaci vysvětlit [219]. Otázka vyvstává, do jaké míry je IL-8 schopen se vstřebávat v trávicím traktu plodu a navyšovat hodnoty IL-8 v krevní cirkulaci. Castellote a kol. naměřili vysoké koncentrace IL-8 v mateřském mléku u zdravých žen (nejvyšší v kolostru), které rodily v termínu. IL-8 v mateřském mléku se zřejmě podílí na vývoji a maturaci novorozeneckého střeva a rovněž dochází k předávání imunologické zkušenosti matky. Trávicí trakt je v přímém styku s IL-8 a omezený přestup IL-8 v prenatálním věku z plodové vody a v postnatálním věku z mateřského mléka do krve plodu/novorozence nemůžeme vyloučit [220].

V pupečnickové krvi D'Alquen a kol. hodnotili hladinu IL-8 ve vztahu k HCA u předčasně rodících žen. Medián koncentrace IL-8 byl v případě HCA téměř sedminásobně a v případě funisitidy až devítinásobně zvýšen ve srovnání s kontrolní skupinou bez záněťových změn [221]. K podobným výsledkům dospěli Witt a kol., kteří srovnávali koncentrace IL-8 v pupečnickové krvi u žen s MIAC (přítomna *Ureaplasma urealyticum*) se skupinou bez MIAC [222]. V pupečnickové krvi byl IL-8 také zkoumán v souvislosti s preeklampsií, kde jeho hodnoty významně převyšovaly normální stav u zdravých žen [223]. Jeho koncentrace jsou v pupečnickové krvi také zvýšené při časně neonatální sepsi. Pro diagnózu sepse je však nutné kombinovat hodnoty IL-8 s dalšími molekulami, a to zejména s IL-6 a prokalcitoninem [224]. Dále byl IL-8 detekován v cervikovaginálním hlenu a určen jako poměrně spolehlivý marker HCA a indikátor předčasného porodu (sensitivita 100%, specificita 67%) [166, 225].

Zvýšená koncentrace IL-8 souvisí s aktivací fetálních monocytů, makrofágů a endotelových buněk v pupečnicku, které IL-8 produkují [206, 226]. Zásadní účinek IL-8 spočívá v atrahování neutrofilů do místa zánětu. V případě funisitidy je při histologickém vyšetření nalezen infiltrát neutrofilů v pupečnicku.

Nejsignifikantnější rozdíl koncentrací v pupečnickové krvi mezi pacientkami s a bez HCA byl v této práci zaznamenán u IL-6 a IL-8. To koresponduje s poznatky nedávné studie, kde stimulovali vzorky pupečnickové krve zdravých donošených novorozenců a vzorky krve zdravých dospělých jedinců různými mikrobiálními aktivátory a porovnávali koncentrace sekretovaných cytokinů. Ukázalo se, že pupečnicková krev má výrazně větší schopnost produkovat IL-6 a IL-8 než krev dospělých. Vysoké hladiny prozáněťových cytokinů mohou hrát roli ve zvýšené morbiditě a mortalitě novorozenců, jež přišli do styku s infekcí [227].

Možný vliv dávek kortikosteroidů na hladiny IL-6 a IL-8 v pupečnickové krvi byly vyvráceny recentní prací, a proto nebyly dále hodnoceny [228].

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

V pupečnickové krvi byla MMP-8 identifikována pouze v této práci. V jiných kompartmentech však byla přítomnost MMP-8 zkoumána. Poměrně rozsáhlá studie Maymona a kol. se zaměřila na hladiny MMP-8 v plodové vodě u pacientek s i bez IAI rodících předčasně i termínově. Výsledky ukázaly, že spontánní předčasný i termínový porod byl spjat se signifikantním zvýšením koncentrace MMP-8 v plodové vodě, a tyto hodnoty ještě několikanásobně vzrostly při potvrzené MIAC u žen s PPRM i u žen s předčasným porodem a neporušenými plodovými obaly. Samotný PPRM byl asociován se značně zvýšeným množstvím MMP-8 v plodové vodě v porovnání s pacientkami s rupturou plodových obalů v termínu porodu [171]. Park a kol. stanovovali koncentrace MMP-8 v plodové vodě u předčasně rodících žen s HCA v souvislosti se stupněm rozvoje zánětu. Za lehčí formu HCA byla považována samotná chorionitida (zánět chorionu), těžší formou HCA byla přidružená amnionitida (zánět amnionu). Ženy s amnionitidou měly zřetelně vyšší hladiny MMP-8 v plodové vodě než ženy pouze s chorionitidou a docházelo u nich s větší frekvencí k rozvoji funisitidy. Pokud byly funisitida i amnionitida přítomny, koncentrace MMP-8 v plodové vodě signifikantně vzrostla v porovnání se skupinou s funisitidou ale bez amnionitidy [229]. Styk plodu s vysokými koncentracemi MMP-8 spolu s nízkým gestačním stářím při porodu bývají asociovány s pozdějším rozvojem mozkové obrny [230].

Jiná studie zjišťovala dopad HCA a antenatální podání kortikoidů na hladinu MMP-8 v bronchoalveolární laváži (BAL) během prvního týdne života novorozenců (< 33. gestační týden), u kterých musela být použita umělá plicní ventilace. Závěry poukazují na výrazně zvýšenou koncentraci MMP-8 v BAL dětí žen s HCA a na určitou úlohu MMP-8 u syndromu dechové tísně novorozenců. Částečná ani kompletní dávka kortikosteroidů neměla vliv na koncentrace MMP-8 v BAL [231]. Přítomnost MMP-8 byla dále prozkoumána v hlenové zátce děložního krčku v různých stádiích těhotenství. Ukázalo se, že fyziologicky se MMP-8 spolu s MMP-9 vyskytují v okrajových částech hlenové zátky a mají nejspíše protektivní úlohu před ascendentním průnikem infekce. Pokud se MMP-8 a MMP-9 vyskytují napříč celou zátkou u žen předčasně rodících, může tento vzestup znamenat rozvoj IAI [232].

MMP jsou endoproteázy, které degradují ECM a bazální membrány buněk, aktivují/inaktivují některé cytokiny a enzymy a mají nejen zásadní vliv na počátek porodu, ale také se podílí na patogenezi preeklampsie, PPRM, chronického plicního onemocnění, nekrotizující enterokolitidy, intraventrikulární hemoragii nebo intrauterinní růstové restrikci [233]. Právě proto se studie zaměřují i na ostatní MMP, zejména MMP-2 a MMP-9 [234].

Ačkoliv produkce MMP-8 je mimo jiné indukována IL-8 a vyskytují se často společně jako cytokin-proteázová kaskáda u fyziologických i patologických stavů, v pupečnickové krvi nebyla nalezena korelace mezi těmito dvěma markery [235, 236]. Naopak velmi silná korelace v pupečnickové krvi byla objevena mezi MMP-8 a sCD163. Produkty aktivovaných makrofágů jako jsou IL-1 β a TNF- α stimulují neutrofilů k uvolňování MMP-8. Zároveň při aktivaci makrofágů dochází k četnějšímu odštěpování povrchového receptoru CD163 metaloproteázou. Bylo prokázáno, že přidáním inhibitoru metaloproteáz TIMP-3 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) do séra stimulovaného LPS, významně klesá koncentrace sCD163. MMP tak regulují odštěpování povrchových receptorů [237].

Nejsignifikantnější korelace byla objevena mezi IL-6 a IL-8 u pacientek s PPRM a s HCA i u pacientek s funisitidou. V recentní práci byla měřena koncentrace IL-6 a IL-8 v pupečnickové krvi u více jak 200 novorozenců a byla mezi nimi prokázána silná korelace [238]. Vzájemný vztah těchto dvou cytokinů při akutním i chronickém zánětu byl potvrzen i několika studiemi v různých kompartmentech lidského těla, například v orální sliznici po akutním zánětu, v maligním nádoru mozku

(astrocytom) nebo v seminální plasmě subfertálních mužů s podezřením na genitální infekci [239-241]. Oba prozánětové cytokiny jsou produkovány od počátku infekce/zánětu a potencují imunitní odpověď.

IL-8 dále koreloval s sCD163 a s PTX3. Vzájemný vztah mezi IL-8 a PTX3 bude pravděpodobně z části souviset s aktivitou neutrofilů, jež oboje molekuly uvolňují. PTX3 je v neutrofilech lokalizován uvnitř specializovaných granulí a je součástí tzv. neutrofilních extracelulárních pastí (Neutrophil Extracellular Traps NETs) tvořených z DNA a histonů. Ty slouží jako místo likvidace patogenů, ve kterých je antimikrobiální činnost uplatňována kationickými proteiny (defensiny, katelicidin, azurocidin), elastázou aj. [242]. Bylo dokázáno, že PTX3 je *in vitro* uvolňován z NETs po aktivaci exprese receptoru CXCR2, na nějž se váže IL-8 [136, 243]. PTX3 i IL-8 jsou však produkovány mnoha dalšími typy buněk. Například IL-8 syntetizovaly po aktivaci endotelové buňky izolované z pupečnickové žíly. Endotel je zároveň schopen uvolňovat do okolí PTX3 a tím podporovat součinnost mezi IL-8 a PTX3 [244]. IL-8 produkují dále monocyty a makrofágy, které zároveň odštěpují vychytávací receptor sCD163. Při jejich aktivaci zejména přes TLR dochází k oběma prozánětovým procesům [123, 245].

Korelace mezi IL-6 a sCD163 není překvapující, pokud zohledníme výsledky předešlé studie, která odhalila významné navýšení exprese CD163 po expozici makrofágů/monocytů IL-6 [120]. V periferní krvi u pacientů s bakteriemií byl také prokázán vzájemný vztah IL-6 a sCD163 [175].

Většina korelací byla zjištěna u molekul stanovených v pupečnickové krvi u žen s PPRM a s HCA. U žen s potvrzenou funisitidou byly korelace objeveny mezi IL-6 a IL-8 a mezi MMP-8 a sCD163. To s největší pravděpodobností mohlo nastat z důvodu menšího počtu pacientek s funisitidou.

Při závažném průběhu zánětu může být pokles v produkci prozánětových markerů způsoben vyčerpáním imunitního systému plodu. Novorozenci, kteří byli narozeni předčasně a zároveň exponováni zánětu, po porodu vykazovali známky imunoparalýzy. Jejich monocyty exprimovaly MHC gp II se sníženou denzitou a při stimulaci plné krve LPS byla produkce TNF- α signifikantně snížena v porovnání se zdravými novorozenci. K návratu hodnot do normálních mezí došlo po 7 dnech. Během této doby jsou novorozenci velmi náchylní k rozvoji sepse [246].

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

Pokud bychom chtěli naměřené koncentrace markerů v pupečnickové krvi aplikovat při diagnostice HCA a funisitidy, musí jejich AUC dosáhnout minimálně 75 %. U IL-6 a sCD163 nebylo této hranice dosaženo pro stanovení HCA a proto jej nelze v klinické praxi použít. Skupině Tasci a kol. se podařilo u IL-6 dosáhnout větší senzitivity a specifity pro diagnózu HCA (hraniční bod > 29 pg/ml, senzitivita 74 %, specifita 77 % vs. naše výsledky: hraniční bod > 6.8 pg/ml, senzitivita 63 %, specifita 70 %) [204].

Pro stanovení funisitidy z koncentrace markerů v pupečnickové krvi byla AUC vypočítána nad 75 % u IL-6, IL-8 a sCD163. Nejlepších prediktivních výsledků bylo dosaženo u IL-6, kde hraniční koncentrace pro stanovení funisitidy byla vypočítána na > 13.9 pg/ml (senzitivita 92 %, specifita 77 %). Yoon a kol. stanovili hraniční bod pro diagnózu funisitidy na ≥ 17.5 pg/mL (senzitivita 70 %, specifita 78 %) [247]. Zatímco Tasci a kol. určili mezní koncentraci > 39 pg/mL (senzitivita 100 %, specifita 81 %) [204]. Lewis a kol. všeobecně pro stanovení IAI a neonatální infekce stanovili hodnotu IL-6 > 11 pg/ml (senzitivita 81 %, specifita 76 %) [248].

Také další prozáněťový cytokin IL-8 lze využít při stanovení funisitidy z pupečnickové krve u žen s PPRM. Hraniční koncentrací pro diagnózu funisitidy byla v této práci vypočítána na > 92.5 pg/mL (senzitivita 77 %, specifita 80 %). Již dříve byl IL-8 zkoumán jako molekula vhodná k predikci IAI. Santana a kol. stanovili hodnotu IL-8 v pupečnickové krvi vhodnou pro stanovení IAI a časné bakteriální neonatální infekce na > 111.7 pg/mL (senzitivita 78 %, specifita 91 %), což jsou výsledky obdobné našim [249]. V plodové vodě byla zjištěna optimální hraniční koncentrace pro diagnózu HCA > 1561 pg/mL (senzitivita 67 %, specifita 74 %) [165]. V cervikovaginálním hlenu byla mezní koncentrací IL-8 pro diagnózu HCA > 10 ng/mL (senzitivita 100 %, specifita 67 %), tedy více jak stonásobně vyšší než v pupečnickové krvi [166].

Za velký přínos této práce považujeme objevení molekuly sCD163 jako potenciálního markeru funisitidy v pupečnickové krvi. Jelikož tento solubilní protein nebyl dříve nikdy zkoumán v souvislosti s HCA a funisitidou, není možno naše výsledky porovnat s jinými. Mezní koncentrací sCD163 v pupečnickové krvi pro diagnostiku funisitidy byla ustanovena na > 1462.0 ng/mL (senzitivita 85 %, specificita 70 %). Naše skupina zkoumala tento marker také v plodové vodě v souvislosti s HCA a funisitidou. Pro diagnózu HCA byla v plodové vodě ustanovena hraniční hladina > 380 ng/mL (senzitivita 71 %, specificita 65 %), pro diagnózu funisitidy > 735 ng/mL (senzitivita 83 %, specificita 89 %) [131]. Pro srovnání lze ještě zmínit práci Møller a kol., kteří zkoumali hladiny sCD163 v periferní krvi ve vztahu k pneumokokové bakteriémii u dospělých. Koncentrace sCD163 byly při této zánětové komplikaci signifikantně zvýšené a jako hraniční bod pro fatální důsledky bakteriémie byla stanovena koncentrace > 9500 ng/mL [126].

6. Závěr

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

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

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

Cíle disertační práce považujeme za splněné.

7. Použitá literatura

1. Qi, Y., Li, R.M., Kong, F.M., et al., *How do tumor stem cells actively escape from host immunosurveillance?* Biochem Biophys Res Commun, 2012, vol. 420, no. 4, s. 699-703.
2. Hořejší, V., Bartůňková, J., *Základy imunologie*. 4. vydání ed. 2009, TRITON. s. 23-25.
3. Triantafilou, K. and Triantafilou, M., *Visualising PAMP-PRR interactions using nanoscale imaging*. Methods Mol Biol, 2012, vol. 799, no., s. 253-66.
4. Zhong, J. and Kyriakis, J.M., *Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release*. J Biol Chem, 2007, vol. 282, no. 33, s. 24246-54.
5. Castellheim, A., Brekke, O.L., Espevik, T., et al., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis*. Scand J Immunol, 2009, vol. 69, no. 6, s. 479-91.
6. Nakayama, T., Sonoda, S., Urano, T., et al., *Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases*. Clin Chem, 1993, vol. 39, no. 2, s. 293-7.
7. Wink, D.A., Hines, H.B., Cheng, R.Y., et al., *Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response*. J Leukoc Biol, 2011, vol. 89, no. 6, s. 873-91.
8. Vidal, S.M., Khakoo, S.I., and Biron, C.A., *Natural killer cell responses during viral infections: flexibility and conditioning of innate immunity by experience*. Curr Opin Virol, 2011, vol. 1, no. 6, s. 497-512.
9. Lee, S.H. and Biron, C.A., *Here today--not gone tomorrow: roles for activating receptors in sustaining NK cells during viral infections*. Eur J Immunol, 2010, vol. 40, no. 4, s. 923-32.
10. Carroll, M.C. and Isenman, D.E., *Regulation of humoral immunity by complement*. Immunity, 2012, vol. 37, no. 2, s. 199-207.

11. Richani, K., Soto, E., Romero, R., et al., *Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2005, vol. 17, no. 4, s. 239-45.
12. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A., *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. Annu Rev Immunol, 2006, vol. 24, no., s. 419-66.
13. Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A., *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses*. Immunity, 2003, vol. 19, no. 5, s. 641-4.
14. Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001, vol. 19, no., s. 23-45.
15. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., et al., *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell Res, 2006, vol. 16, no. 1, s. 3-10.
16. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006, vol. 24, no. 2, s. 179-89.
17. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001, vol. 182, no., s. 207-14.
18. Zhang, N. and Bevan, M.J., *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system*. Immunity, 2011, vol. 35, no. 2, s. 161-8.
19. Osol, G. and Mandala, M., *Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy*. Physiology (Bethesda), 2009, vol. 24, no., s. 58-71.
20. Carter, A.M., *Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses*. Physiol Rev, 2012, vol. 92, no. 4, s. 1543-76.
21. Turner, R.J. and Carroll, B.A., *Ultrasound appearance of decidual reaction in the uterus during normal pregnancy*. AJR Am J Roentgenol, 1979, vol. 133, no. 3, s. 493-6.

22. Pijnenborg, R., Vercruyse, L., and Hanssens, M., *The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies*. Placenta, 2006, vol. 27, no. 9-10, s. 939-58.
23. Soares, M.J., Chakraborty, D., Renaud, S.J., et al., *Regulatory pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage*. J Reprod Dev, 2012, vol. 58, no. 3, s. 283-7.
24. Ferner, K. and Mess, A., *Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates*. Respir Physiol Neurobiol, 2011, vol. 178, no. 1, s. 39-50.
25. Cole, L.A., *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. Reprod Biol Endocrinol, 2010, vol. 8, no., s. 102.
26. Large, M.J. and DeMayo, F.J., *The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2012, vol. 358, no. 2, s. 155-65.
27. De Bonis, M., Torricelli, M., Severi, F.M., et al., *Neuroendocrine aspects of placenta and pregnancy*. Gynecol Endocrinol, 2012, vol. 28 Suppl 1, no., s. 22-6.
28. Desforges, M. and Sibley, C.P., *Placental nutrient supply and fetal growth*. Int J Dev Biol, 2010, vol. 54, no. 2-3, s. 377-90.
29. Ornoy, A. and Tenenbaum, A., *Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephalitis viruses*. Reprod Toxicol, 2006, vol. 21, no. 4, s. 446-57.
30. King, C.C., Ellington, S.R., and Kourtis, A.P., *The Role of Co-Infections in Mother-to-Child Transmission of HIV*. Curr HIV Res, 2013, vol. 11, no. 1, s. 10-23.
31. Mamede, A.C., Carvalho, M.J., Abrantes, A.M., et al., *Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications*. Cell Tissue Res, 2012, vol. 349, no. 2, s. 447-58.
32. Demir, R., Seval, Y., and Huppertz, B., *Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta*. Acta Histochem, 2007, vol. 109, no. 4, s. 257-65.

33. Lorenzi, T., Turi, A., Crescimanno, C., et al., *Syndecan expressions in the human amnion and chorionic plate*. Eur J Histochem, 2010, vol. 54, no. 4, s. e42.
34. Modena, A.B. and Fieni, S., *Amniotic fluid dynamics*. Acta Biomed, 2004, vol. 75 Suppl 1, no., s. 11-3.
35. Tsangaris, G.T., Kolialexi, A., Karamessinis, P.M., et al., *The normal human amniotic fluid supernatant proteome*. In Vivo, 2006, vol. 20, no. 4, s. 479-90.
36. Phermthai, T., Odglun, Y., Julavijitphong, S., et al., *A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes*. BMC Cell Biol, 2010, vol. 11, no., s. 79.
37. Romero, R., Gomez, R., Chaiworapongsa, T., et al., *The role of infection in preterm labour and delivery*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2001, vol. 15 Suppl 2, no., s. 41-56.
38. Sadler, T.W., *Langmanova lékařské embryologie*. 2011, Grada. s. p. 117.
39. Vacek, Z., *Embryologie*. 2006, Grada. s. 67-68.
40. Chao, Y.H., Wu, H.P., Chan, C.K., et al., *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell transplantation*. J Biomed Biotechnol, 2012, vol. 2012, no., s. 759503.
41. Krejsek, J., Kopecký, O. , *Klinická imunologie*. 2004, NUCLEUS HK. s. 343-346.
42. Hannan, N.J., Jones, R.L., White, C.A., et al., *The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the fetomaternal interface*. Biol Reprod, 2006, vol. 74, no. 5, s. 896-904.
43. Granot, I., Gnainsky, Y., and Dekel, N., *Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome*. Reproduction, 2012, vol. 144, no. 6, s. 661-8.
44. White, C.A., Dimitriadis, E., Sharkey, A.M., et al., *Interleukin 1 beta is induced by interleukin 11 during decidualization of human endometrial stromal cells, but is not released in a bioactive form*. J Reprod Immunol, 2007, vol. 73, no. 1, s. 28-38.

45. Cork, B.A., Tuckerman, E.M., Li, T.C., et al., *Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro*. Mol Hum Reprod, 2002, vol. 8, no. 9, s. 841-8.
46. Dominguez, F., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., et al., *Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?* FASEB J, 2005, vol. 19, no. 9, s. 1056-60.
47. Abrahams, V.M., Kim, Y.M., Straszewski, S.L., et al., *Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2004, vol. 51, no. 4, s. 275-82.
48. Otun, H.A., Lash, G.E., Innes, B.A., et al., *Effect of tumour necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion*. J Reprod Immunol, 2011, vol. 88, no. 1, s. 1-11.
49. Trundley, A. and Moffett, A., *Human uterine leukocytes and pregnancy*. Tissue Antigens, 2004, vol. 63, no. 1, s. 1-12.
50. Male, V., Gardner, L., and Moffett, A., *Isolation of cells from the feto-maternal interface*. Curr Protoc Immunol, 2012, vol. Chapter 7, no., s. Unit 7 40 1-11.
51. Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., et al., *CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells*. Blood, 2003, vol. 102, no. 5, s. 1569-77.
52. Male, V., Hughes, T., McClory, S., et al., *Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa*. J Immunol, 2010, vol. 185, no. 7, s. 3913-8.
53. Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., et al., *Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*. Nat Med, 2006, vol. 12, no. 9, s. 1065-74.
54. Krey, G., Frank, P., Shaikly, V., et al., *In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice*. J Mol Med (Berl), 2008, vol. 86, no. 9, s. 999-1011.

55. Blois, S.M., Klapp, B.F., and Barrientos, G., *Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells*. J Reprod Immunol, 2011, vol. 88, no. 2, s. 86-92.
56. Denny, K.J., Woodruff, T.M., Taylor, S.M., et al., *Complement in pregnancy: a delicate balance*. Am J Reprod Immunol, 2013, vol. 69, no. 1, s. 3-11.
57. Kayisli, U.A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., et al., *Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system*. J Immunol, 2003, vol. 171, no. 5, s. 2305-13.
58. Aschkenazi, S., Straszewski, S., Verwer, K.M., et al., *Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells*. Biol Reprod, 2002, vol. 66, no. 6, s. 1853-61.
59. Lettau, M., Paulsen, M., Schmidt, H., et al., *Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology*. Eur J Cell Biol, 2011, vol. 90, no. 6-7, s. 456-66.
60. Male, V., Sharkey, A., Masters, L., et al., *The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire*. Eur J Immunol, 2011, vol. 41, no. 10, s. 3017-27.
61. Rizzo, R., Vercammen, M., van de Velde, H., et al., *The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2011, vol. 68, no. 3, s. 341-52.
62. de Moraes-Pinto, M.I., Vince, G.S., Flanagan, B.F., et al., *Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes*. Immunology, 1997, vol. 90, no. 1, s. 87-94.
63. Liu, F., Guo, J., Tian, T., et al., *Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface*. APMIS, 2011, vol. 119, no. 9, s. 597-604.
64. Fan, D.X., Duan, J., Li, M.Q., et al., *The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy*. Clin Immunol, 2011, vol. 141, no. 3, s. 284-92.
65. Miyaura, H. and Iwata, M., *Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids*. J Immunol, 2002, vol. 168, no. 3, s. 1087-94.

66. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y., *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003, vol. 4, no. 4, s. 330-6.
67. Schumacher, A., Brachwitz, N., Sohr, S., et al., *Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy*. J Immunol, 2009, vol. 182, no. 9, s. 5488-97.
68. Ramhorst, R., Fraccaroli, L., Aldo, P., et al., *Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells*. Am J Reprod Immunol, 2012, vol. 67, no. 1, s. 17-27.
69. Winger, E.E. and Reed, J.L., *Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure*. Am J Reprod Immunol, 2011, vol. 66, no. 4, s. 320-8.
70. Osman, I., Young, A., Ledingham, M.A., et al., *Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term*. Mol Hum Reprod, 2003, vol. 9, no. 1, s. 41-5.
71. Bowen, J.M., Chamley, L., Keelan, J.A., et al., *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition*. Placenta, 2002, vol. 23, no. 4, s. 257-73.
72. Allport, V.C., Pieber, D., Slater, D.M., et al., *Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'*. Mol Hum Reprod, 2001, vol. 7, no. 6, s. 581-6.
73. Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., et al., *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. Lancet, 2012, vol. 379, no. 9832, s. 2162-72.
74. Menon, R., Yu, J., Basanta-Henry, P., et al., *Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes*. PLoS One, 2012, vol. 7, no. 2, s. e31136.

75. Auger, N., Le, T.U., Park, A.L., et al., *Association between maternal comorbidity and preterm birth by severity and clinical subtype: retrospective cohort study*. BMC Pregnancy Childbirth, 2011, vol. 11, no., s. 67.
76. Goldenberg, R.L. and Culhane, J.F., *Infection as a cause of preterm birth*. Clin Perinatol, 2003, vol. 30, no. 4, s. 677-700.
77. DiGiulio, D.B., *Diversity of microbes in amniotic fluid*. Semin Fetal Neonatal Med, 2012, vol. 17, no. 1, s. 2-11.
78. Romero, R., Espinoza, J., Goncalves, L.F., et al., *The role of inflammation and infection in preterm birth*. Semin Reprod Med, 2007, vol. 25, no. 1, s. 21-39.
79. Smith, R., *Parturition*. N Engl J Med, 2007, vol. 356, no. 3, s. 271-83.
80. Menon, R., Taylor, R.N., and Fortunato, S.J., *Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome*. Placenta, 2010, vol. 31, no. 2, s. 113-20.
81. Tita, A.T. and Andrews, W.W., *Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis*. Clin Perinatol, 2010, vol. 37, no. 2, s. 339-54.
82. Salafia, C.M., Weigl, C., and Silberman, L., *The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies*. Obstet Gynecol, 1989, vol. 73, no. 3 Pt 1, s. 383-9.
83. Thomas, W. and Speer, C.P., *Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome?* Neonatology, 2011, vol. 99, no. 3, s. 177-87.
84. Kacerovsky, M., Drahosova, M., Hornychova, H., et al., *[Amniotic fluid interleukin 6 levels in preterm premature rupture of membranes]*. Ceska Gynekol, 2009, vol. 74, no. 6, s. 403-10.
85. Marconi, C., de Andrade Ramos, B.R., Peracoli, J.C., et al., *Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor*. Am J Reprod Immunol, 2011, vol. 65, no. 6, s. 549-56.

86. Lockwood, C.J., Arcuri, F., Toti, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulate interleukin-8 expression in third trimester decidual cells: implications for the genesis of chorioamnionitis*. Am J Pathol, 2006, vol. 169, no. 4, s. 1294-302.
87. Weiss, A., Goldman, S., and Shalev, E., *The matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidua and fetal membranes*. Front Biosci, 2007, vol. 12, no., s. 649-59.
88. Arntzen, K.J., Kjollesdal, A.M., Halgunset, J., et al., *TNF, IL-1, IL-6, IL-8 and soluble TNF receptors in relation to chorioamnionitis and premature labor*. J Perinat Med, 1998, vol. 26, no. 1, s. 17-26.
89. Girard, S., Kadhim, H., Roy, M., et al., *Role of perinatal inflammation in cerebral palsy*. Pediatr Neurol, 2009, vol. 40, no. 3, s. 168-74.
90. Dessardo, N.S., Mustac, E., Dessardo, S., et al., *Chorioamnionitis and chronic lung disease of prematurity: a path analysis of causality*. Am J Perinatol, 2012, vol. 29, no. 2, s. 133-40.
91. Mestan, K., Yu, Y., Thorsen, P., et al., *Cord blood biomarkers of the fetal inflammatory response*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2009, vol. 22, no. 5, s. 379-87.
92. Satar, M., Turhan, E., Yapicioglu, H., et al., *Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture of membranes and its relationship with morbidity and mortality*. Eur Cytokine Netw, 2008, vol. 19, no. 1, s. 37-41.
93. Juretschke, L.J., *Apgar scoring: its use and meaning for today's newborn*. Neonatal Netw, 2000, vol. 19, no. 1, s. 17-9.
94. Lee, S.E., Romero, R., Kim, C.J., et al., *Funisitis in term pregnancy is associated with microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2006, vol. 19, no. 11, s. 693-7.
95. Tagore, S. and Kwek, K., *Comparative analysis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), placental alpha-microglobulin-1 (PAMG-1) and nitrazine test to diagnose premature rupture of membranes in pregnancy*. J Perinat Med, 2010, vol. 38, no. 6, s. 609-12.

96. Rumbold, A., Kruske, S., Boyle, J., et al., *Can the fetal fibronectin test be used by remote dwelling pregnant women to predict the onset of labour at term and delay transfer for birth in regional settings?* Rural Remote Health, 2013, vol. 13, no. 1, s. 2126.
97. Jobe, A.H., *Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung.* Semin Neonatol, 2001, vol. 6, no. 4, s. 331-42.
98. Sayres, W.G., Jr., *Preterm labor.* Am Fam Physician, 2010, vol. 81, no. 4, s. 477-84.
99. Koucky, M., Germanova, A., Hajek, Z., et al., *Prenatal and perinatal management of preterm labour.* Prague Med Rep, 2009, vol. 110, no. 4, s. 269-77.
100. Dostupné z <<http://www.nih.gov/>>.
101. Kimbrell, D.A. and Beutler, B., *The evolution and genetics of innate immunity.* Nat Rev Genet, 2001, vol. 2, no. 4, s. 256-67.
102. Murphy, J.E., Tedbury, P.R., Homer-Vanniasinkam, S., et al., *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors.* Atherosclerosis, 2005, vol. 182, no. 1, s. 1-15.
103. Krishnaswamy, J.K., Chu, T., and Eisenbarth, S.C., *Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells.* Trends Immunol, 2013, no., s.
104. Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm.* Annu Rev Immunol, 2010, vol. 28, no., s. 157-83.
105. Terai, K. and Mochizuki, N., *Heat shock proteins regulates cardiomyocytes via Toll-like receptors.* Circ J, 2011, vol. 75, no. 10, s. 2322-3.
106. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 1996, vol. 86, no. 6, s. 973-83.
107. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature, 1997, vol. 388, no. 6640, s. 394-7.

108. Takeda, K. and Akira, S., *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005, vol. 17, no. 1, s. 1-14.
109. Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., et al., *Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses*. Nat Rev Immunol, 2005, vol. 5, no. 6, s. 446-58.
110. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O., *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006, vol. 124, no. 4, s. 783-801.
111. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., et al., *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. J Immunol, 2002, vol. 169, no. 1, s. 10-4.
112. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., et al., *Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6*. Int Immunol, 2001, vol. 13, no. 7, s. 933-40.
113. Srinivasan, M., Kodumudi, K.N., and Zunt, S.L., *Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome*. Clin Immunol, 2008, vol. 126, no. 1, s. 31-7.
114. LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., et al., *Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk*. J Immunol, 2003, vol. 171, no. 12, s. 6680-9.
115. Dulay, A.T., Buhimschi, C.S., Zhao, G., et al., *Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection*. J Immunol, 2009, vol. 182, no. 11, s. 7244-53.
116. Wypych, J., Bennett, L.G., Schwartz, M.G., et al., *Soluble kit receptor in human serum*. Blood, 1995, vol. 85, no. 1, s. 66-73.
117. Raby, A.C., Le Bouder, E., Colmont, C., et al., *Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering*. J Immunol, 2009, vol. 183, no. 1, s. 506-17.
118. Andrys, C., Kacerovsky, M., Drahosova, M., et al., *Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, vol. 26, no. 5, s. 520-7.

119. Sarrias, M.R., Gronlund, J., Padilla, O., et al., *The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. Crit Rev Immunol, 2004, vol. 24, no. 1, s. 1-37.
120. Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000, vol. 67, no. 1, s. 97-103.
121. Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., et al., *IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells*. Blood, 2006, vol. 107, no. 12, s. 4930-7.
122. Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature, 2001, vol. 409, no. 6817, s. 198-201.
123. Weaver, L.K., Hintz-Goldstein, K.A., Pioli, P.A., et al., *Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163*. J Leukoc Biol, 2006, vol. 80, no. 1, s. 26-35.
124. Hintz, K.A., Rassias, A.J., Wardwell, K., et al., *Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163*. J Leukoc Biol, 2002, vol. 72, no. 4, s. 711-7.
125. Moller, H.J., *Soluble CD163*. Scand J Clin Lab Invest, 2012, vol. 72, no. 1, s. 1-13.
126. Moller, H.J., Moestrup, S.K., Weis, N., et al., *Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163*. Crit Care Med, 2006, vol. 34, no. 10, s. 2561-6.
127. Moller, H.J., Peterslund, N.A., Graversen, J.H., et al., *Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma*. Blood, 2002, vol. 99, no. 1, s. 378-80.
128. Baeten, D., Moller, H.J., Delanghe, J., et al., *Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis*. Arthritis Rheum, 2004, vol. 50, no. 5, s. 1611-23.

129. Su, L., Feng, L., Liu, C., et al., *Diagnostic value of urine sCD163 levels for sepsis and relevant acute kidney injury: a prospective study*. BMC Nephrol, 2012, vol. 13, no., s. 123.
130. Galea, J., Cruickshank, G., Teeling, J.L., et al., *The intrathecal CD163-haptoglobin-hemoglobin scavenging system in subarachnoid hemorrhage*. J Neurochem, 2012, vol. 121, no. 5, s. 785-92.
131. Kacerovsky, M., Drahosova, M., Andrys, C., et al., *Amniotic fluid concentrations of soluble scavenger receptor for hemoglobin (sCD163) in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histologic chorioamnionitis*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, vol. 24, no. 8, s. 995-1001.
132. Mantovani, A., Garlanda, C., Doni, A., et al., *Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3*. J Clin Immunol, 2008, vol. 28, no. 1, s. 1-13.
133. Breviario, F., d'Aniello, E.M., Golay, J., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1992, vol. 267, no. 31, s. 22190-7.
134. Doni, A., Peri, G., Chieppa, M., et al., *Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells*. Eur J Immunol, 2003, vol. 33, no. 10, s. 2886-93.
135. Cieslik, P. and Hrycek, A., *Long pentraxin 3 (PTX3) in the light of its structure, mechanism of action and clinical implications*. Autoimmunity, 2012, vol. 45, no. 2, s. 119-28.
136. Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. J Exp Med, 2007, vol. 204, no. 4, s. 793-804.
137. Alles, V.V., Bottazzi, B., Peri, G., et al., *Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes*. Blood, 1994, vol. 84, no. 10, s. 3483-93.

138. Dong, Z., An, F., Wu, T., et al., *PTX3, a key component of innate immunity, is induced by SAA via FPRL1-mediated signaling in HAECs*. J Cell Biochem, 2011, vol. 112, no. 8, s. 2097-105.
139. Baruah, P., Dumitriu, I.E., Peri, G., et al., *The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2006, vol. 80, no. 1, s. 87-95.
140. Cotena, A., Maina, V., Sironi, M., et al., *Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3*. J Immunol, 2007, vol. 179, no. 9, s. 6311-7.
141. Ievoli, E., Lindstedt, R., Inforzato, A., et al., *Implication of the oligomeric state of the N-terminal PTX3 domain in cumulus matrix assembly*. Matrix Biol, 2011, vol. 30, no. 5-6, s. 330-7.
142. Cetin, I., Cozzi, V., Papageorghiou, A.T., et al., *First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2009, vol. 88, no. 7, s. 846-9.
143. Rovere-Querini, P., Antonacci, S., Dell'Antonio, G., et al., *Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia*. Obstet Gynecol, 2006, vol. 108, no. 1, s. 148-55.
144. Kacerovsky, M., Tosner, J., Drahosova, M., et al., *Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes*. Int J Gynaecol Obstet, 2010, vol. 108, no. 3, s. 203-6.
145. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., et al., *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 1995, vol. 86, no. 4, s. 1243-54.
146. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003, vol. 374, no. Pt 1, s. 1-20.
147. Akrouf, N., Sharshar, T., and Annane, D., *Mechanisms of brain signaling during sepsis*. Curr Neuropharmacol, 2009, vol. 7, no. 4, s. 296-301.

148. Cheung, W.Y., Simmons, C.A., and You, L., *Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion via osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression*. *Bone*, 2012, vol. 50, no. 1, s. 104-10.
149. Ishikawa, H., Tsuyama, N., Obata, M., et al., *Mitogenic signals initiated via interleukin-6 receptor complexes in cooperation with other transmembrane molecules in myelomas*. *J Clin Exp Hematop*, 2006, vol. 46, no. 2, s. 55-66.
150. Tuomela, S., Salo, V., Tripathi, S.K., et al., *Identification of early gene expression changes during human Th17 cell differentiation*. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 23, s. e151-60.
151. Md Yusof, M.Y. and Emery, P., *Targeting Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis*. *Drugs*, 2013, no., s.
152. Schumacher, A., Jacomella, V., Stussi, G., et al., *Castleman's disease and arterial thrombosis: result of excessively elevated interleukin-6 plasma level?* *Vasa*, 2012, vol. 41, no. 2, s. 145-8.
153. Dagvadorj, J., Naiki, Y., Tumurkhuu, G., et al., *Tumor necrosis factor- α augments lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) protein expression by preventing the degradation*. *Immunology*, 2010, vol. 129, no. 1, s. 97-104.
154. Sharkey, A.M., Dellow, K., Blayney, M., et al., *Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos*. *Biol Reprod*, 1995, vol. 53, no. 4, s. 974-81.
155. Lockwood, C.J., Murk, W.K., Kayisli, U.A., et al., *Regulation of interleukin-6 expression in human decidual cells and its potential role in chorioamnionitis*. *Am J Pathol*, 2010, vol. 177, no. 4, s. 1755-64.
156. Pavlov, O.V., Lalayan, D.V., and Sel'kov, S.A., *Spontaneous and LPS-induced secretion of cytokines by villous chorion tissue*. *Bull Exp Biol Med*, 2006, vol. 141, no. 6, s. 720-3.

157. Mano, Y., Shibata, K., Sumigama, S., et al., *Tocilizumab inhibits interleukin-6-mediated matrix metalloproteinase-2 and -9 secretions from human amnion cells in preterm premature rupture of membranes*. Gynecol Obstet Invest, 2009, vol. 68, no. 3, s. 145-53.
158. Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991, vol. 253, no. 5025, s. 1278-80.
159. Rot, A. and von Andrian, U.H., *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004, vol. 22, no., s. 891-928.
160. Brat, D.J., Bellail, A.C., and Van Meir, E.G., *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005, vol. 7, no. 2, s. 122-33.
161. Dixit, N. and Simon, S.I., *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. Front Immunol, 2012, vol. 3, no., s. 188.
162. Lira, S.A. and Furtado, G.C., *The biology of chemokines and their receptors*. Immunol Res, 2012, vol. 54, no. 1-3, s. 111-20.
163. International Union of Immunological Societies/World Health Organization Subcommittee on chemokine, n., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Leukoc Biol, 2001, vol. 70, no. 3, s. 465-6.
164. Zaga-Clavellina, V., Garcia-Lopez, G., Flores-Herrera, H., et al., *In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with Escherichia coli in human fetal membranes*. Reprod Biol Endocrinol, 2007, vol. 5, no., s. 46.
165. Kacerovsky, M., Drahosova, M., Hornychova, H., et al., *Value of amniotic fluid interleukin-8 for the prediction of histological chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes*. Neuro Endocrinol Lett, 2009, vol. 30, no. 6, s. 733-8.
166. Holst, R.M., Laurini, R., Jacobsson, B., et al., *Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: relationship to histological chorioamnionitis*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2007, vol. 20, no. 12, s. 885-93.

167. Murphy, G., *Tissue inhibitors of metalloproteinases*. Genome Biol, 2011, vol. 12, no. 11, s. 233.
168. Visse, R. and Nagase, H., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003, vol. 92, no. 8, s. 827-39.
169. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003, vol. 200, no. 4, s. 448-64.
170. Van Den Steen, P.E., Wuyts, A., Husson, S.J., et al., *Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities*. Eur J Biochem, 2003, vol. 270, no. 18, s. 3739-49.
171. Maymon, E., Romero, R., Pacora, P., et al., *Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection*. Am J Obstet Gynecol, 2000, vol. 183, no. 1, s. 94-9.
172. Houben, M.L., Nikkels, P.G., van Bleek, G.M., et al., *The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: a cross-sectional study*. PLoS One, 2009, vol. 4, no. 8, s. e6572.
173. Tutdibi, E., Hunecke, A., Lindner, U., et al., *Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor*. J Perinat Med, 2012, vol. 40, no. 5, s. 527-32.
174. Fabriek, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., et al., *The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria*. Blood, 2009, vol. 113, no. 4, s. 887-92.
175. Gaini, S., Pedersen, S.S., Koldkaer, O.G., et al., *New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis*. Clin Exp Immunol, 2008, vol. 151, no. 3, s. 423-31.

176. Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., et al., *Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery*. *Circ Res*, 2004, vol. 94, no. 1, s. 119-26.
177. Soares, M.P. and Bach, F.H., *Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential*. *Trends Mol Med*, 2009, vol. 15, no. 2, s. 50-8.
178. Vogel, I., Grove, J., Thorsen, P., et al., *Preterm delivery predicted by soluble CD163 and CRP in women with symptoms of preterm delivery*. *BJOG*, 2005, vol. 112, no. 6, s. 737-42.
179. Vogel, I., Goepfert, A.R., Moller, H.J., et al., *Early mid-trimester serum relaxin, soluble CD163, and cervical length in women at high risk for preterm delivery*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, vol. 195, no. 1, s. 208-14.
180. Tang, Z., Niven-Fairchild, T., Tadesse, S., et al., *Glucocorticoids enhance CD163 expression in placental Hofbauer cells*. *Endocrinology*, 2013, vol. 154, no. 1, s. 471-82.
181. Candia, E., Diaz-Jimenez, D., Langjahr, P., et al., *Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients*. *Immunobiology*, 2012, vol. 217, no. 6, s. 634-42.
182. Kim, Y.M., Romero, R., Chaiworapongsa, T., et al., *Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, vol. 191, no. 4, s. 1346-55.
183. Patni, S., Wynen, L.P., Seager, A.L., et al., *Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term*. *Biol Reprod*, 2009, vol. 80, no. 2, s. 243-8.
184. Hayati, A.R., Mohamed, A.E., and Tan, G.C., *An immunohistochemical study of Toll-like receptors 2 and 4 in placenta with and without infection*. *Malays J Pathol*, 2010, vol. 32, no. 1, s. 13-9.

185. Lopez, M.C., Palmer, B.E., and Lawrence, D.A., *Phenotypic differences between cord blood and adult peripheral blood*. Cytometry B Clin Cytom, 2009, vol. 76, no. 1, s. 37-46.
186. Liang, F., Huang, N., and Wang, B., [*Human toll like receptor gene expression in human pulmonary granule epithelial cells and umbilical vein endothelial cells*]. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2001, vol. 32, no. 4, s. 516-8.
187. Shen, C.M., Lin, S.C., Niu, D.M., et al., *Labour increases the surface expression of two Toll-like receptors in the cord blood monocytes of healthy term newborns*. Acta Paediatr, 2009, vol. 98, no. 6, s. 959-62.
188. Levy, O., *Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists*. J Endotoxin Res, 2005, vol. 11, no. 2, s. 113-6.
189. Caron, J.E., La Pine, T.R., Augustine, N.H., et al., *Multiplex analysis of toll-like receptor-stimulated neonatal cytokine response*. Neonatology, 2010, vol. 97, no. 3, s. 266-73.
190. Yektaei-Karin, E., Moshfegh, A., Lundahl, J., et al., *The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn*. Pediatr Allergy Immunol, 2007, vol. 18, no. 8, s. 643-51.
191. Weaver, L.K., Pioli, P.A., Wardwell, K., et al., *Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors*. J Leukoc Biol, 2007, vol. 81, no. 3, s. 663-71.
192. Cruciani, L., Romero, R., Vaisbuch, E., et al., *Pentraxin 3 in maternal circulation: an association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2010, vol. 23, no. 10, s. 1097-105.
193. Assi, F., Fruscio, R., Bonardi, C., et al., *Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery*. BJOG, 2007, vol. 114, no. 2, s. 143-7.

194. Cozzi, V., Garlanda, C., Nebuloni, M., et al., *PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR*. *Placenta*, 2012, vol. 33, no. 12, s. 1039-44.
195. Muller, B., Peri, G., Doni, A., et al., *Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients*. *Crit Care Med*, 2001, vol. 29, no. 7, s. 1404-7.
196. Peri, G., Introna, M., Corradi, D., et al., *PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans*. *Circulation*, 2000, vol. 102, no. 6, s. 636-41.
197. Sprong, T., Peri, G., Neeleman, C., et al., *Pentraxin 3 and C-reactive protein in severe meningococcal disease*. *Shock*, 2009, vol. 31, no. 1, s. 28-32.
198. Takata, S., Wada, H., Tamura, M., et al., *Kinetics of c-reactive protein (CRP) and serum amyloid A protein (SAA) in patients with community-acquired pneumonia (CAP), as presented with biologic half-life times*. *Biomarkers*, 2011, no., s.
199. Kumagai, K., Otsuki, Y., Ito, Y., et al., *Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour*. *Mol Hum Reprod*, 2001, vol. 7, no. 7, s. 681-9.
200. Doni, A., Michela, M., Bottazzi, B., et al., *Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma*. *J Leukoc Biol*, 2006, vol. 79, no. 4, s. 797-802.
201. Tse, D.B. and Young, B.K., *Co-ordinate expression of Th1/Th2 phenotypes in maternal and fetal blood: evidence for a transplacental nexus*. *J Perinat Med*, 2012, vol. 40, no. 2, s. 165-70.
202. Gotsch, F., Romero, R., Kusanovic, J.P., et al., *The fetal inflammatory response syndrome*. *Clin Obstet Gynecol*, 2007, vol. 50, no. 3, s. 652-83.
203. Pacora, P., Chaiworapongsa, T., Maymon, E., et al., *Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2002, vol. 11, no. 1, s. 18-25.

204. Tasci, Y., Dilbaz, B., Uzmez Onal, B., et al., *The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, vol. 128, no. 1-2, s. 34-9.
205. Kacerovsky, M., Cobo, T., Andrys, C., et al., *The fetal inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, no., s.
206. Athayde, N., Wang, J., Wang, X., et al., *Fetuses delivered following preterm prelabor rupture of the membranes are capable of stimulating a proinflammatory response in endothelial cells*. J Soc Gynecol Investig, 2005, vol. 12, no. 2, s. 118-22.
207. Tauscher, M.K., Berg, D., Brockmann, M., et al., *Association of histologic chorioamnionitis, increased levels of cord blood cytokines, and intracerebral hemorrhage in preterm neonates*. Biol Neonate, 2003, vol. 83, no. 3, s. 166-70.
208. Bashiri, A., Burstein, E., and Mazor, M., *Cerebral palsy and fetal inflammatory response syndrome: a review*. J Perinat Med, 2006, vol. 34, no. 1, s. 5-12.
209. Goepfert, A.R., Andrews, W.W., Carlo, W., et al., *Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity*. Am J Obstet Gynecol, 2004, vol. 191, no. 4, s. 1375-81.
210. Buhimschi, C.S., Dulay, A.T., Abdel-Razeq, S., et al., *Fetal inflammatory response in women with proteomic biomarkers characteristic of intra-amniotic inflammation and preterm birth*. BJOG, 2009, vol. 116, no. 2, s. 257-67.
211. Cobo, T., Kacerovsky, M., Palacio, M., et al., *A prediction model of histological chorioamnionitis and funisitis in preterm prelabor rupture of membranes: analyses of multiple proteins in the amniotic fluid*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, vol. 25, no. 10, s. 1995-2001.
212. Gulati, S., Bhatnagar, S., Raghunandan, C., et al., *Interleukin-6 as a predictor of subclinical chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes*. Am J Reprod Immunol, 2012, vol. 67, no. 3, s. 235-40.

213. Murtha, A.P., Sinclair, T., Hauser, E.R., et al., *Maternal serum cytokines in preterm premature rupture of membranes*. *Obstet Gynecol*, 2007, vol. 109, no. 1, s. 121-7.
214. Holst, R.M., Mattsby-Baltzer, I., Wennerholm, U.B., et al., *Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005, vol. 84, no. 6, s. 551-7.
215. Taylor, B.D., Holzman, C.B., Fichorova, R.N., et al., *Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery*. *Hum Reprod*, 2013, vol. 28, no. 4, s. 942-52.
216. Rauk, P.N., Friebe-Hoffmann, U., Winebrenner, L.D., et al., *Interleukin-6 up-regulates the oxytocin receptor in cultured uterine smooth muscle cells*. *Am J Reprod Immunol*, 2001, vol. 45, no. 3, s. 148-53.
217. Shimoya, K., Taniguchi, T., Matsuzaki, N., et al., *Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration*. *Hum Reprod*, 2000, vol. 15, no. 10, s. 2234-40.
218. Weissenbacher, T., Laubender, R.P., Witkin, S.S., et al., *Diagnostic biomarkers of pro-inflammatory immune-mediated preterm birth*. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, vol. 287, no. 4, s. 673-85.
219. Kim, Y.D., Kim, S.C., Choi, K.U., et al., *The relationship between amniotic and newborn gastric fluid inflammatory mediators*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, no., s.
220. Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., et al., *Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk*. *J Nutr*, 2011, vol. 141, no. 6, s. 1181-7.
221. D'Alquen, D., Kramer, B.W., Seidenspinner, S., et al., *Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis*. *Pediatr Res*, 2005, vol. 57, no. 2, s. 263-9.

222. Witt, A., Berger, A., Gruber, C.J., et al., *IL-8 concentrations in maternal serum, amniotic fluid and cord blood in relation to different pathogens within the amniotic cavity*. J Perinat Med, 2005, vol. 33, no. 1, s. 22-6.
223. Mellembakken, J.R., Aukrust, P., Hestdal, K., et al., *Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia*. Hypertension, 2001, vol. 38, no. 3, s. 394-8.
224. Fan, Y. and Yu, J.L., *Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis*. World J Pediatr, 2012, vol. 8, no. 2, s. 101-8.
225. Discacciati, M.G., Simoes, J.A., Silva, M.G., et al., *Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor*. Arch Gynecol Obstet, 2011, vol. 283, no. 3, s. 501-8.
226. Tatad, A.M., Nesin, M., Peoples, J., et al., *Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes*. Neonatology, 2008, vol. 94, no. 1, s. 8-15.
227. Mohamed, M.A., Cunningham-Rundles, S., Dean, C.R., et al., *Levels of pro-inflammatory cytokines produced from cord blood in-vitro are pathogen dependent and increased in comparison to adult controls*. Cytokine, 2007, vol. 39, no. 3, s. 171-7.
228. Kumar, P., Venners, S.A., Fu, L., et al., *Association of antenatal steroid use with cord blood immune biomarkers in preterm births*. Early Hum Dev, 2011, vol. 87, no. 8, s. 559-64.
229. Park, C.W., Moon, K.C., Park, J.S., et al., *The involvement of human amnion in histologic chorioamnionitis is an indicator that a fetal and an intra-amniotic inflammatory response is more likely and severe: clinical implications*. Placenta, 2009, vol. 30, no. 1, s. 56-61.
230. Moon, J.B., Kim, J.C., Yoon, B.H., et al., *Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 and the development of cerebral palsy*. J Perinat Med, 2002, vol. 30, no. 4, s. 301-6.

231. Curley, A.E., Sweet, D.G., MacMahon, K.J., et al., *Chorioamnionitis increases matrix metalloproteinase-8 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from preterm babies*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004, vol. 89, no. 1, s. F61-4.
232. Becher, N., Hein, M., Danielsen, C.C., et al., *Matrix metalloproteinases in the cervical mucus plug in relation to gestational age, plug compartment, and preterm labor*. Reprod Biol Endocrinol, 2010, vol. 8, no., s. 113.
233. Cockle, J.V., Gopichandran, N., Walker, J.J., et al., *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications*. Reprod Sci, 2007, vol. 14, no. 7, s. 629-45.
234. Xu, P., Alfaidy, N., and Challis, J.R., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor*. J Clin Endocrinol Metab, 2002, vol. 87, no. 3, s. 1353-61.
235. Kostamo, K., Sorsa, T., Leino, M., et al., *In vivo relationship between collagenase-2 and interleukin-8 but not tumour necrosis factor-alpha in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. Allergy, 2005, vol. 60, no. 10, s. 1275-9.
236. Peppin, G.J. and Weiss, S.J., *Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, vol. 83, no. 12, s. 4322-6.
237. Matsushita, N., Kashiwagi, M., Wait, R., et al., *Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3*. Clin Exp Immunol, 2002, vol. 130, no. 1, s. 156-61.
238. Takahashi, N., Uehara, R., Kobayashi, M., et al., *Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings*. Cytokine, 2010, vol. 49, no. 3, s. 331-7.
239. Wang, X.M., Hamza, M., Wu, T.X., et al., *Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain*. Pain, 2009, vol. 142, no. 3, s. 275-83.

240. Piperi, C., Samaras, V., Levidou, G., et al., *Prognostic significance of IL-8-STAT-3 pathway in astrocytomas: correlation with IL-6, VEGF and microvessel morphometry*. Cytokine, 2011, vol. 55, no. 3, s. 387-95.
241. Eggert-Kruse, W., Boit, R., Rohr, G., et al., *Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality*. Hum Reprod, 2001, vol. 16, no. 3, s. 517-28.
242. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004, vol. 303, no. 5663, s. 1532-5.
243. Savchenko, A.S., Inoue, A., Ohashi, R., et al., *Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils in vitro and in ulcerative colitis*. Pathol Int, 2011, vol. 61, no. 5, s. 290-7.
244. Ganguly, A., Zhang, H., Sharma, R., et al., *Isolation of human umbilical vein endothelial cells and their use in the study of neutrophil transmigration under flow conditions*. J Vis Exp, 2012, no. 66, s. e4032.
245. Zhang, C., Bai, N., Chang, A., et al., *ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes*. Cell Mol Immunol, 2013, vol. 10, no. 1, s. 84-94.
246. Azizia, M., Lloyd, J., Allen, M., et al., *Immune status in very preterm neonates*. Pediatrics, 2012, vol. 129, no. 4, s. e967-74.
247. Yoon, B.H., Romero, R., Park, J.S., et al., *The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis*. Am J Obstet Gynecol, 2000, vol. 183, no. 5, s. 1124-9.
248. Lewis, D.F., Barrilleaux, P.S., Wang, Y., et al., *Detection of interleukin-6 in maternal plasma predicts neonatal and infectious complications in preterm premature rupture of membranes*. Am J Perinatol, 2001, vol. 18, no. 7, s. 387-91.
249. Santana, C., Guindeo, M.C., Gonzalez, G., et al., *Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis*. Acta Paediatr, 2001, vol. 90, no. 10, s. 1176-81.

8. Přílohy

Tabulka 1A

Demografické a klinické charakteristiky pacientek s těhotenstvím komplikovaným předčasným odtokem plodové vody za přítomnosti nebo absence histologické chorioamnionitidy, u kterých byly stanoveny markery interleukin 6, interleukin 8, matrixová metaloproteáza 8, pentraxin 3 a solubilní forma vychytávacího receptoru CD163.

| | Přítomnost HCA (n=41) | Absence HCA (n=43) | <i>p</i> - hodnota |
|---|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Věk pacientek (roky) | 30.6 ± 6.4 | 30.7 ± 5.1 | 0.96 |
| Prvorodičky | 21 (51 %) | 27 (63 %) | 0.38 |
| Body mass index v těhotenství | 24.2 (19.3 – 27.8) | 22.5 (19.8 – 24.2) | 0.33 |
| Gestační stáří při přijetí (týdny+dny) | 31+6 (29+0 – 34+3) | 33+5 (31+4 – 35+0) | 0.07 |
| Gestační stáří při porodu (týdny + dny) | 32+1 (29+4 – 34+4) | 33+5 (31+7 – 35+1) | 0.07 |
| Kouření během těhotenství | 10 (24 %) | 8 (19 %) | 0.60 |
| Podání kortikosteroidů | 21 (51 %) | 20 (47 %) | 0.83 |
| Podání antibiotik | 37 (90 %) | 41 (95 %) | 0.43 |
| Indukce porodu | 16 (39 %) | 18 (42 %) | 0.83 |
| Spontánní porod | 27 (66 %) | 31 (72 %) | 0.64 |
| Porod císařským řezem | 15 (37 %) | 13 (30 %) | 0.64 |
| Porod kleštěmi | 1 (2 %) | 0 (0 %) | 0.49 |
| Interval PPRM - porod (hodiny) | 37 (21-70) | 21 (12-57) | 0.09 |
| Apgar skóre, 5 min. | 9 (8-9) | 9 (8-9) | 0.65 |
| Apgar skóre, 10 min. | 10 (9-10) | 10 (9-10) | 0.39 |
| Hmotnost novorozence (gramy) | 1840±671 | 2093±629 | 0.08 |
| MIAC | 18 (44 %) | 12 (28 %) | 0.17 |
| Přítomnost genitálních mykoplasmat v AF | 11 (27 %) | 8 (19 %) | 0.44 |

Tabulka 1B

Demografické a klinické charakteristiky pacientek s těhotenstvím komplikovaným předčasným odtokem plodové vody za přítomnosti nebo absence histologické chorioamnionitidy, u kterých byla stanovena solubilní forma Toll like receptoru 2.

| | Přítomnost HCA (n=61) | Absence HCA (n=25) | p - hodnota |
|---|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Věk pacientek (roky) | 32 ± 5.4 | 28.7 ± 3.6 | 0.008 |
| Prvorodičky | 31 (51 %) | 11 (44%) | 0.64 |
| Body mass index v těhotenství | 23.4 (21.1 – 26.3) | 21.6 (19.7 – 24.7) | 0.08 |
| Gestační stáří při přijetí (týdny+dny) | 32+2 (29+5 – 34+2) | 34+2 (33+6 – 35+5) | 0.0001 |
| Gestační stáří při porodu (týdny + dny) | 32+5 (30+0 – 34+3) | 35+0 (33+7 – 35+5) | 0.0001 |
| Kouření během těhotenství | 7 (11%) | 5 (20%) | 0.32 |
| Podání kortikosteroidů | 43 (70%) | 6 (24%) | 0.0001 |
| Podání antibiotik | 59 (97 %) | 25 (100 %) | 1.00 |
| Indukce porodu | 25 (41%) | 8 (32%) | 0.47 |
| Spontánní porod | 41 (67%) | 20 (80%) | 0.30 |
| Porod císařským řezem | 20 (33 %) | 4 (16 %) | 0.18 |
| Porod kleštěmi | 0 (0%) | 0 (0 %) | 1.00 |
| Interval PPRM - porod (hodiny) | 56 (26 – 80) | 16 (11 – 57) | 0.007 |
| Apgar skóre, 5 min. | 10 (9-10) | 10 (9-10) | 0.32 |
| Apgar skóre, 10 min. | 10 (9-10) | 10 (10-10) | 0.57 |
| Hmotnost novorozence (gramy) | 1810±583 | 2264±540 | 0.0001 |
| MIAC | 24 (39 %) | 7 (28 %) | 0.46 |
| Přítomnost genitálních mykoplasmat v AF | 9 (15 %) | 4 (16 %) | 1.00 |

Znaky byly hodnoceny parametrickým t-testem (uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka) nebo neparametrickým Wilcoxonovým testem (uvedeny jako medián [interkvartilový rozsah]) a Fisherovým exaktním testem (uvedeny jako počet [%]).

Vysvětlivky: AF – plodová voda; CRP – C reaktivní protein; HCA – histologická chorioamnionitida; MIAC – mikrobiální invaze amniální dutiny; PPROM – předčasný odtok plodové vody.

Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.

Tabulka 2A

Demografické a klinické charakteristiky pacientek s těhotenstvím komplikovaným předčasným odtokem plodové vody za přítomnosti nebo absence histologické chorioamnionitidy a přítomnosti funisitidy, u kterých byly stanoveny markery interleukin 6, interleukin 8, matrixová metaloproteáza 8, pentraxin 3 a solubilní forma vycytávacího receptoru CD163.

| | Přítomnost HCA ^a (n=28) | Absence HCA (n=43) | <i>p</i> - hodnota ¹ | Přítomnost funisitidy (n=13) | <i>p</i> - hodnota ² |
|---|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Věk pacientek (roky) | 31.7 ± 6.4 | 30.7 ± 5.1 | 0.45 | 28.2 ± 6.1 | 0.16 |
| Prvorodičky | 17 (61 %) | 27 (63 %) | 1.00 | 4 (31 %) | 0.06 |
| Body mass index v těhotenství | 25.1 (20.8 – 30.0) | 22.5 (19.8 – 24.2) | 0.05 | 19.4 (18.6 – 23.9) | 0.27 |
| Gestační stáří při přijetí (týdny+dny) | 33+3 (27+5 – 35+3) | 33+5 (31+4 – 35+0) | 0.40 | 29+5 (27+1 – 32+1) | 0.01 |
| Gestační stáří při porodu (týdny + dny) | 33+4 (30+6 – 34+5) | 33+5 (31+7 – 35+1) | 0.46 | 29+6 (27+5 – 32+2) | 0.007 |
| Kouření během těhotenství | 5 (18 %) | 8 (19 %) | 1.00 | 5 (38 %) | 0.15 |
| Podání kortikosteroidů | 13 (46 %) | 20 (47 %) | 1.00 | 8 (62 %) | 0.53 |
| Podání antibiotik | 26 (93 %) | 41 (95 %) | 0.64 | 11 (85 %) | 0.23 |
| Indukce porodu | 15 (54 %) | 18 (42 %) | 0.47 | 1 (8 %) | 0.04 |
| Spontánní porod | 20 (71 %) | 31 (72 %) | 1.00 | 7 (54 %) | 0.31 |
| Porod císařským řezem | 8 (29 %) | 13 (30 %) | 1.00 | 7 (54 %) | 0.19 |
| Porod kleštěmi | 1 (4 %) | 0 (0 %) | 0.39 | 0 (0 %) | 1.00 |
| Interval PPRM - porod (hodiny) | 35 (20-57) | 21 (12-57) | 0.26 | 54 (21-86) | 0.07 |
| Apgar skóre, 5 min. | 9 (9-9) | 9 (8-9) | 0.82 | 9 (8-9) | 0.55 |
| Apgar skóre, 10 min. | 10 (9-10) | 10 (9-10) | 0.83 | 9 (9-10) | 0.13 |
| Hmotnost novorozence (gramy) | 1980±693 | 2093±629 | 0.54 | 1507±493 | 0.003 |
| MIAC | 9 (32 %) | 12 (28 %) | 0.79 | 9 (69 %) | 0.01 |
| Přítomnost genitálních mykoplasmat v AF | 6 (21 %) | 8 (19 %) | 0.76 | 8 (62 %) | 0.15 |

Tabulka 2B

Demografické a klinické charakteristiky pacientek s těhotenstvím komplikovaným předčasným odtokem plodové vody za přítomnosti nebo absence histologické chorioamnionitidy a přítomnosti funisitidy, u kterých byla stanovena solubilní forma Toll like receptoru 2.

| | Přítomnost HCA^a (n=43) | Absence HCA (n=25) | p - hodnota¹ | Přítomnost funisitidy (n=18) | p - hodnota² |
|---|--|-------------------------------------|--|---|--|
| Věk pacientek (roky) | 32.0 ± 5.6 | 28.7 ± 3.6 | 0.01 | 31.7±5.2 | 0.03 |
| Prvorodičky | 22 (51 %) | 11 (44 %) | 0.62 | 9 (50 %) | 0.76 |
| Body mass index v těhotenství | 24.3 (21.4 – 26.7) | 21.6 (19.7 – 24.7) | 0.04 | 22.7 (20.2 – 25.0) | 0.67 |
| Gestační stáří při přijetí (týdny+dny) | 33+2 (31+2 – 34+7) | 34+2 (33+6 – 35+5) | 0.003 | 30+6 (26+3 – 31+4) | <0.0001 |
| Gestační stáří při porodu (týdny + dny) | 33+4 (31+5 – 35+1) | 35+0 (33+7 – 35+5) | 0.003 | 31+1 (26+5 – 32+0) | <0.0001 |
| Kouření během těhotenství | 4 (9 %) | 5 (20 %) | 0.27 | 2 (13 %) | 0.68 |
| Podání kortikosteroidů | 22 (51 %) | 6 (24 %) | 0.04 | 16 (89 %) | <0.0001 |
| Podání antibiotik | 42 (98 %) | 25 (100 %) | 1.00 | 17 (94 %) | 0.42 |
| Indukce porodu | 19 (44 %) | 8 (32 %) | 0.44 | 6 (33 %) | 1.00 |
| Spontánní porod | 31 (72 %) | 20 (80 %) | 0.57 | 10 (56 %) | 0.10 |
| Porod císařským řezem | 12 (28 %) | 4 (16 %) | 0.38 | 8 (44 %) | 0.08 |
| Porod kleštěmi | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 1.00 | 0 (0 %) | 1.00 |
| Interval PPRM - porod (hodiny) | 55 (24 – 77) | 16 (11 – 57) | 0.02 | 54 (21-86) | 0.01 |
| Apgar skóre, 5 min. | 10 (9 - 10) | 10 (9 - 10) | 0.70 | 9 (8-10) | 0.06 |
| Apgar skóre, 10 min. | 10 (9-10) | 10 (10 - 10) | 0.72 | 10 (9-10) | 0.43 |
| Hmotnost novorozence (gramy) | 1953±538 | 2264±540 | 0.02 | 1470±556 | <0.0001 |
| MIAC | 14 (33 %) | 7 (28 %) | 0.79 | 10 (56 %) | 0.11 |
| Přítomnost genitálních mykoplasmat v AF | 9 (21 %) | 4 (16 %) | 0.75 | 7 (39 %) | 0.16 |

Znaky byly hodnoceny parametrickým t-testem (uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka) nebo neparametrickým Wilcoxonovým testem (uvedeny jako medián [interkvartilový rozsah]) a Fisherovým exaktním testem (uvedeny jako počet [%]).

Vysvětlivky: AF – plodová voda; CRP – C reaktivní protein; HCA – histologická chorioamnionitida; HCA^a – skupina pacientek s potvrzenou HCA bez funisitidy; MIAC – mikrobiální invaze amniální dutiny; PPROM – předčasný odtok plodové vody.

¹*p* - hodnota : porovnání skupiny s přítomnou HCA (bez funisitidy) a skupinou bez HCA.

²*p* - hodnota : porovnání skupiny s přítomnou funisítidou a skupinou bez HCA.

Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.