

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
II. INTERNÍ KLINIKA

DIABETES A TĚHOTENSTVÍ
Disertační práce v oboru vnitřní lékařství

Školitel:
Prof. MUDr. Miroslav Souček CSc.

Autor:
MUDr. Petr Žák

Brno, 2019

Abstrakt

Úvod. Do rozvoje komplikací v těhotenství se zapojuje více patofyziologických mechanismů: endoteliální dysfunkce, zánětlivé metabolické dráhy a oxidativní stres. Cílem této práce bylo stanovení korelace mezi prozánětlivými cytokiny TNF- α , IL-6 a cytokinem s duální funkcí IL-10 v periferní krvi matky a krevním tlakem, rizikem rozvoje preeklampsie a nízkou porodní váhou u gestačního diabetu (GDM). **Metody.** Sledovali jsme 40 žen s GDM rozdělených do hypertenzní skupiny (n = 20) a referenční skupiny (n = 20) s normálními hodnotami krevního tlaku. **Výsledky.** Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi hladinami TNF- α ; IL-6; IL-10 v periferní krvi matky a systolickým krevním tlakem (SBP) v období druhého trimestru (p <0.001; p <0.001; p <0.001); ve třetím trimestru (p <0.001; p <0.001; p <0.05). Potvrdili jsme signifikantní korelaci pro diastolický krevní tlak (DBP) v období druhého; třetího trimestru (p <0.001; p <0.001; p <0.001); (p <0.001; p <0.001; p <0.0015). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci u skupiny high TNF- α pro riziko preeklampsie ve třetím trimestru (p = 0.04). Také jsme prokázali negativní korelace pro období druhého trimestru mezi porodní váhou a hladinami TNF- α ; IL-6, IL-10 (p <0.05; p <0.001; p <0.001). **Závěr.** Naše data prokazují význam hladin cytokinů TNF- α , IL-6 and IL-10 v regulaci krevního tlaku. Prokázali jsme, že vysoké hladiny TNF- α jsou asociovány se zvýšeným rizikem preeklampsie. Prokázali jsme dále statisticky významnou negativní korelaci mezi TNF- α , IL-6, IL-10 a porodní hmotností.

Klíčová slova Hypertenze – Preeklampsie – Interleukin 6 – Tumor necrosis faktor alpha – Nízká porodní hmotnost

Abstract

Background. Several pathophysiological mechanisms have been proposed in the development of pregnancy complications, including endothelial dysfunction, an inflammatory pathway and oxidative stress. The aim of the present study was to evaluate the correlation between proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and dual cytokine IL-10 in the mother's peripheral blood and blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes (GDM). **Methods.** We observed 40 women with GDM divided into a gestational hypertension group (n = 20) and reference group (n = 20) with normal blood pressure. **Results.** We found a significant positive correlation between TNF- α ; IL-6; IL-10 levels and systolic blood pressure (SBP) in the second trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.001); the third trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.05). We also proved correlations for diastolic blood pressure (DBP) during the second; third trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.001); (p <0.001; p <0.001; p <0.0015). We demonstrated a statistically significant positive association between high TNF- α group and preeclampsia risk in the third trimester (p = 0.04). We also determined the negative correlation in the second trimester between birth weight and TNF- α ; IL-6, IL-10 levels (p <0.05; p <0.001; p <0.001). **Conclusions.** Our data highlight the importance of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in blood pressure regulation. In addition high levels of TNF- α have been associated with increased risk of preeclampsia. We found a significant negative correlation between levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and birth weight

Keywords

Hypertension –Preeclampsia –Interleukin 6 –Tumor necrosis factor alpha –Low birth weight

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně pod vedením
prof. MUDr. Miroslava Součka CSc. s využitím zdrojů uvedených v soupisu literatury.

.....

podpis autora

Děkuji prof. MUDr. Miroslavu Součkovi CSc. za odborné vedení mé práce a za veškeré podnětné připomínky. Své manželce děkuji za podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

1.Úvod.....	7
1.1 Klasifikace diabetu.....	7
1.2 Diagnostická kritéria diabetu.....	8
1.2.1 Definice onemocnění.....	8
1.2.2 Rozhodovací meze.....	8
1.2.3 Vyšetření těhotenství.....	8
2. Problematika diabetu v době těhotenství.....	9
2.1 Diabetes v době těhotenství a riziko komplikací.....	9
2.2 Imunologické změny v graviditě.....	9
2.2.1 Reakce imunitního systému na přítomnost fetálních antigenů.....	9
2.2.2 Paradigma poměru Th1/Th2/Th3 imunitní reakce.....	10
2.2.3 Úloha makrofágů a NK buněk v graviditě.....	12
2.2.4 Cytokiny hrají v období těhotenství významnou úlohu v regulaci pro a protizánětlivé odpovědi.....	13
3.Komplikace gravidity a související imunologické změny.....	13
3.1. Předčasný porod.....	13
3.2 Poruchy růstu plodu.....	14
3.3. Gestační hypertenze.....	15
3.4 Preeklampsie.....	16
4.Co nám ukazují modely na zvířatech.....	18
4.1 Angiotensinem II indukovaná hypertenze... ..	18
4.2 Hormonální regulace produkovaných cytokinů, antiabortivní efekt inhibice NK buněk.....	18

5. Představuje biologická léčba cílená na cytokin TNF- α efektivní možnost ovlivnění předčasného porodu v budoucnu?.....	18
6. Cíl práce.....	19
7. Metodika	19
8. Statistika.....	21
9. Výsledky	22
10. Diskuze.....	23
11. Závěr.....	27
12. Literatura.....	28
13. Seznam zkratek.....	35
14. Tabulky a grafy	37
14.1 Tabulky.....	37
14.2 Grafy.....	42
15. Seznam tabulek.....	45
16. Seznam grafů a schémat.....	46
17. Přílohy.....	46
17.1 Originální práce s IF	46
17.2 Příloha č. 3: Publikace vztahující se k tématu disertace.....	69
18. Souhrn poznatků disertační práce.....	73

1. Úvod

1.1 Klasifikace onemocnění-Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP Česká diabetologická společnost ČLS JEP (konsenzus 2015)

Definice onemocnění: Diabetes mellitus je chronické heterogenní onemocnění provázené hyperglykemií v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu.

Klasifikace diabetes mellitus: Současná klasifikace zahrnuje čtyři skupiny diabetu a dvě skupiny označované jako hraniční poruchy glukózové homeostázy (Prediabetes)

Diabetes mellitus	Obvyklá zkratka
I. Diabetes mellitus 1. typu	DM1, včetně klinického průběhu LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)
A. imunitně podmíněný	pozitivní protilátky
B. Idiopatický	negativní protilátky
II. Diabetes mellitus 2. typu	DM2
III. Ostatní specifické typy diabetu	Monogenní diabetes-MODY; při chronickém onemocnění pankreatu; při imunosupresi, endokrinopatiích
IV. Gestační diabetes mellitus	
Prediabetes	
Zvýšená glykemie na lačno	IFG (impaired fasting glucose)
Porušená glukózová tolerance	IGT (Impaired glucose tolerance)
Kombinace obou poruch	IFG+IGT

Diagnóza diabetu je založena na průkazu hyperglykémie za stanovených podmínek. Přítomnost klinické symptomatologie je nekonstantní, a proto její chybění diagnózu diabetu nevylučuje. Diagnóza diabetu a prediabetu se určuje na základě měření glykémie ve venózní plazmě standardními laboratorními metodami. Podle doporučení ČDS (Česká diabetologická společnost), ČSKB (Česká společnost pro klinickou biochemii) a SVL (Společnost všeobecného lékařství) není vhodné diagnostikovat diabetes pomocí glukometru.

1.2 Diagnostická kritéria diabetu-Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP Česká diabetologická společnost ČLS JEP (konsenzus 2015)

1.2.1 Definice onemocnění

Diabetes je diagnostikován při kombinaci klinických symptomů s náhodným stanovením koncentrace glukózy v plazmě ≥ 11.1 mmol/l, při koncentraci glukózy v plazmě na lačno ≥ 7.0 mmol/l, nebo při koncentraci glukózy v plazmě při orálním glukózovém tolerančním testu ≥ 11.1 mmol/l.

K učinění závěru o diagnóze diabetu je nezbytné potvrdit výsledek opakovaným měřením z dalšího odběru v některém z příštích dnů.

Zvýšené riziko diabetu je charakterizováno hodnotami FPG v intervalu hodnot 5.6 -7.0 mmol/l. Tento stav je označován jako Impaired Fasting Glucose (IFG), zvýšená koncentrace glukózy nalačno, případně jako prediabetes. Vztahy mezi koncentrací glukózy v krvi (B-glukóza), plazmě (FPG) a séru (S-glukóza) $FPG = 1.11 \cdot B\text{-glukóza}$ jestliže je vzorek krve před analýzou ředěn hemolyzačním nebo deproteinačním činidlem $FPG = 0.94 \cdot B\text{-glukóza}$ jestliže je vzorek krve měřen bez ředění

Naprostá většina literárních dat považuje hodnoty koncentrací glukózy v plazmě a séru za rovnocenné. Doporučení WHO a ADA zmiňují pouze použití plazmy a vůbec nezmiňují krevní sérum.

1.2.2. Rozhodovací meze FPG [mmol/l]

Interpretace FPG: < 5.6 Vyloučení diabetu mellitu, 5.6 až 6,9 zvýšená FPG (IFG, zvýšená koncentrace glukózy nalačno), ≥ 7.0 diabetes mellitus (nutno potvrdit opakovaným měřením)

Protože hodnota intraindividuální biologické variability činí v průměru 5 %, je nezbytné provést diagnostický závěr na podkladě aspoň dvou výsledků nezávislých měření. Hodnoty FPG 5.6 mmol/l a vyšší by měly být vždy opakovány pro podezření z možného potvrzení diagnózy diabetu mellitu, respektive pacienti s takovými hodnotami by měli být vyšetřováni s vyšší frekvencí.

1.2.3 Vyšetření v těhotenství

U všech žen je doporučeno, co nejdříve na začátku těhotenství stanovit koncentraci glukózy nalačno v žilní plazmě standardní laboratorní metodou. Při hodnotě koncentrace glukózy nalačno ≥ 7.0 mmol/l (nebo $HbA_{1c} \geq 48$ mmol/mol) se jedná o zjevný diabetes mellitus (overt diabetes) v těhotenství. Gestační diabetes mellitus (GDM) je diagnostikován při opakovaném zjištění FPG v rozmezí 5.1-6.9 mmol/l. Diagnózu DM či GDM lze stanovit na základě stanovení FPG v případě 2 pozitivních nálezů (nelze stanovit týž den). V případě 1 pozitivního a 1 negativního nálezu je indikovaný orální glukózový toleranční test (oGTT).¹

2. Problematika diabetu v době těhotenství

2.1 Diabetes v době těhotenství a riziko komplikací

Problematiku diabetu v těhotenství můžeme rozdělit na pregestační diabetes (diabetes před graviditou) a diabetes manifestovaný v graviditě-gestační diabetes mellitus (GDM). Dle literárních údajů je asi 0,5- 2,0 % těhotných žen léčeno pro pregestační diabetes (PGD) a to většinou diabetes mellitus 1. typu (DM1T), méně často pro diabetes mellitus 2. typu (DM2T). Naprostá většina žen léčených pro diabetes v době těhotenství je léčena pro gestační diabetes mellitus (GDM).² Gestační diabetes mellitus (GDM) je porucha metabolismu glukózy různého stupně, která se objeví v těhotenství a spontánně odezní v průběhu šestinedělí. V těhotenství může být kromě GDM nově zachycen také tzv. zjevný diabetes mellitus (DM), který splňuje diagnostická kritéria diabetu platná pro všeobecnou populaci a zpravidla přetrvává i po šestinedělí. GDM v užším slova smyslu je definován jako diabetes zachycený ve II. až III. trimestru těhotenství u žen, u kterých nebyl přítomen zjevný diabetes před těhotenstvím. Diagnostická kritéria pro GDM byla oproti původní verzi z roku 2008 změněna a sjednocena podle doporučení mezinárodních organizací IADPSG (The International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups) a WHO.³ Incidence GDM celosvětově výrazně roste, zatímco v roce 1989-1990 činila 1.9 %, v období 2003-2004 již 4.2 % a v současnosti je odhadováno, že hodnota kolísá od 10 % do 17 % v závislosti na studované populaci.⁴ Ženy s GDM mají ve srovnání s ženami s normálními hodnotami glykemie v těhotenství zvýšené relativní riziko (RR): gestační hypertenze (pregnancy induced hypertension-PIH) 1.5; elektivního císařského řezu 1,1; rozvoje diabetu mellitu 2. typu (DM2T) ^{7,4} a rozvoje kardiovaskulárního (KV) onemocnění v budoucnu 2.2.⁵ GDM také významně ovlivňuje zdraví potomků, je příčinou významné fetální morbidity a mortality. U GDM nejen matka, ale také plod má zvýšenou glykémii na podkladě volného transportu glukózy přes placentu. Plod je nucen zvýšit svou produkci inzulínu. Hyperglykemie u matky je asociována se zvýšením RR předčasného porodu-pre term birth (PTB) a poranění při porodu: porod plodu většího, než by odpovídalo danému gestačnímu stáří [large for gestational age (LGA)] 5.0; zvýšení sdruženého rizika neonatální hypoglykemie, potřeby intenzivní péče, neonatální hyperbilirubinémie 2.2.⁶ V dospělosti jsou potomci matek s GDM ve zvýšeném riziku rozvoje obezity, poruchy glukózové tolerance, DM2T a KV onemocnění.⁷

2.2 Imunologické změny v graviditě

2.2.1 Reakce imunitního systému na přítomnost fetálních antigenů

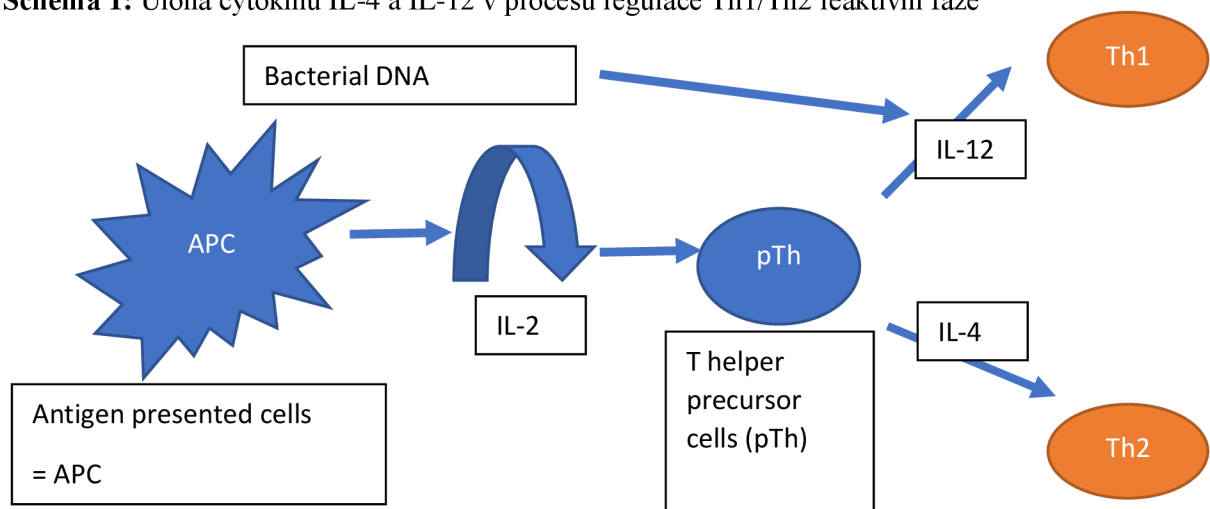
Již v periimplantační periodě embryo komunikuje s imunitním systémem matky pomocí progesterone-induced blocking factor (PIBF). PIBF se podílí na dominanci protektivní Th2 reaktivní fáze, která provází normální těhotenství a indukuje produkci cytokinů Th2 reakce. Vysoká exprese PIBF v deciduálních buňkách může být jednou z příčin nízké aktivity deciduálních natural killer (NK)

buňek.⁸ Již v roce 1980 bylo jednoznačně prokázáno, že rozpoznání fetálních antigenů a následná aktivace imunitního systému nejsou pro plod nebezpečné, ale přímo potřebné pro normální průběh gravidity. Na zvířecím modelu s použitím myšího kmene se sklonem k potratům byla prokázána možnost zachování gravidity pomocí nespecifické imunostimulace.⁹ V humánních studiích bylo prokázáno, že pokud mají partneři po HLA stránce podobné profily, mají výrazně zvýšené riziko abortu.¹⁰ Uvedená data ukazují, že rozpoznání fetálních antigenů imunitním systémem matky spouští rozsáhlou kaskádu procesů, které vytvoří příznivé imunologické prostředí pro embryo a následně i pro vyvíjející se plod.⁸

2.2.2 Paradigma poměru Th1/Th2/Th3 imunitní reakce

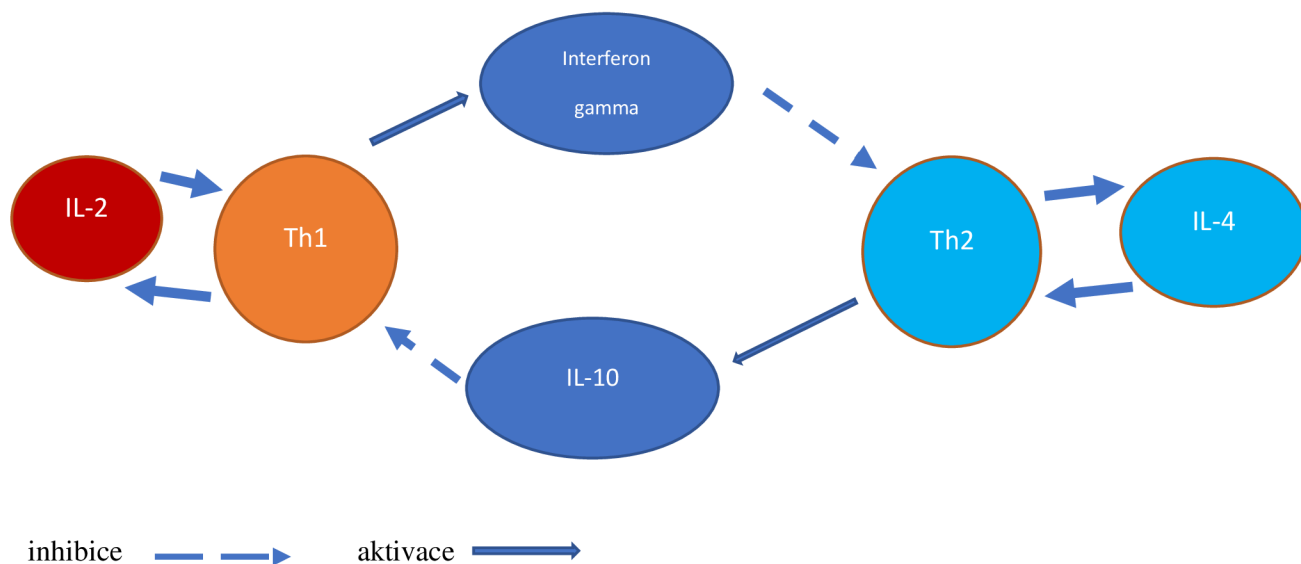
Nejdůležitější funkcí imunitního systému je ochrana organismu proti infekčním agens. Protože efektorový systém se musí účinně vypořádat s různými formami agrese cizorodých organismů, je nutné, aby přítomná regulace byla schopna rychle měnit převažující celkovou pro/protizánětlivou odpověď. Důležitou úlohu v celém procesu sehrávají antigen prezentující buňky (APC) a jednotlivé cytokiny (Schéma 1). Identifikace funkčního rozlišení T lymfocytů a definování Th1 a Th2 subpopulací, dle produkovaných cytokinů, nám umožnilo dosažení významného pokroku v porozumění procesu regulace. Th1 T lymfocyty produkují cytokiny Th1 fáze: [interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (IFN-g), tumor necrosis factor- α (TNF- α)], které jsou zapojeny do procesu zánětu mediovaneho monocyty a makrofágy. Th2 T lymfocyty produkují Th2 cytokiny [interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-10], které jsou zapojeny v produkci protilátek (včetně IgE odpovědi) a vedou k proliferaci mastocytů a eosinofilů. Antigen prezentujícími buňkami produkovaný cytokin IL-12 vede k diferenciaci naivních T lymfocytů k Th1 fenotypu, zatímco IL-4 produkovaný mastocyty, basofily a subpopulacemi CD4+ NK 1.1⁺ a/nebo CD4+ NK 1.1⁻ vede k odpovědi Th2 fáze. Diferenciace pomocných T lymfocytů do Th1 a Th2 subpopulace je regulována rovnováhou mezi hladinami jednotlivých cytokinů IL-2, IL-4 a IL-10 (Schéma 2).

Schéma 1: Úloha cytokinů IL-4 a IL-12 v procesu regulace Th1/Th2 reaktivní fáze



Převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467651>

Schéma 2: Cytokiny IL-2, IL-4 a IL-10 v procesu symetrické regulace Th1/Th2 fáze

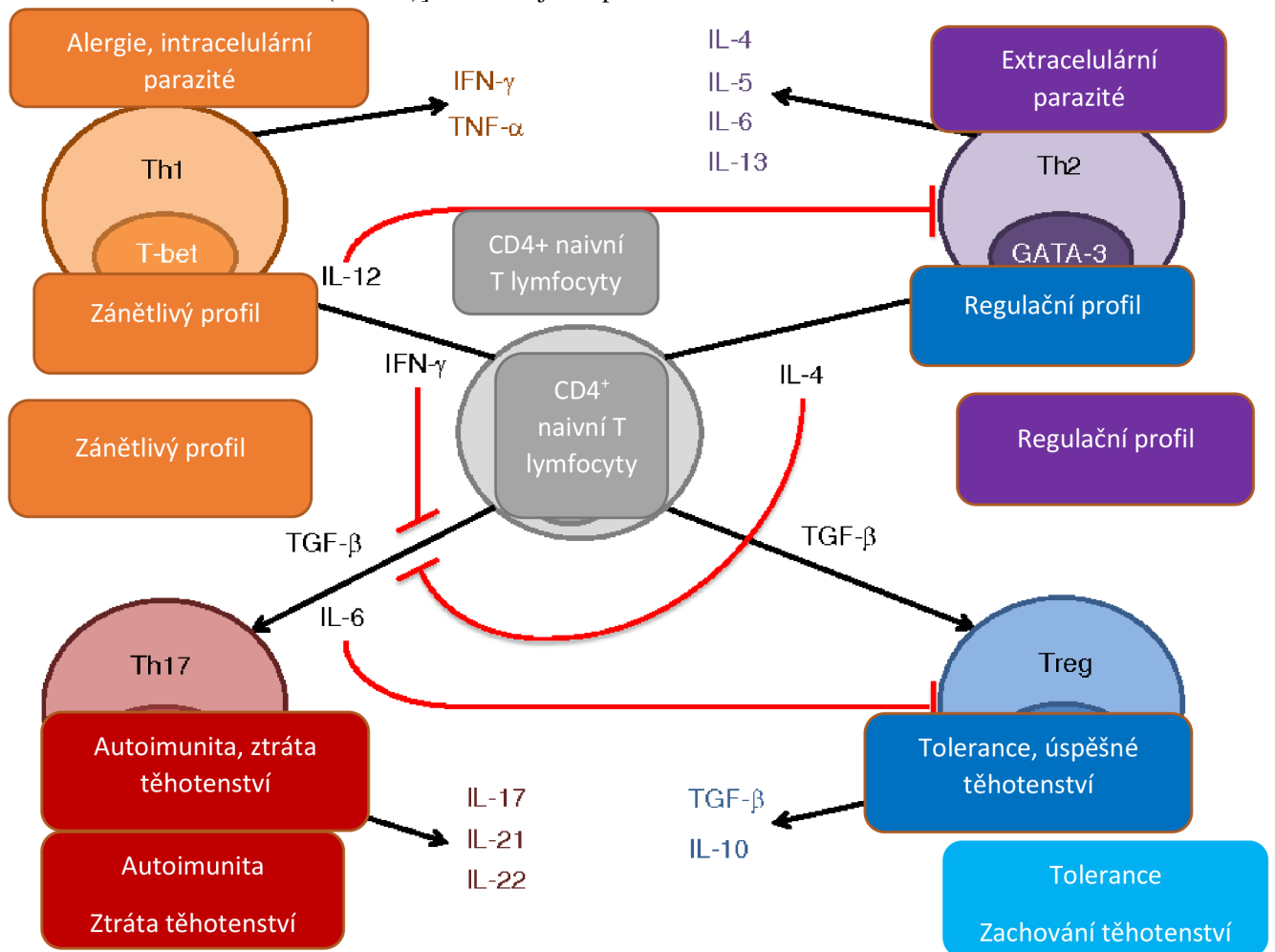


Převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467651>

V době těhotenství musí mateřský imunitní systém najít novou rovnováhu mezi tolerancí alloantigenů otce a zachováním imunitní reakce na infekční podněty. Selhání regulace této rovnováhy může vést k rozvoji komplikací, ať už se jedná o riziko spontánního abortu nebo rozvoj preeklampsie.¹¹ Cytokiny jsou klíčovým faktorem pro úspěšně dokončené těhotenství u savců, již paradigma poměru Th1/Th2/Th3 imunitní reakce nám řeklo, že cytokiny Th2 a Th3 reakce jako interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) a tumor growth factor- β (TGF- β) umožňují zachování a pokračování těhotenství, zatímco excesivní produkce Th1 cytokinů [interleukin-1 (IL-1), interferonu gamma a tumor necrosis factor- α (TNF- α)] vede k rejekci plodu v místě rozhraní buněk tkání matky a plodu růstem (Schéma 3).¹² Úlohu dominantního regulátoru poměru Th1/Th2/Th3 reakce mají T regulační lymfocyty (Treg). Mimo období gravidity je Treg svěřena funkce prevence vzniku graft versus host reakce. V graviditě Treg inhibují rozvoj Th1 ale nikoli Th2 imunitní reakce¹³. Aluvihare a kol. prokázal na myším modelu expanzi Treg CD 4+ a CD 25+ skoro ve všech tkáních u úspěšných těhotenství, deplece počtu Treg byla naopak spojena s rizikem rozvojem potratu, což potvrzuje aktivní roli Treg v toleranci plodu matkou.¹⁴ Cytokinový profil se v průběhu procesu implantace výrazně mění, nejvíce je změna patrna lokálně v děložní tkáni. Vysoký poměr Th1/Th2 reakce v proliferační fázi endometria rychle klesá v období časného těhotenského endometria. Zjednodušeně řečeno v době implantace je dominantní Th1 reakce, v době placentace převažuje již Th2 reakce.¹⁵ Na myších

modelech bylo prokázáno zamezení vzniku těhotenství blokováním regulační funkce Treg pomocí anti-CD25 protilátek.¹⁶

Schéma 3 Paradigma poměru Th1/Th2/Th3 imunitní reakce. Cytokiny Th2 a Th3 reakce: interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) a tumor growth factor- β (TGF- β) umožňují zachování a pokračování těhotenství, zatímco excesivní produkce Th1 cytokinů [interleukin-1 (IL-1), interferonu gamma a tumor necrosis factoru- α (TNF- α)] vede k rejekci plodu.



Originální obrázek

2.2.3 Úloha makrofágů a NK buněk v graviditě

V místě kontaktu buněk tkání plodu a matky je zvýšen počet imunokompetentních buněk-naturall killer (NK) buněk a makrofágů. V době těhotenství je funkcí makrofágů zejména podpora růstu trofoblastu a správná remodelace spirálních artérií. Prekurzorem makrofágů jsou monocyty, mimo období těhotenství představují monocyty CD14⁺ s nízkou mírou exprese CD16⁺ (tzv. klasické monocyty) 90-95 % z celkového počtu, zbývající podíl tvoří neklasické formy monocytů se zvýšenou

expresi CD16+ a nízkou mírou exprese CD14+. ¹⁷ Neklasické monocyty jsou prekurzorem M2 makrofágů s imunomodulační funkcí, prozánětlivé a mikrobicidní M1 makrofágy vznikají z klasických monocytů. ¹⁸ Při normálním průběhu těhotenství vilózní trofoblast aktivuje cirkulující monocyty a indukuje maturaci klasických forem monocytů (CD14+) do neklasických forem (CD 16+). Neklasické monocyty se přeměňují na M2 makrofágy, které podporují proces remodelace spirálních arterií produkcí faktorů podporujících angiogenezu (MMP a VEGF). Příkladem excesivní aktivace monocytů a syntézy prozánětlivých cytokinů je preeklampsie (PE). U PE stresovaná placenta produkuje anti-angiogenní faktory, placentální mikročástice a ATP, je zvýšená placentární syntéza prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-18, klesá hladina protizánětlivě působícího IL-10, dochází k nárůstu počtu M1 makrofágů a poklesu množství M2 makrofágů, následovaným nárůstem syntézy prozánětlivých cytokinů a rozvoji „začarovaného kruhu“ akcentace zánětu. ¹⁹

2.2.4 Cytokiny hrají v období těhotenství významnou úlohu v regulaci pro a protizánětlivé odpovědi

Jak bylo uvedeno výše, úspěšnost těhotenství závisí na rovnováze mezi cytokiny Th1 a Th2 reakce. TNF- α , IL-1 β a IL-6 jsou nejvýznamnějšími cytokiny Th1 reakce v časném těhotenství, podílejí se na implantaci blastocysty, ale také na ztrátách plodu v prvním trimestru. ²⁰ Zvláštní pozornost si zasluhuje cytokin IL-10 s duální imunologickou funkcí a pleiotropními účinky. Duální imunologická funkce IL-10 spočívá jak ve stimulační funkci, tak i v jeho imunosupresní funkci, což jej vyjímá z konceptu Th1/Th2 paradigmatu, přestože byl původně zařazen jako cytokin Th2 reakce. ²¹ IL-10 má protektivní efekt na fetoplacentární jednotku, z důvodu inhibice sekreci prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α a interferonu gamma. ²² IL-10 je kódován na chromozomu 1 a polymorfismus jeho genových promotorových regionů může interferovat s regulační funkcí. Receptor IL-10 se skládá ze dvou podjednotek, IL-10R1 and IL-10R2, které jsou exprimovány jak v hematopoetických tak i v nehematopoetických buňkách, ke kterým patří buňky cytotrofoblastu. IL-10R1 receptor se váže na IL-10 protein; IL-10R2 je specifický pro iniciaci přenosu v signální kaskádě. Přenos signálu zahrnuje Janus kinázy (Jak) and a transkripční faktory a aktivátory (STATs). IL-10 stimuluje buňky cytotrofoblastu k produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru C (VEGF-C) a aquaporinového systému (AQP-1), který stimuluje placentální angiogenezu. Na konci těhotenství produkce IL-10 progresivně klesá, což je nutné k iniciaci spontánního porodu. ²³ U těhotenství komplikovaných intrauterinní růstovou retardací (IUGR) byl popsána snížená produkce IL-10 v oblasti deciduálního regionu a trofoblastu. ²⁴ Na zvířecím modelu bylo prokázáno, že podání IL-10 je spojeno s normalizací krevního tlaku a úpravě endoteliální funkce, dané ukazuje na důležitost IL-10 u stavů se zvýšenou zánětlivou aktivitou. Cytokin IL-10 hraje v období těhotenství klíčovou úlohu v regulaci pro a protizánětlivé odpovědi, udržování této rovnováhy je zásadně důležité jak pro růst a remodelaci placenty tak pro celkové úspěšné dokončení těhotenství. ²⁵

3. Komplikace gravidity a související imunologické změny

3.1. Předčasný porod

Diagnózou předčasného porodu [preterm birth (PTB)] rozumíme porod dříve než v 37. týdnu gravidity, tato komplikace postihuje až 10 % těhotných žen po celém světě. Na PTB se může podílet více příčin od stavu výživy, nízkého indexu tělesné hmotnosti, anamnézy předchozího předčasného porodu až po dysfunkci dělohy v důsledku vícečetné gravidity. Předčasný porod můžeme rozdělit na spontánní předčasný porod s intaktními membránami (40 %), předčasný porod s rupturou membrán (PROM; 30 %) a předčasný porod formou císařského řezu nebo indukovaný porod z indikace plodu (30 %). První a druhá varianta jsou charakterizovány histologickými známkami chorioamnionitidy a jedná se o spontánní nebo zánětlivou příčinu předčasného porodu. Třetí varianta je lékařsky indikovaný porod charakterizovaný histologickými znaky dysfunkční placentace, která zahrnuje preeklampsii a intrauterinní růstovou retardaci.²⁶ PROM komplikuje 2-3 % ze všech těhotenství a je spojován s 30-40% PTB. Subklinická intrauterinní infekce je považována za hlavní etiologický faktor v patogenezi morbidity asociované s PROM.²⁷ Histologicky prokázaná chorioamnionitida (HCA) je prokázána přibližně u 50-60 % žen s PROM, pokud je přítomna tak zvyšuje riziko fetální a neonatální mortality čtyřnásobně. HCA je také asociována se syndromem dechové tísně novorozenců a následnými poruchami neurologického vývoje včetně dětské mozkové obrny.^{27,28} Příčina PROM není dosud zřejmá, zřejmě se jedná o kombinaci infekce a zánětu. Nejčastěji popisovaným mechanismem je přímý proteolytický efekt přítomných bakterií a zánětlivá odpověď organismu.²⁹ Důsledkem daného procesu je aktivace neutrofilů a makrofágů v místě infekce a následná zvýšená produkce cytokinů, prostaglandinů, metalproteináz. Tato zánětlivá odpověď může být prokázána, jak ve fetální amniové tekutině, tak také v krevním oběhu plodu a matky.³⁰ Časná infekce není spolehlivě prokazatelná obvyklými laboratorními vyšetřeními, jakými jsou sedimentace erytrocytů, leukocytóza, změny v počtu neutrofilů nebo kultivace vaginálního sekretu. Klinické příznaky jako tachykardie a febrilie se objeví až v rozvinutém stadiu.³¹ Cytokiny produkované v amniové tekutině představují nejprve lokální zánětlivou odpověď, ale poté dosáhnou systémové cirkulace v játrech stimulují syntézu C reaktivního proteinu (CRP) a kostní dřen stimuluje ke zvýšení produkce leukocytů. Změny v produkci cytokinů se tedy objevují mnohem dříve než změny v CRP. Časná a přesná diagnostika chorioamnionitidy je důležitá, přesné stanovení placentární patologie je možno až po porodu.^{32,33} Mnoho studií se zabývalo analýzou cytokinů v amniové tekutině, zejména se jednalo o cytokin IL-6. IL-6 je známý zánětlivý marker a u žen s PROM bylo prokázáno jeho zvýšení v amniové tekutině a séru matek³⁴. Hladina cytokinu IL-6 v amniové tekutině byla prokázána jako nejlepší prediktor HCA nezávisle na gestačním stáří, při kterém dochází k rozvoji k PROM. Autoři poukázali také na fakt, že stanovení IL-6 v séru matky by bylo pro praxi mnohem výhodnějším postupem k identifikaci HCA a PPROM ve srovnání s vyšetřením amniové tekutiny³⁵.

3.2 Poruchy růstu plodu

Intrauterinní růstová restrikce [Intrauterine growth restriction (IUGR)] je definována jako míra růstu, která je menší, než odpovídá potenciálu růstu plodu dané rasy a pohlaví. Jako "normální novorozenec" je označován novorozenec s porodní hmotností v rozmezí 10. až 90. percentilu odpovídající gestačním věkem, rasou, pohlavím, bez prokázané malnutrice nebo růstové retardace. Termíny "IUGR" a novorozenci s nedostatečným růstem [small for gestational age (SGA)] byly dříve používány jako synonyma, ale jsou mezi nimi rozdíly. Na podkladě normálního rozdělení hmotnosti odpovídající gestačnímu věku jsou klasifikováni jako SGA novorozenci, pokud je jejich hmotnost <10. percentilem. Termín IUGR odpovídá novorozencům s klinickými známkami malnutrice a intrauterinní růstové retardace nezávisle na váhovém percentilu hodnocenému dle gestačního věku. Proto jako IUGR mohou být označeni novorozenci s odpovídajícím gestačním věkem, pokud měli prokázanu intrauterinní růstovou retardaci nebo malnutrici. Nízká porodní hmotnost [low birth weight (LBW)] je definována jako porodní váha menší než 2500 gramů nezávisle na gestačním věku, pohlaví a rase. Definice IUGR a SGA zůstává stejná i pro LBW.³⁶ LBW nemusí vždy doprovázet PTB, ale je také asociována se zvýšeným rizikem neonatální morbidity a mortality. Výrazně snížená LBW [(VLBW) <1500 g] je spojena s významně zvýšeným rizikem nitrokomorového mozkového krvácení, obávané komplikace s vysokou mortalitou.³⁷ SGA novorozenci mají vyšší mortalitu, vyšší riziko bronchopulmonální dysplazie, retinopatie novorozenců a nekrotizující enterokolitidy. SGA novorozenci narození před 32. týdnem gravidity mají kvantitativní deficit leukocytů a také významně zvýšené riziko rozvoje sepse.³⁸ Hypotéz pro určení základní příčiny zvýšené rizika u SGA novorozenců je více, předpokládá se, že jsou vystaveni intrauterinní hypoxii, hypoglykemii a polyglobulii, což vede ke snížení energetického přísunu do různých orgánových systémů.³⁹ Bylo prokázáno že LBW je asociována s podocytopenií, expanzí mesangiální matrix a hyalinózou, uvedené změny mohou být příčinou následného rozvoje fokální segmentální glomerulosklerózy (FSGS).⁴⁰ Cytokiny se významně podílí na rozvoji komplikací u LBW ale zejména u VLBW. Astrocyty produkovaný interferon- γ -inducibilní protein 10 je chemokin, jehož exprese je indukována cytokinem TNF- α , který inhibuje angiogenezu. Jednou z rolí cytokinů je zprostředkování intravaskulární adheze leukocytů a transendoteliální migrace. Astrocyty na podkladě stimulace TNF- α exprimují mRNA adhezních molekul: E-selektinu, vascular cell adhesion molecule 1 a intercellular adhesion molecule 1. Tyto adhezní molekuly poté vedou leukocyty intraparenchymatózně. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že TNF- α má potenciál indukovat hemoragickou nekrózu u rychle rostoucích vaskularizovaných tumorů a je možné, že podobným mechanismem TNF- α indukuje rozvoj mozkového nitrokomorové krvácení u VLBW.^{41,42}

3.3 Gestační hypertenze

Gestační hypertenze [Pregnancy-induced hypertension (PIH)] představuje komplikaci u 7 až 10 % všech gravidit. Přestože se jedná o vedoucí příčinu maternální mortality a velmi významnou příčinu maternální a perinatální morbidity není mechanismus, který stojí za rozvojem PIH zatím zcela

objasněn. Gestační hypertenze je definována jako nově zachycená hypertenze v graviditě, která byla diagnostikována po 20. týdnu gravidity a je definována jako systolický krevní tlak [systolic blood pressure (SBP)] ≥ 140 mm Hg a/nebo diastolický krevní tlak [diastolic blood pressure (DBP)] ≥ 90 mm Hg.⁴³ Intenzivní výzkum v posledním období pomohl k rozšíření našich znalostí o patogenezi této závažné komplikace v graviditě. Jako spouštěcí faktor se jeví snížení uteroplacentární perfúze, které je důsledkem abnormální invaze cytotrofoblastu v oblasti spirálních artérií. Placentální ischemie vede následně k rozsáhlé aktivaci/dysfunkci cévního endotelu matky, dochází poté k zvýšené syntéze endothelinu, tromboxanu, snížené syntéze vazodilatačních mediátorů oxidu dusnatého a prostacyklinů.⁴⁴ Podíl uvedených jednotlivých mediátorů na ovlivnění renálních hemodynamických a exkretorických funkcí matky není znám. Gravidita u zdravých žen je provázena zvýšením srdečního výdeje a krevního objemu o 40 % až 50 %, zatímco celková periferní rezistence a krevní tlak [blood pressure (BP)] mají tendenci klesat. Navíc dochází ke zvýšení průtoku v ledvinách a zvýšení glomerulární filtrace o 30 % až 40 %. Koncentrace reninu, reninové aktivity a angiotensinu II jsou zvýšené, zatímco vaskulární odpověď je snížena. U gravidit komplikovaných PIH ale k uvedeným procesům nedochází. PIH je spojena se vzestupem celkové periferní rezistence a zvýšenou odpovědí na angiotenzin II, významné redukce renálního průtoku, glomerulární filtrace a dochází také k rozvoji proteinurie. Endotelin je substance s významným vasokonstrikčním efektem, tento efekt je zprostředkován pomocí endotelin A a endotelin B receptorů v cévní stěně. Receptor endotelin B se významně podílí na regulaci syntézy oxidu dusnatého a prostacyklinů. Endotelin dále také ovlivňuje exkreční frakci sodíku a renální hemodynamiku.^{45,46} Poškození endotelu je významným stimulem pro syntézu endotelinu a zvýšená produkce endotelinu se tak významně podílí na rozvoji hypertenze. Při porovnání plasmatické koncentrace endotelinu u žen s PIH a normálními hodnotami krevního tlaku bylo prokázáno 2 až 3násobné zvýšení u žen s PIH, koncentrace endotelinu bývaly nejvyšší při pokročilém onemocnění a progresi do maligní fáze PIH. Změny, které spojují placentální ischemii se změnami v maternální cirkulaci jsou intenzivně studovány. Jedna z hypotéz předpokládá, že ischemie placenty vede ke změnám cévního endotelu matky mechanismem zvýšené syntézy prozánětlivého cytokinu TNF- α a interleukin-1 (IL-1). Tyto cytokiny vedou jak k funkčním, tak i strukturálním změnám endotelu matky, dochází k zvýšení syntézy endotelinu a redukcii acetylcholinem indukované vasodilatace.⁴⁷ Endoteliální dysfunkce je asociována s mnoha formami hypertenze a byla v literatuře často mediována zvýšením hladin prozánětlivých cytokinů. Literatura poskytuje řadu důkazů pro roli cytokinu TNF- α v rozvoji preklampsie. Plasmatické hladiny TNF- α jsou signifikantně zvýšené u žen s PE přibližně na dvojnásobek.⁴⁸ Také u dalšího prozánětlivého cytokinu interleukinu-6 (IL-6), jehož syntéza je aktivována TNF- α , bylo prokázáno zvýšení hladin u gravidit komplikovaných rozvojem preklampsie (PE). Ačkoli vysoké hladiny TNF- α , které pozorujeme u septického šoku, výrazně aktivují syntézu oxidu dusnatého, mírné zvýšení hladiny TNF alpha vede k destabilizaci mRNA a snížení syntézy oxidu dusnatého – substance s významným vasodilatačním efektem.⁴⁹

3.4 Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je komplikace gravidity definovaná jako hypertenze s hodnotou SBP 140 mm a vyšší nebo DBP 90 mm Hg a vyšší, která se manifestovala po 20. týdnu gravidity a zároveň proteinurie nejméně 300 mg v 24- hodinovém sběru moče. Tato komplikace postihuje 2-8 % gravidit a představuje jednu z hlavních příčin perinatální morbidit a mortality.^{50,51} Etiologie PE není zcela známa, předpokládá se, že příčinou je nedostatečná remodelace uterinních spirálních artérií, která vede k placentální ischemii a produkci faktorů, které negativně ovlivňují deciduální buňky. Tyto faktory vedou k produkci mediátorů na placento-deciduálním rozhraní, které následně migrují do maternální cirkulace a vedou ke změnám cévního endotelu matky.⁵² Jedna z hypotéz předpokládá, že dochází k nerovnováze na placento-deciduálním rozhraní a produkci prozánětlivých cytokinů tumor necrosis faktoru alpha (TNF- α), interleukinu 6 (IL-6), IL-8 a produkci protizánětlivě působících cytokinů IL-10 a IL-1 receptor antagonisty (IL-1RA) a jejich částečnému přenosu do cirkulace matky.^{53,54} Převaha prozánětlivých faktorů vede k rozvoji endotelové dysfunkce a převaze adhezivního stavu, produkci intercellular adhesion molecule (ICAM-1) a vascular cell adhesion molecule (VCAM-1).⁵⁵ Některé práce upozorňují na význam poměru pro/proti zánětlivě působících cytokinů s výslednou převahou prozánětlivého stavu. Ortega a kol. nepozorovali rozdíl u žen s PE ve srovnání se zdravými kontrolami v absolutních hladinách cytokinu IL-8, ale prokázali (v placentě) rozdíl v poměru IL-8/ IL-1RA, kdy byl poměr vyšší u žen s PE ve srovnání s kontrolami.⁵⁴ Připomeňme, že dvounásobné zvýšení plazmatické hladiny prozánětlivého cytokinu TNF- α bylo prokázáno u žen s PE a také signifikantní zvýšení dalšího prozánětlivého cytokinu IL-6, jehož syntéza je aktivována TNF- α , prokázané u gravidit komplikovaných rozvojem PE. PE je multisystémové onemocnění charakterizované endotelovou dysfunkcí, zvýšenou periferní vaskulární rezistencí, koagulačními abnormalitami, oxidativním stresem a zvýšenou produkcí cytokinů. Imunitní maladaptivní hypotéza nám říká, že příčinou preeklampsie je posun T regulačních lymfocytů k převaze imunitní reakce prvního typu, dochází ke změně v poměru M1 a M2 makrofágů s následnou progredující ischemizací placenty, tato změna je provázána nárůstem produkce prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL -1 β nebo IL-18).^{56,57} V experimentu byla zvolena modelace na potkanech, protože u potkanů je stejně tak jako u člověka přítomna hluboká invaze cytotrofoblastu do děložní tkáně. Na modelech bylo prokázáno spojení mezi stimulací monocytů adenosin-trifosfátem (ATP), LPS, TNF- α a vzestupem podílu neklasických forem monocytů vůči klasickým formám. Vzestup neklasických forem monocytů v tomto modelu byl spojen se zvýšenou zánětlivou aktivitou, glomerulárním zánětem, hypertenzí a proteinurií-tedy stavu odpovídajícího preeklampsii.^{57,58} Zjednodušeně můžeme konstatovat, že dle uvedených hypotéz proces aktivace monocytů u preeklampsie začíná u stresované placenty produkcí cytokinů (TNF- α , IL -1 β nebo IL-18), pokračuje přes zvýšenou produkci anti-angiogenních faktorů, placentálních mikročástic a ATP až k excesivní aktivaci monocytů. Poté dochází k rozvoji začarovaného kruhu, kdy zvýšená produkce cytokinů ischemizovanou placentou je provázána zhoršením poruchy remodelace spirálních artérií a progresí ischemizace placenty.⁵⁹

4. Co nám ukazují experimentální modely na zvířatech?

4.1 Angiotensinem II indukovaná hypertenze

Mnoho nám mohou napovědět zvířecí modely účinku cytokinu IL-6 u srdeční dysfunkce a angiotensinem II indukované hypertenze. IL-6 je prozánětlivý cytokin uvolňovaný z různých buněk: endoteliálních, buněk hladkého svalu, makrofágů. Zvýšené hladiny IL-6 korelují se zvýšením krevního tlaku a jsou nezávislým rizikovým faktorem pro angiotensin II (Ang II) indukovanou hypertenzi.⁶⁰ Na zvířecím modelu indukované hypertenze (dieta se zvýšeným množstvím soli a podání infuze Ang II) bylo prokázáno, že protein kináza B2 aktivuje IL-6 mediovaný zánět, který vede ke kardiální maldaptaci a dysfunkci v závislosti na stimulaci Ang II. Zhoršení srdeční funkce je přítomno pouze wild type nikoli u IL-6 knock-out myši, čímž je doložen význam IL-6 v protein kináza B2 dependentním poškození myokardu. Delece proteinkinázy B2 ale nejen uchovává funkci srdce blokováním poškození zprostředkovaného IL-6 ale i normalizuje krevní tlak v Ang II modelu hypertenze.⁶¹ Citovaná práce poukazuje na významnou úlohu proteinkinázy B2 a IL-6 na zvířecím modelu indukované hypertenze a ukazuje význam cytokinu IL-6 v regulaci krevního tlaku.

4.2 Hormonální regulace produkovaných cytokinů, antiabortivní efekt inhibice NK buněk

Většina (skoro 90 %) periferních natural killer (NK) buněk exprimuje antigen CD56dim a dále exprimují vysokou úroveň CD16; zbytek asi 10 % z periferních NK buněk je CD56bright a exprimuje nízkou úroveň nebo žádné CD16. CD56dim jsou více cytotoxické, zatímco CD56bright je hlavním zdrojem NK buňkami produkovaných cytokinů. (35) Th2 buňky produkují cytokiny Th2 profilu: IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13, uvedené cytokiny mají inhibiční efekt na vazbu a cytotoxicitu NK buněk na cévní endotel.⁶² V odpovědi na progesteron T buňky produkují progesteron induced blocking factor (PIBF), který na myších modelech inhibuje NK buňky a má antiabortivní efekt.⁶³ PIBF byl recentně klonován a zvyšuje produkci IL-10 a suprimuje produkci IL-12 humánními periferními lymfocyty, dále inhibuje cytotoxickou aktivitu NK buněk *in vitro*⁶⁴. Solubilní mediátory TNF- α , IFN- γ produkované aktivovanými NK buňkami hrají důležitou úlohu v indukci apoptózy a regulaci imunní odpovědi. Prolaktin stimuluje proliferaci periferních NK buněk v přítomnosti fyziologických koncentrací IL-2, ale inhibuje odpověď na IL-2 při vysokých koncentracích. Hormonální regulace aktivity NK buněk je stále otázkou pro výzkum v budoucnu.⁶⁵

5. Představuje biologická léčba cílená na cytokin TNF- α efektivní možnost ovlivnění PTB v budoucnu?

Z citovaných prací můžeme říci, že prozánětlivé cytokiny IL-6, TNF- α a cytokin s duální imunologickou funkcí IL-10 hrají významnou úlohu v patogenezi několika komplikací gravidity: PTB, PIH a PE. Výše uvedené práce ukázaly, jak významnou úlohu cytokiny hrají. Biologická léčba anti-TNF- α je v současnosti využívána v léčbě Crohnovy choroby a astmatu s velmi dobrým efektem a mohla by být velkým přínosem k prevenci rozvoje PTB. Nadějný se jeví zejména proteázový Inhibitor kunitzového typu bikunin, který může suprimovat aktivitu makrofágů i neutrofilů. Bikunin blokuje LPS-indukovanou sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-8 a také inhibuje nukleární translokaci NF κ B.^{66,67,68,69}

6. Cíl práce

Vztah mezi zánětem a inzulinovou rezistencí (IR) byl potvrzen v mnoha klinických pracích.⁷⁰ Provedené Studie ukázaly pozitivní korelaci mezi inzulinovou senzitivitou a zánětlivými markery, jakými jsou CRP, IL-6 a TNF- α .^{71,72} Stejně tak další studie ukázaly známky systémového zánětu u GDM, ačkoli získané výsledky jsou často ve vzájemném rozporu. Přítomný zánět byl opakovaně dáván do souvislosti se zvýšenou adipositou. Ve více pracích (Wolf et al.⁷³, Bo et al.⁷⁴, Retnakaran et al.⁷⁵) byl vzestup hladin CRP signifikantně asociován se zvýšenou adipositou matky. Ve studii D'Anna et al. nebyl ale v rozmezí od 14. týdne do doby porodu prokázán signifikantní vztah mezi hodnotou CRP a GDM a nebyla také prokázána asociace ani mezi BMI a zánětlivými markery.⁷⁶ Kuzmicki et al.⁷⁷ prokázal zvýšení hladin cytokinu IL-6 mezi 24- 31. týdnem gravidity u žen s GDM ve srovnání se ženami s normální tolerancí glukózy i přes srovnatelné hodnoty BMI. Morriset et al. prokázali, že GDM je asociován se zvýšením hladin IL-6 nezávisle na obezitě nejen v období gravidity, ale i po dokončené graviditě.⁷⁸ Máme tedy důkazy z klinických studií prokazující zvýšení prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 u GDM, byla prokázána asociace mezi zvýšením hladin prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 a rozvojem závažných komplikací gravidity PIH, PE, PTB, LBW. Posouzení vztahu mezi: hladinami cytokinů prozánětlivých TNF- α , IL-6 a protizánětlivě působícího IL-10 a rozvojem komplikací gravidity (PIH, PE, PTB, LBW) u žen s GDM je věnována tato práce.

7. Metodika

Studie byla schválena etickou komisí FN u sv. Anny v Brně, bylo zařazeno 40 žen s GDM rozdělených do dvou skupin, 20 žen s GDM a gestační hypertenzí a 20 žen s GDM a normálními hodnotami krevního tlaku. Kritéria pro stanovenou diagnózu GDM zodpovídala současným platným odborným doporučením (lačná glykemie (FPG) 5.1-6,9 mmol/l, postprandiální glykémie (PPG) v 1

hodině $\geq 10,0$ mmol/l, PPG v 2. hodině $\geq 8,5$ mmol/l po předchozí perorální zátěži 75 gramy glukózy). Ženy byly sledovány v diabetologickém centru Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Všechny ženy před započítáním účasti ve studii podepsaly informovaný souhlas. Ženy, které byly zařazeny do skupiny s gestační hypertenzí musely mít v dokumentaci nově diagnostikovanou hypertenzi po 20. týdnu gravidity a následující hodnoty krevního tlaku stanovené u gynekologa systolický krevní tlak (SBP) ≥ 140 mm Hg a/nebo diastolický krevní tlak (DBP) ≥ 90 mm Hg, kontrolní skupina: ženy bez předchozích gynekologických nežádoucích účinků s normálními hodnotami krevního tlaku, definovaných jako nižší než uvedená kritéria gestační hypertenze. Referenční skupina byla vybrána tak aby odpovídala hypertenzní skupině v následujících kritériích: věk, BMI, kompenzace diabetu vyjádřena hodnotou glykovaného hemoglobinu (HbA1c). Ženy nebyly do klinického hodnocení zařazeny pokud měly v anamnéze před graviditou: dyslipoproteinémii, chronická onemocnění imunitního systému, neurologická onemocnění, chronickou hypertenzi, malignitu, ženy které kouřily před nebo během těhotenství. Kontrolní skupina zahrnovala rutinní vzorky odebrané ve druhém a třetím semestru a neměly žádné z uvedených vyřazujících kritérií. Těsná kontrola glykémie byla dosažena po celou dobu studie pomocí diabetické diety, pokud dieta nepostačovala tak byl zahájen bazální inzulin, tak jak je doporučeno v doporučeních pro léčbu České diabetologické společnosti. Hodnoty krevního tlaku byly stanoveny před vyšetřením periferní krve v období druhého trimestru (26. týden gravidity) a v období třetího trimestru (37.-38. týden gravidity) v tiché místnosti. U žen, které se účastnily studie byla hodnota krevního tlaku stanovena pomocí tonometru využívající oscilometrický postup měření výrobce Omron Diagnostics po předchozím 5 minutovém období klidu. Tři následující měření krevního tlaku byly provedeny v 30 sekundovém odstupu. Skupina s gestační hypertenzí byla léčena dle platných doporučení České diabetologické společnosti, žádné změny v medikaci hypertenze nebyly provedeny z důvodu účasti v dané studii. Metyldopa. Metyldopa (centrálně působící adrenergní agonista) byl lékem první volby, Betaxolol (beta-blokátor) byl lékem druhé volby. Rozložení variant léčby ve skupině gestační hypertenze bylo následující (% léčených; dávka v mg) : monoterapie metyldopa (85; 164), monoterapie betaxolol (0;0), kombinace (betaxolol+metyldopa) (15; 437.50). Ostatní skupiny antihypertenziv nebyly použity. Vyšetření periferní krve bylo provedeno po 8 hodinovém lačnění odběrem žilní plasmy v 26. týdnu a 37. až 38. týdnu gravidity. Z imunologických parametrů byly sledovány hladiny následujících cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-10, hodnoty T lymfocytů a NK buněk, exprese povrchových antigenů-absolutní počet CD4+ T lymfocytů. Ke stanovení poměru Th1/Th2 imunologického profilu jsme zvolili poměr Th1 cytokinů IL-6/Th 2 cytokinu IL-10. Ke stanovení aktivity buněčné imunity jsme zvolili absolutní počet CD4(+) T lymfocytů, z metabolických parametrů jsme sledovali glykémii, glykovaný hemoglobin (HbA1c), kyselinu močovou [uric acid (UA)], imunoreaktivní inzulin [immunoreactive insulin (IRI)] a dále ostatní základní biochemické parametry. Po centrifugaci byly všechny vzorky zmrazeny na -80°C dokud nebyly vyšetřeny. Sérové hladiny cytokinů IL-6, IL-10 a TNF- α byly stanoveny pomocí Sandwich ELISA, Biotin-labelled antibody kits (Biovendor Research and Diagnostic Products):

HUMAN INTERLEUKIN - 6 high sensitivity ELISA, HUMAN INTERLEUKIN - 10 high sensitivity ELISA, TNF-alpha Human High Sensitivity ELISA. Dolní kvantifikační referenční rozmezí pro jednotlivé cytokiny bylo: IL-10 1.0; IL-6 1.0; TNF- α 4.0. Všechny hodnoty cytokinů jsou uvedeny v pg/ml. Klinické charakteristiky byly stanoveny na podkladě fyzikálního vyšetření nebo na podkladě medicinských záznamů. Ze získaných parametrů byly následně stanoveny tyto parametry : vypočtená inzulinová rezistence (IR) dle Matthews et al. ($HOMA-IR = (FPI \times FPG) / 22.5$), kde FPI představuje IRI, (mU/l), FPG lačnou glykémii. Preeklampsie byla definována jako hodnoty krevního tlaku: SBP 140 mm Hg nebo vyšší, DBP 90 mm Hg nebo vyšší objevující se po 20. týdnu gestace, proteinurie nejméně 300 mg v 24 hodinovém sběru. Gestační hypertenze byla definována jako nově zachycená hypertenze po 20. týdnu gestace (SBP \geq 140 mm Hg a/nebo DBP \geq 90 mm Hg). Nízká porodní hmotnost [Low birth weight (LBW)] byla definována dle kritérií W.H.O. jako porodní váha menší než 2500 g (včetně 2499 g), jako porodní váha byla použita první váha zaznamenaná po porodu. Percentily váhy a věku [Low birth weight (LBW)] infant Weight for Age Percentiles (newborns)] výpočet proveden dle kritérií W.H.O. Jako předčasně narozené děti [(preterm birth (PTB)] byly označeny děti narozené před <37 týdnem ode dne poslední menstruace nezávisle na porodní váze. Sledované parametry zahrnovaly: porodní váhu [birth weight (BW)], gestační týden v době porodu, způsob porodu (přirozený, císařský řez), indukci porodu a další porodní komplikace.

8. Statistika

Deskriptivní statistika souboru v případě numerických hodnot zahrnuje: průměr, medián, směrodatnou odchylku, min. a max. Pro kategoriální proměnné jsou vypočítány absolutní (N) a relativní (%) frekvence. K porovnání průměrných hodnot (SBP, DBP, BW, absolutního počtu CD4 +lymfocytů) získaných ve druhém a třetím trimestru mezi hypertenzní a referenční skupinou byl použit Student t-test. Hodnoty TNF- α , IL-10, IL-6 a UA (data pro UA nejsou prezentována) byly rozděleny dle mediánu na skupinu s hodnotou nižší než medián "low" a vyšší než medián "high". Po provedení analýzy získaných dat jsme mohli konstatovat, že datový soubor byl rozdělený rovnoměrně. Pokud hladina cytokinu nedosáhla měřitelné hodnoty byl použit medián referenčního rozmezí. Pro analýzu rozdílů mezi skupinami "low" a "high" pro SBP a DBP byl zvolen Kruskal–Wallis test, protože se jedná o neparametrický test, který nepředpokládá normální rozdělení dat a je vhodný pro srovnání dvou malých datových souborů, což odpovídalo velikosti naší analyzovanému souboru. Výsledkem testu je p-hodnota. Ke zhodnocení vztahu mezi SBP a rizikem rozvoje PE u skupin low; high pro hladiny cytokinů IL-6; TNF- α ; IL-10 byl zvolen Chi-square test. Chi-square test je určen pro testování rozdílu frekvencí mezi dvěma kategoriálními proměnnými. Ke zhodnocení závislosti mezi hladinami cytokinů IL-6; TNF- α ; IL-10 a proměnnými: BW; riziko preeklampsie byla zvolena korelační matrix, která zobrazuje Spearmanův korelační koeficient (Spearman correlation rho. Jedná se o neparametrický korelační koeficient, který je robustní vůči odlehlým hodnotám a obecně odchylkám od normality, používající pořadí ke kalkulaci korelace. Na rozdíl od Pearsonova koeficientu korelace,

který popisuje lineární vztah veličin, Spearmanův koeficient korelace popisuje, jak dobře vztah veličin a odpovídá monotónní funkci, která může být nelineární. Statisticky signifikantní rozdíly jsou vyznačeny tučně.

9. Výsledky

Získanou deskriptivní statistiku nám ukazuje Tabulka 1. Pro porovnání glykemické kontroly dosažené jednotlivými skupinami jsme použili hodnotu HbA1c. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou v období druhého a třetího trimestru ($p=0.78$; $p=0.75$) (Tabulka 2). Pro období druhého a třetího trimestru jsme prokázali statisticky významný rozdíl v SBP (Graf 1), DBP (Graf 2) mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p<0.001$; $p<0.001$); ($p<0.001$; $p<0.001$). Po provedení analýzy získaných dat nastala v případě hladiny cytokinu IL-6 zajímavá situace, protože medián byl stejný jako minimum (více než 50 % pozorování bylo rovno minimální hodnotě tj. 0,5). Proto jsme soubor pozorování IL-6 rozdělili do (včetně) 0,5 jako "low IL-6" a nad 0,5 jako "high IL-6". Analogicky pro ostatní sledované hodnoty TNF- α , IL-10 a uric acid bylo použito stejné rozdělení dle mediánu na skupiny s hodnotou nižší než medián "low" a vyšší než medián "high". Pro analýzu rozdílů mezi skupinami "low" a "high" v SBP byl zvolen Kruskal–Wallis test. Výsledky analýzy průměrné hodnoty SBP v druhém a třetím trimestru pro následující skupiny: low IL-6; high IL-6, low TNF- α ; high TNF- α , low IL-10; high IL-10 (Tabulka 3). Vztah byl hodnocen na 5 % hladině významnosti, prokázali jsme statisticky významný rozdíl pro cytokiny: IL-6 ($p <0,001$; $p <0,001$), TNF- α ($p <0,001$; $p <0,001$), IL-10 ($p <0,001$; $p=0,0019$) (Tabulka 3). Poté jsme analyzovali pomocí korelační matrix (Spearman correlation rho) korelaci hladiny cytokinů TNF- α ; IL-6; IL-10 a SBP, prokázali jsme signifikantní korelaci mezi SBP and IL-6; TNF- α IL-10 ve druhém trimestru 0.84; 0.55;0.81 ($p <0.001$; $p <0.001$; $p <0.001$); třetím trimestru 0.85; 0.75;0.45, ($p <0.001$; $p <0.001$; $p <0.05$). Prokázali jsme také korelace pro DBP v období druhého; třetího trimestru ($p <0.001$; $p <0.001$; $p <0.001$); ($p <0.001$; $p <0.001$; $p <0.0015$) (Tabulka 4). Pomocí Chi-square testu jsme analyzovali vztah mezi hladinami cytokinů a rizikem rozvoje komplikací v graviditě, prokázali jsem statisticky významný vztah mezi high TNF- α group a PE risk ve třetím trimestru ($p = 0.04$), bez průkazu statisticky významné asociace pro hladiny cytokinů IL-6; IL-10 (Tabulka 5), ve druhém trimestru nedosáhlo zvýšení rizika PE statistické významnosti pro žádný ze sledovaných cytokinů (data nejsou ukázána). Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v porodní váze (Graf 3), neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v weight-for-age percentilech ($p=0.17$) mezi referenční a hypertenzní skupinou. Při hodnocení korelačního koeficientu pro BW v období druhého trimestru jsme prokázali statisticky významné negativní korelace pro hladiny všech sledovaných cytokinů TNF- α ; IL-10; IL-6 (-0.32; -0.51; -0.56), p-hodnoty ($p <0.05$; $p <0.001$; $p <0.001$). Ve třetím trimestru byly také prokázány negativní korelace (-0.53; -0.27; -0.51), p-hodnoty ($p <0.05$; $p=0.096$; $p <0.001$) pro IL-10 tedy korelace nedosáhla hladiny statistické významnosti. Pro námi zvolený poměr změny Th1/Th2 imunologického profilu (poměr IL-6/IL-10) jsme neprokázali statisticky významnou korelaci s BW ve

druhém trimestru, ale prokázali jsme korelaci ve třetím trimestru ($p < 0.001$). Ke stanovení aktivace buněčné imunity jsme zvolili absolutní počet CD4+ lymfocytů, neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v období druhého a třetího trimestru mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p=0.76$; 0.42) (Graf 4). Neprokázali jsme také statisticky signifikantní rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou v hodnotách leukocytů periferní krve ve druhém trimestru ($p=0.18$), ale prokázali jsme signifikantní rozdíl ve třetím trimestru ($p=0.04$). Hladina UA nekorelovala statisticky významně s hladinami TNF- α ; IL-10; IL-6 (data nejsou ukázána), neprokázali jsme korelaci hladinou UA a rizikem PE nebo s hodnotou BW. Při hodnocení výsledků jsme použili definici LBW jako porodní váha nižší než 2500 g (včetně hodnoty váhy 2499 g), tak jak je definováno WHO. V naší studii byla nejmenší prokázaná váha 2760 g, proto nikdo ze zařazených subjektů nesplnil kritéria pro LBW. Potvrdili jsme ve druhém trimestru signifikantní korelaci mezi sledovanými cytokiny TNF- α ; IL-10; IL-6 a týdnem porodu; ve třetím trimestru nebyl daný vztah signifikantní (Tabulka 4). Vybrali jsme hladinu prozánětlivého cytokinu IL-6 a zjišťovali, zda byl přítomen statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou. Z tabulky relativních četností jsou zřejmé jednoznačné rozdíly mezi skupinami, ve druhém trimestru má 100 % pozorování z referenční skupiny low IL-6, zatímco jen 10 % z hypertenzní skupiny má low-IL-6 a 90 % tj. 18 v počtu má high IL-6. ($p < 0,001$). Ve třetím trimestru má z hypertenzní skupiny 100 % high IL-6 a všechny low IL-6 jsou z referenční skupiny.

10. Diskuze

Předpokládali jsme, že hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α jsou důležitou součástí kontroly krevního tlaku v graviditě, tato hypotéza se na podkladě námi získaných dat jeví jako pravdivá. Potvrdili jsme, že průměrná hodnota SBP byla signifikantně vyšší u skupiny high IL-6 jak v období druhého, tak i třetího semestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$). Také byla prokázána signifikantně zvýšená hodnota průměrná hodnota SBP pro skupinu high TNF- α ve druhém i třetím trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$). Byla také prokázána signifikantní asociace pro skupinu low IL-10 a zvýšení hodnot SBP v druhém a třetím trimestru ($p < 0.001$; $p = 0.019$). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi TNF- α ; IL-6; IL-10 a hodnotou SBP ve druhém trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); třetím trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.05$). Také jsme prokázali korelaci pro DBP v období druhého; třetího trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.0015$). Naše výsledky tedy podporují hypotézu, že prozánětlivý stav (který je podle našeho názoru signifikantně ovlivněn zvýšením hladin cytokinů IL-6 and TNF- α a deficitem protizánětlivě působícího IL-10), je asociován se zvýšením krevního tlaku. Gestační hypertenze je poměrně častou komplikací u GDM, jejich vzájemná souvislost ale není dosud zcela prozkoumána. Populační case-control studie věnovaná této problematice byla vedena v období 1992–1998, jednotlivé případy gestační hypertenze byly rozděleny do následujících skupin: eklampsie, závažná preeklampsie, mírná preeklampsie a gestační hypertenze. Kontrolní skupina měla normální hodnoty krevního tlaku v těhotenství. Gestační diabetes byl častější u gravidit komplikovaných uvedenou patologií (3.9% u eklampsie, 4.5% u těžké eklampsie a 4.4% u

lehké preeklampsie a gestační hypertenze ve srovnání s kontrolami (2.7%). Po adjustaci gestační diabetes byl asociován se zvýšeným rizikem těžké preeklampsie poměr šancí odds ratio (OR) = 1.5, mírná preeklampsie OR = 1.5 a gestační hypertenze OR = 1.4. Preeklampsie (PE) je komplikace gravidity, pro kterou je charakteristická přítomnost hypertenze. Cytokiny mají důležitou úlohu v rozvoji PE, cytokin TNF- α modifikuje expresi adhezních molekul v placentálních cévách, apoptózu trofoblastu. Tímto mechanismem dochází k insuficientní progresi cytotrofoblastu a rozvoji placentální ischemie. Defektní placentace a snížená invaze trofoblastu snižuje uteroplacentální perfúzi (RUPP) a dochází k rozvoji placentální hypoxie. RUPP vede k uvolnění vasoaktivních působků, ke kterým patří: pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor nebo prozánětlivé cytokiny, reaktivní kyslík, hypoxia-induced factor-1. Cirkulující bioaktivní faktory cílí na endoteliální buňky a vedou k rozvoji generalizované endoteliální dysfunkce. Snížené vazodilátory a zvýšené vazokonstriktory jako jsou endothelin-1 and thromboxane A2, což vede výsledně k vasokonstrukci. Endothelin-1 (ET-1) je hlavním vasokonstriktorem v rozvoji in PE.⁷⁹ Wallace et al. předpokládali, že redukci uterinního perfúzního tlaku (RUPP) na podkladě CD4(+) T lymfocyty indukovaného vzestupu krevního tlaku během těhotenství. Na zvířecím modelu těhotných krys bylo prokázáno zvýšení TNF- α po podání RUPP aktivovaných CD4(+) T lymfocytů. Data z tohoto modelu podporují hypotézu, že TNF- α hraje významnou roli v rozvoji hypertenze při přítomné ischemii placenty.⁸⁰ Význam ET-1 v kontrole krevního tlaku byl demonstrován na zvířecím modelu, kde antagonisté endothelin A a B receptorů signifikantně zvyšovali glomerulární filtrační tlak, renální plasmatický průtok a renální intersticiální hydrostatický tlak.⁸¹ Správná funkce endotelu se jeví jako klíčový faktor pro udržení normálního krevního tlaku a během ischemie placenty vzrůstá počet M1-makrofágů a zvyšuje se syntéza prozánětlivých cytokinů: TNF- α , IL-1 β a IL-18. Tyto prozánětlivě působící cytokiny podporují syntézu vysoce efektivního vasokonstriktoru endothelinu a redukují acetylcholinem indukovanou vasodilataci-induced vasodilation.⁸² Připomeňme si, že endothelin na zvířecích modelech snižoval exkreci sodíku a resultující snížená natriuréza je jedním z hlavních mechanismů rozvoje hypertenze.⁸¹ Nedávno byla objevena nová populace T-helper lymfocytů, která produkuje IL-17. Tato populace, která je označena jako Th17, hraje významnou roli v indukci zánětu. Aktivace dendritických buněk zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1, TGF-beta indukujících proliferaci Th17 buněk. Funkce efektorových T lymfocytů, jakými jsou Th1, Th2 a Th17 buňky je řízena pomocí CD4+ CD25+ regulačních T lymfocytů (Treg).⁸³ Chtěli bychom připomenou hypotézu Wallace et al., že u RUPP přítomná redukce CD4+ T lymfocytů vede ke zvýšení krevního tlaku.⁸¹ V naší studii jsme vybrali absolutní počet CD4+ T lymfocytů k posouzení aktivace buněčné imunity. Nepotvrdili jsme statisticky významný rozdíl v absolutním počtu CD4+ T lymfocytů mezi hypertenzní a referenční skupinou ve druhém a třetím trimestru. Potvrdili jsme statisticky významné zvýšení leukocytů v periferní krvi ve třetím trimestru (p= 0,04), ale nepotvrdili jsme rozdíl mezi skupinami pro druhý trimestr (p=0.18). Naše studie měla některé limity, design studie byl cílen na změny hladin cytokinů ve vztahu ke sledovaným parametrům (krevnímu tlaku, riziku rozvoje PE, LBW). Cíleně jsme proto

nesledovali změny populací podtříd T lymfocytů a je proto obtížné posoudit význam pozorované změny leukocytů v periferní krvi ve třetím trimestru.

IL-6 je jako prozánětlivý cytokin uvolňovaný z různých buněk: endoteliálních, buněk hladkého svalu, makrofágů. Dle literatury zvýšené hladiny IL-6 korelují se zvýšením krevního tlaku a jsou nezávislým rizikovým faktorem pro angiotensin II (Ang II) indukovanou hypertenzi. Na zvířecím modelu indukované hypertenze (dieta se zvýšeným množstvím soli a podání infuze Ang II) bylo prokázáno, že protein kináza B2 aktivuje IL-6 zprostředkovaný zánět. Delece proteinkinázy B2 v modelech poté normalizovala krevní tlak.⁸⁴ Angiotensin II sám potencuje další syntézu TNF- α a IL-6.⁸⁵ Gadonski a kol. provedli sérii experimentů u potkanů, nasazením klipu navodili arteficiální redukci uterinní perfúze (RUPP) a prokázali zvýšení plasmatické hladiny IL-6, signifikantní nárůst tepenného tlaku a redukci glomerulární filtrace (eGF) u potkanů s RUPP ve srovnání s kontrolní skupinou.⁸⁶ Endoteliální dysfunkce, která je asociována s mnoha formami hypertenze, byla v humánních studiích alespoň částečně mediována zvýšením hladin prozánětlivých cytokinů.⁸⁷ V souhrnu můžeme konstatovat, že cytokiny IL-6 a TNF- α jsou dle humánních studií i modelů na zvířatech významně zapojeny v patogenezi inzulínové rezistence a hypertenze v těhotenství, naše výsledky prokázaly statisticky významnou asociaci mezi zvýšením hladin cytokinů IL-6 a TNF- α periferní krvi matky a vzestupem systolického krevního tlaku u GDM, tedy u onemocnění charakterizovaného zvýšenou inzulínovou rezistencí.

Diagnóza PE je stanovena na podkladě přítomnosti hypertenze a proteinurie po 20. týdnu gravidity u žen, které měly před těhotenstvím normální hodnotu krevního tlaku. PE je multisystémové onemocnění charakterizované endotelovou dysfunkcí, zvýšenou periferní vaskulární rezistencí, koagulačními abnormalitami, oxidativním stresem, hyperlipidemií a zvýšenou produkcí cytokinů. PE je spojena s poruchou remodelace spirálních artérií, defektní invazí cytotrofoblastu, změnou v poměru M1 a M2 makrofágů a následnou progredující ischemizací placenty, tato změna je provázána nárůstem produkce prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β nebo IL18).⁸⁸ Mnoho faktorů může být zúčastněno v další aktivaci monocytů v rozvoji preeklampsie. Jedná se o faktory uvolňované ze stresované placenty: anti-angiogenní faktory, placentální mikročástice nebo ATP, které jsou uvolňované ve velkém množství z placenty u preeklampsie.⁸⁹ V literatuře najdeme práci Lockwood et al., kteří prokázali zvýšenou hladinu plazmatického IL-6 u žen s PE a došli k závěru, že decidua se jeví být zdrojem plazmatické elevace IL-6, pravděpodobně mechanismem zvýšené hladiny cytokinů IL-1 a TNF- α následně vedoucí ke zvýšené expresi IL-6 mRNA deciduálními buňkami.⁹⁰ V experimentální modelaci na potkanech bylo prokázáno spojení mezi stimulací monocytů TNF- α a vzestupem podílu neklasických forem monocytů, zvýšenou zánětlivou aktivitou, glomerulárním zánětem, hypertenzí a proteinurií-tedy stavem odpovídajícím preeklampsii.⁹¹ Zajímavé je v některých pracích popsání spojení mezi cytokiny, kyselinou močovou (UA) a PE. U žen s PE bylo popsáno zvýšení hladiny kyseliny močové již v 10. týdnu těhotenství.⁹² Ve výsledcích našeho sledování jsme prokázali zvýšení rizika PE ve třetím trimestru pouze pro skupinu high TNF- α (p=0,04), pro skupiny high IL-6 a high

IL-10 nebylo v naší práci hladiny statistické významnosti dosaženo. Ve druhém trimestru nedosáhlo zvýšení rizika PE stat. významnosti pro žádný ze sledovaných cytokinů (data nejsou ukázána). Výsledky z našeho sledování jsou ale poměrně v souladu s uvedenými pracemi, prokázali jsme statisticky významný vztah mezi mean SBP a hladinou IL-6. Pokud připomene hypotézu vyslovenou Peraçolli a kol., že zvýšená produkce cytokinu TNF- α je společným patofyziologickým mechanismem pro PIH a PE, kdy PE je pouze nejvíce vystupňovanou variantou onemocnění⁹³ a uvědomíme si, že zvýšení krevního tlaku je zásadní součástí klinického syndromu PE, nelze dle nás vyloučit, že zvýšení hladiny cytokinu TNF- α je těsněji spjato s rizikem rozvoje PE a byl by třeba větší soubor těhotných k prokázání statisticky významná asociace mezi rizikem PE i pro cytokin IL-6. Pokud zvážíme, že vztah rizika PE a TNF- α nebyl významný ve druhém trimestru, ale byl v třetím trimestru, považujeme za pravděpodobné, že významná elevace hladiny TNF- α v periferní krvi matek patří až k rozvinutému syndromu, tedy v době před porodem. Při hodnocení korelačního koeficientu pro birth weight v období druhého trimestru jsme prokázali statisticky významné negativní korelace pro všechny sledované cytokiny TNF- α ; IL-10; IL-6 ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$). Ve třetím trimestru byly také prokázány negativní korelace ($p < 0.05$; $p = 0.096$; $p < 0.001$). Pro IL-10 tedy ve třetím trimestru korelace nedosáhla hladiny statistické významnosti. Námi získané výsledky korelace hladin cytokinů a birth weight jsou z pohledu současné literatury poněkud rozporuplné, zatímco námi prokázaná negativní korelace mezi hladinami cytokinů IL-6; TNF- α a porodní váhou je v literatuře popsána, tak naše výsledky pro IL-10 jsou v rozporu s literárními údaji. V práci Barth a kol. bylo pozorováno zvýšení hladiny TNF- α u žen s IUGR a placentální insuficiencí, ale byla prokázána normální hladina TNF- α u žen s IUGR a normální placentální perfúzí. Elevace TNF- α zde byla považována ze fenomém specifický pro IUGR s placentální dysfunkcí.⁹⁴ De Steenwinkel a kol. u matek s revmatoidní artritidou, prokázali asociaci mezi zvýšením IL-6 v séru matek a nízkou porodní váhou. Většina literárních prací popisuje protektivní efekt IL-10 na fetoplacentární jednotku (mimo jiné mechanismem inhibice sekrece prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α , interferonu gamma)⁹⁵ U těhotenství komplikovaných intrauterinní růstovou retardací (IUGR) byla popsána snížená produkce IL-10 v oblasti deciduálního regionu a trofoblastu.⁹⁶

V naší práci jsme ale naopak prokázali negativní korelaci mezi BW a hladinou IL-10 v periferní krvi. Naše studie měla některé limity. Prvním omezením bylo, že biologický efekt cytokinů je daný souhrou mezi cytokiny a jejich solubilními receptory. Solubilní receptory nebyla ale v naší studii sledována. Body mass index (BMI) může ovlivňovat hladiny cytokinů stejně jako zvýšení hodnoty BMI může nezávisle na ostatních faktorech zvyšovat rizika komplikací v graviditě.⁹⁷ V naší studii nebyl BMI zavzat do statistické analýzy. Přes uvedenou limitaci naší studie považujeme nálezy zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α ve vztahu k hodnotám krevního tlaku u matek s GDM za inspirující pro další výzkum v dané oblasti a jejich využití v klinické praxi považujeme za reálné.

Schmidt et al. prokázali významné rozdíly v hladinách pro I protizánětlivých cytokinů při porovnání obezích a neobezích subjektů. Následující cytokiny byly zvýšeny u obezity celkově a zejména u centrální obezity: IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 a IFN- γ . Tyto nálezy neříkají zda cytokiny jsou příčinou nebo důsledkem obezity ani neobjasňují molekulární mechanismus účinku.⁹⁸ V další studii sérové koncentrace CRP, TNF- α a IL-6 byly signifikantně korelovány s váhou, BMI, obvodem pasu a poměrem pás-boky.⁹⁹ V naší studii referenční skupina byla zvolena, aby odpovídala svými charakteristikami hypertenzní skupině ve věku a BMI. Prokázali jsme větší vzestup BMI v referenční skupině ve srovnání s hypertenzní skupinou ve třetím trimestru. Tento nálezu podporuje naši hypotézu, že prozánětlivé cytokiny hrají významnou roli v regulaci krevního tlaku a průkaz zvýšení hladin cytokinů IL-6 a TNF- α není důsledkem změn v BMI ve třetím trimestru. Přes zmíněné limitace naší studie považujeme průkaz zvýšení prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α ve vztahu k SBP and DBP u matek s GDM za inspirující pro další výzkum.

11. Závěr

Prokázali jsme signifikantní korelaci mezi hladinami cytokinů TNF- α ; IL-6; IL-10 a SBP ve druhém trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); ve třetím trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.05$). Také jsme prokázali signifikantní korelace pro DBP ve druhém; třetím trimestru ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.0015$). Dále jsme prokázali statisticky významné zvýšení rizika PE pro skupinu high TNF- α ve třetím trimestru ($p=0.04$). Prokázali jsme signifikantní negativní korelaci mezi porodní hmotností a hladinami cytokinů TNF- α ; IL-10; IL-6 ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$). Predikce rozvoje preeklampsie je široce akceptována na podkladě zhodnocení více paramterů, protože žádný jednotlivý test nemá dostatečnou sílu průkazu, aby bylo možno posouzení pouze podle jednoho parametru. Skríning hladin cytokinů v periferní krvi (TNF- α ; IL-10; IL-6) během druhého trimestru se může zdát být předčasný, je nutné provést rozsáhlé cost-benefit analýzy v rámci rozsáhlých randomizovaných klinických studií. V naší studii byla minimální váha 2760 g, tedy žádné z dětí nenaplnilo kritéria pro nízkou porodní hmotnost (LBW). Naše výsledky podporují hypotézu, že prozánětlivý stav spojený se zvýšením hladin prozánětlivých cytokinů TNF- α ; IL-6 hraje významnou roli ve zvýšení SBP a DBP. Dále jsme prokázali negativní korelaci mezi TNF- α ; IL-6 a porodní hmotností. Naše výsledky jsou ve shodě s nálezy v odborné literatuře¹⁰⁰, kde hladiny cytokinů signifikantně ovlivnily růst plodu u žen revmatoidní artritidou. Naše výsledky potvrdily podobný efekt zvýšení prozánětlivých cytokinů u žen s GDM. Další studie jsou nepochybně nutné k objasnění asociace maternálních cytokinů a zvýšeného rizika komplikací v graviditě.

12. Literatura

1. Friedecký B., Kratochvíla J, Springer D, Prázný M, Zim T. Diabetes mellitus - laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů, *Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP Česká diabetologická společnost ČLS JEP*. Schváleno výborem ČSKB 9.12.2015.
2. Prevalence of Gestational Diabetes A Population-Based Analysis of a Nationwide Screening Program. *Deutsch Arztebl Int.* 2017 Jul; 114(24): 412–418.
3. Andělová, K., Anderlová, K., Čechurová, D., et al. Gestační diabetes mellitus – doporučený postup. *Česká Gynekol.*, 2015; 80, s. 459-461.
4. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 2017; 40: Suppl 1, 11-24.
5. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373:1773–9.
6. Alzaim M, Wood RJ. Vitamin D and gestational diabetes mellitus. *Nutr Rev* 2013; 71:158–67.
7. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358:1991–2002.
8. Szekeres-Bartho J. The Role of Progesterone in Feto- Maternal Immunological Cross Talk. *Med Princ Pract* 2018; 27:301–3078.
9. Toder V, Strassburger D, Irlin I, et al: Nonspecific immunopotentiators and pregnancy loss: complete Freund adjuvant reverses high fetal resorption rate in CBA/JxDBA/2 mouse combination. *Am J Reprod Immunol* 1990; 24: 63–66.
10. Komlos L, Zamir R, Joshua H, et al: Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol* 1977; 7: 330–335.
11. Croy BA, Ashkar AA, Foster RA et al. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol* 1997; 35:111–13.
12. Mellor A, Munn D: Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol* 2001, 13:213–218.
13. Saito S: Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2001, 47:87–10.
14. Aluvihare V, Kallikourdis M, Betz A: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004, 3:266–27.
15. Dealery GB, O Farrel MK, Fernandez N, The Th2 enviroment of the placenta. *Int Arch Alergy Immunol* 2000; 123 107-119.

16. Zenclussen A., Gerlof K, Zencluisse M. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion Adoptive Transfer of Pregnancy-Induced CD4CD25 T Regulatory Cells Prevents Fetal Rejection in a Murine Abortion. *American Journal of Pathology*, 2005; 166:3.
17. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116:74–80.
18. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013; 229(2):176–85.
19. August P, Lindheimer MD: Pathophysiology of preeclampsia. *Hypertension* 1995; 142:2407–2426
20. Raghupathy. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Seminars in Immunology* 2001; 13: 4,219–227.
21. Denney JM, Nelson P, Wadhwa D. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 2011; 53: 170–177.
22. Mosmann TR, Coffman L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 1989; 46:111–147.
23. Hanna N., Hleb M. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *Journal of Immunology* 2000; 164: 5721–5728.
24. S. Amu, M. Hahn-Zoric, A. Malik et al., Cytokines in the placenta of Pakistani newborns with and without intrauterine growth retardation. *Pediatric Research*, 2006; 59(2) 2 254-258.
25. J. H. Tinsley, S. South, V. L. Chiasson, and B. M. Mitchell, Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *American Journal of Physiology*, 2010; 298: 713–719.
26. Toshiyuki Sado, Takashi Kitanaka Anticytokine Therapy in Preterm Labor: Current Knowledge and Future Perspectives. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 71:1–10.
27. Elimian A, Verma U, Beneck D, Cipriano R, Visintainer P, Tejani N: Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes. *Obstet Gynecol* 2000; 96:333–336.
28. Kim SA, Park KH, Lee SM: Non-invasive prediction of histologic chorioamnionitis in women with preterm premature rupture of membranes. *Yonsei Med J* 2016; 57:461–468.
29. Shobokshi A, Shaarawy M: Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 79:209–215.
30. Murtha AP, Sinclair T, Hauser ER, Swamy GK, Herbert WN, Heine RP: Maternal serum cytokines in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 2007; 109:121–127.
31. Gulati S, Bhatnagar S, Raghunandan C, Bhattacharjee J: Interleukin-6 as a predictor of subclinical chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67:235–240.

32. Gulati S, Agrawal S, Raghunandan C, Bhattacharya J, Saili A, Agarwal S, Sharma D: Maternal serum interleukin-6 and its association with clinicopathological infectious morbidity in preterm premature rupture of membranes:a prospective cohort study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:1428–1432.
33. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW: Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342:1500–1507.
34. Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M. Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. *Am J Perinatol.* 2010; 27:631-40.
35. Caritis SN, Miodovnik M, Mercer BM, Thorp JM, O’Sullivan MJ, Ramin SM, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B: Maternal serum interleukin-6, C-reactive protein, and matrix metalloproteinase-9 concentrations as risk factors for preterm birth <32 weeks and adverse neonatal outcomes. *Am J Perinatol* 2010; 27:631–640.
36. Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10: 67–83.
36. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A: Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 198–206.
37. Henriksen T. Fetal nutrition, fetal growth restriction and health later in life. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 429:4–8.
38. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285–291.
39. Smerieri A, Petraroli M, Ziveri MA, Volta C, Bernasconi S, Street ME: Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PLoS One* 2011; 6: e29562.
40. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Yamada T, Hasegawa H, Nishimura H, Uchiyama M, Low Birthweight and Premature Birth Are Risk Factors for Podocytopenia and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2013; 38:149-157
41. Gargano JW, Holzman C, Senagore P, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Rahbar MH, Chung H: Mid-pregnancy circulating cytokine levels, histologic chorioamnionitis and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 2008; 79:100–110.

42. Dammann O, Leviton A, Maternal Intrauterine Infection, Cytokines, and Brain Damage in the Preterm Newborn. *Pediatric Research* 1997; 42:1-8.
43. Cobo T, Kacerovsky M, Palacio M, Hornychova H, Hougaard DM, Skogstrand K, Jacobsson B: A prediction model of histologicalchorioamnionitis and funisitis in preterm prelabor rupture of membranes: analyses of multiple proteins in the amniotic fluid. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:1995–2001.
44. Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70: 427-451.
45. Marsden PA, Brenner BM: Transcriptional regulation of the endothelin- 1 gene by TNF a. *Am J Physiol* 1992; 262:854–861.
46. Saito S: Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2001; 47:87–102.
47. Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70: 427-451.
48. Marsden PA, Brenner BM: Transcriptional regulation of the endothelin- 1 gene by TNFa. *Am J Physiol* 1992;262:C854–C861.
49. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF: WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367:1066–1074.
50. Duley L: The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33:130–137.
51. Zárate A, Saucedo R, Valencia J, Manuel L, Hernández M: Early disturbed placental ischemia and hypoxia creates immune alteration and vascular disorder causing preeclampsia. *Arch Med Res* 2014; 45: 519–524
52. Raghupathy R: Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med PrincPract* 2013; 22: 8–19.
53. Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, et al: Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood. *J Pregnancy* 2012; 2012: 684-7
54. Ortega J V, Zárate A, Saucedo R, Valencia M H, Cruz J G, Puello E. Placental Proinflammatory State and Maternal Endothelial Dysfunction in Preeclampsia *Gynecol Obstet Invest* 2019; 84:12–19.
55. Dekker GA, Kraayenbrink AA, Zeeman GG, van Kamp GJ: Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 40:215–22
56. Dekker GA, Sibai BM, Etiology and patogenesis of preeclampsia, current concepts. *Am J Obstet gynecol* 1998; 179: 1359-1375.
57. Robertson MJ, RitzJ Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421–2438.
58. Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E 1992 Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 6:409–417.
59. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F: Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16: 206–215.

60. Kobayashi H: Endogenous anti-inflammatory substances, inter- - inhibitor and bikunin. *Biol Chem* 2006; 387: 1545–1549.
61. Kanayama S, Yamada Y, Onogi A, Shigetomi H, et al. Molecular structure and function analysis of bikunin on down-regulation of tumor necrosis factor- expression in activated neutrophils. *Cytokine* 2008; 42:191-197.
62. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001 22:633–640.
63. Paganin C, Matteucci C, Cenzuales S, Mantovani A, Allavena P IL-4 inhibits binding and cytotoxicity of NK cells to vascular endothelium. *Cytokine* 1994; 6:135–140.
64. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Polgar B, Par G, Faust Z, Palkovics T, Szereday L The role gamma/delta T cells in progesteronemediated immunomodulation during pregnancy: a review. *Am J Reprod Immunol* 1999 42:44–48.
65. Maret A, Coudert JD, Garidou et al., Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:512–521.
66. Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav Immun* 1992; 6:409–417.
67. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F: Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16: 206–215.
68. Kobayashi H: Endogenous anti-inflammatory substances, inter- - inhibitor and bikunin. *Biol Chem* 2006; 3: 87: 1545–1549.
69. Lee JY, Kim EN, Hong J-S, et al. Diffuse decidual leucocytoclastic necrosis and NK cell aggregates: two distinct features of miscarriage. *J Clin Pathol* 2015;68:119–124
70. Fröhlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muche R, Brenner H, Koenig W: Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 2000; 23: 1835–1839.
71. Festa A, D’Agostino R Jr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM: Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102: 42–47.
72. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 972–978
73. Wolf M, Sandler L, Hsu K, Vossen-Smirnakis K, Ecker JL, Thadhani R: First-trimester Creactive protein and subsequent gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 819–824.

74. Bo S, Signorile A, Menato G, Gambino R, Bardelli C, Gallo ML, Cassader M, Massobrio M, Pagano GF: C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha in gestational hyperglycemia. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 779–786.
75. Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B: C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3507–3512.
76. D'Anna R, Baviera G, De Vivo A, Facciola G, Di Benedetto A, Corrado F: C-reactive protein as an early predictor of gestational diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2006; 51: 55–58.
77. Kuzmicki M, Telejko B, Zonenberg A, Szamatowicz J, Kretowski A, Nikolajuk A, Laudanski P, Gorska M: Circulating pro-and antiinflammatory cytokines in Polish women with gestational diabetes. *Horm Metab Res* 2008; 40: 556–560.
78. Morisset AS, Dubé MC, Côté JA, Robitaille J, Weisnagel SJ, Tchernof A: Circulating interleukin-6 concentrations during and after gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90: 524–53.
79. Shah D, Khalil R: Bioactive Factors in Uteroplacental and Systemic Circulation Link Placental Ischemia to Generalized Vascular Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Biochem Pharmacol.* 2015; 15: 211–226.
80. Wallace K, Richards S, Dhillon P, Weimer A, Edholm ES, Bengten E: CD4+ T-helper cells stimulated in response to placental ischemia mediate hypertension during pregnancy. *Hypertension* 2011; 57:949–55.
81. Kato T, Kassab S, Wilkins FC, Kirchner K, Keiser J, Granger JP: Endothelin antagonist improve renal function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25:883– 887.
82. Conrad KP, Benyo DF: Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 240 –249.
83. Sheu A, Chan Y1, Ferguson A, Bakhtyari MB, Hawke W, White C, Chan YF, Bertolino , Woon HG, Palendira Sierro F, Lau SM: A proinflammatory CD4⁺ T cell phenotype in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2018; 61:1633–1643.
84. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int.* 2002; 82:12–22.
85. Zhang ZH, Wei SG, Francis J, Felder RB: Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: 916–927.
86. Gadonski G., B. Babbette D. LaMarca, Elizabeth Sullivan: Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat Role of Interleukin 6. *Hypertension* 2006; 48: 711-716.
87. Saito S: Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2001; 47:87–100.

88. Raghuapathy R.: Cytokines as Key Players in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Med Princ Pract* 2013; 22: 8-19.
89. Redman CW, Sargent IL: Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21: 597–602.
90. Lockwood Ch, Chih-Feng Yen, Murat Basar, Umit A. Kayisli: Preeclampsia-Related Inflammatory Cytokines Regulate Interleukin-6 Expression in Human Decidual Cells *Am J Patol* 2008; 172(6): 1571–1579.
91. Peraçoli JC1, Rudge MV, Peraçoli M: Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007; 57:177-85.
92. LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP: Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat. Role of tumor necrosis factor. *Hypertension* 2005; 46:1022–1025.
93. Powers RW, Bodnar LM, Ness RB: Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194:160.
94. Bartha JL1, Romero-Carmona R, Comino-Delgado R: Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:1099-1102.
95. J. H. Tinsley, S. South, V. L. Chiasson, and B. M. Mitchell: Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *American Journal of Physiology*, 2010; 298: 713–719.
96. Amu S, Hahn-Zoric, A. Malik: Cytokines in the placenta of Pakistani newborns with and without intrauterine growth retardation. *Pediatric Research* 2006; 59:254-258.
97. Curry AE, Vogel I, Skogstrand K: Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. *J Reprod Immunol* 2008; 77:152–60.
98. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka: T Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS ONE* 2015; 10:3.
99. Park Hs, Park J, Yu R: Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69:29-35.
100. De Steenwinkel FD, Hokken-Koelega AC, de Man YA, de Rijke YB, de Ridder MA, Hazes JM: Circulating maternal cytokines influence fetal growth in pregnant women with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72:1995–2001.

13. Seznam zkratek

TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-17	Interleukin 17
SBP	Systolický krevní tlak
DBP	Diastolický krevní tlak
PE	Preeklampsie
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
IFG	Impaired fasting glucose
IGT	Impaired glucose tolerance
FPG	Fasting plasma glucose
WHO	World Health Organisation
Treg CD	T regulační lymfocyty -povrchový antigen
Th	Pomocné T lymfocyty
TGF- β	Tumor growth factor- β
PROM	Předčasný porod s rupturou mebrán
IUGR	Intrauterine growth restriction
SGA	Small for gestational age
JAK	Janus kinázy
STATs	Transkripční faktory a aktivátory
PIH	Pregnancy induced hypertension
ATP	Adenosin trifosfát
LBW	Nízká porodní hmotnost
VLBW	Velmi nízká porodní hmotnost
ICAM	Intercellular adhesion molecule
RUPP	Redukce uterinního perfúzního tlaku

UA	Kyselina močová
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
PIBF	Progesteron induced blocking factor

14. Tabulky a grafy

14.1 Tabulky

Tabulka 1 Klinické, imunologické, metabolické charakteristiky referenční a hypertenzní skupiny v jednotlivých obdobích

Charakteristika	Hypertenzní skupina (n=20)		Referenční skupina(n=20)	
	Průměr	SD	Průměr	SD
Věk v době porodu (roky)	33.55	2.67	34.10	3.24
Parita (%)				
Nullipara	52.6		50.1	
Multipara	47.4		49.9	
BMI - jednotlivá časová období (kg/m²)				
Trimestr 2	28.14	4.76	28.72	5.23
Trimestr 3	27.27	7.49	29.46	4.83
Cytokiny hladiny - jednotlivá časová období				
IL-6				
Trimestr 2	2.74	2,96	0.5	0.0
Trimestr 3	4.70	5.49	0.5	0.0
IL-10				
Trimestr 2	3.04	3.91	0.57	0.28
Trimestr 3	2.64	2.46	0.96	0.72
TNF-α				
Trimestr 2	2.65	1.02	2.0	0.0
Trimestr 3	4.07	2.89	2.00	0.0
C-peptid -jednotlivá časová období (ug/l)				
Trimestr 2	2.35	0.66	2.24	0.78
Trimestr 3	1.60	0.32	2.83	1.11
HOMA-IR -jednotlivá časová období				
Trimestr 2	2.47	1.26	2.85	1.93

Trimestr 3	2.04	1.05	2.7	1.59
Průměrný systolický krevní tlak (SBP) v jednotlivých časových obdobích				
Trimestr 2	143.98	5.15	117.08	5.25
Trimestr 3	143.63	6.73	117.55	5.65
Průměrný diastolický krevní tlak (DBP) v jednotlivých časových obdobích				
Trimestr 2	89.25	2.84	70.0	4.0
Trimestr 3	88.95	5.26	70.13	3.01
Preeklampsie případy (n)	3		0	
Novorozenci				
Průměrná porodní váha (g)	3276.7	278.2	3506.0	165.0
Porod v týdnu gestace (wk)	38.75	1.70	39.25	0.77
Průměrné hodnoty (váha/věk percentily)	53.0	18.3	61.2	18.5

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr (SD) nebo medián detekovatelný (IQR), pokud není uvedeno jinak.

Hodnoty uvedeny jako průměr ± SD

Tabulka 2. Porovnání hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA1c) referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích

Charakteristika		
Glykovaný hemoglobin (HbA1c)	Hypertenzní skupina	Referenční skupina
Trimestr 2		
Průměr	35.05	34.60
SD	4.45	5.62
Rozdíl (p-hodnota)	0.78	
Trimestr 3		
Průměr	35.68	35.16

SD	3.92	6.14
Rozdíl (p-hodnota)	0.75	

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr±SD, statisticky významné hodnoty p-hodnota<0.05

Tabulka 3. Hodnoty SBP srovnání mezi skupinami low a high, subjekty byly rozděleny do dvou skupin podle mediánu podle mediánu hladin cytokinů (IL-6; TNF- α ; IL-10): skupina low měla hodnotu nižší než medián, skupina high měla hodnotu vyšší než medián

Charakteristika	Trimestr 2		Trimestr 3	
	low IL-6	high IL-6	low IL-6	high IL-6
Průměr	119.12	144.48	117.55	143.63
SD	8.28	5.19	5.65	6.73
p-hodnota	<0.001 $\phi\phi$		<0.001 $\phi\phi$	
	low TNF- α	high TNF- α	low TNF- α	high TNF- α
Průměr	126.65	146.08	123.36	145.62
SD	13.38	6.48	11.17	7.53
p-hodnota	<0.001 $\phi\phi$		<0.001 $\phi\phi$	
	low IL-10	high IL-10	low IL-10	high IL-10
Průměr	123.19	144.17	120.31	136.76
SD	11.67	8.13	7.14	14.47
p-hodnota	<0.001 $\phi\phi$		0.0019 ϕ	

Pokud není uvedeno jinak, hodnoty jsou průměr (SD) nebo medián detektovatelný (IQR), statistická významnost je hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu

ϕ P<0.05, $\phi\phi$ P<0.01

Tabulka 4 Spearmanův korelační koeficient sledovaných parametrů (SBP; DBP), porodní váha, týden gestace v době porodu ve vztahu k hladinám cytokinů (TNF- α , IL-6, IL-10) a UA všechny subjekty.

Charakteristika	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-6/IL-10	
				ratio	UA
Trimestr 2					
Průměr SBP	0.55 $\phi\phi$	0.81 $\phi\phi$	0.84 $\phi\phi$	0.13	-0.02
Průměr DBP	0.52 $\phi\phi$	0.76 $\phi\phi$	0.79 $\phi\phi$	0.11	0.01
Porodní váha (g)	-0.32 ϕ	-0.51 $\phi\phi$	-0.56 $\phi\phi$	0.07	0.27
Týden porodu	-0.26	-0.24	-0.15	0.42	-0.03
Trimestr 3					
Průměr SBP	0.75 $\phi\phi$	0.45 ϕ	0.85 $\phi\phi$	0.84 $\phi\phi$	0.13
Průměr DBP	0.70 $\phi\phi$	0.49 ϕ	0.87 $\phi\phi$	0.86 $\phi\phi$	0.11
Porodní váha(g)	-0.53 ϕ	-0.27	-0.51 $\phi\phi$	-0.58 $\phi\phi$	0.12
Týden porodu	-0.27	-0.03	-0.08	-0.13	-0.26

Statistická významnost je hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ϕ $P < 0.05$, $\phi\phi$ $P < 0.01$

Tabulka 5. Riziko rozvoje PE porovnání skupiny low a high, subjekty jsou rozděleny do dvou skupin na podkladě mediánu hladin cytokinů (IL-6; TNF- α ; IL-10): skupina low má hodnoty nižší než medián, skupina high má hodnoty vyšší než medián. Data jsou prezentována jako relativní frekvence (%).

Charakteristika		
Trimestr 3	low IL-6	high IL-6
Relativní frekvence (%)	0	10
p-hodnota	0.15	
	low TNF- α	high TNF- α
Relativní frekvence (%)	0	15.38
p-hodnota	0.04 ϕ	
	low IL-10	high IL-10

Relativní frekvence (%)

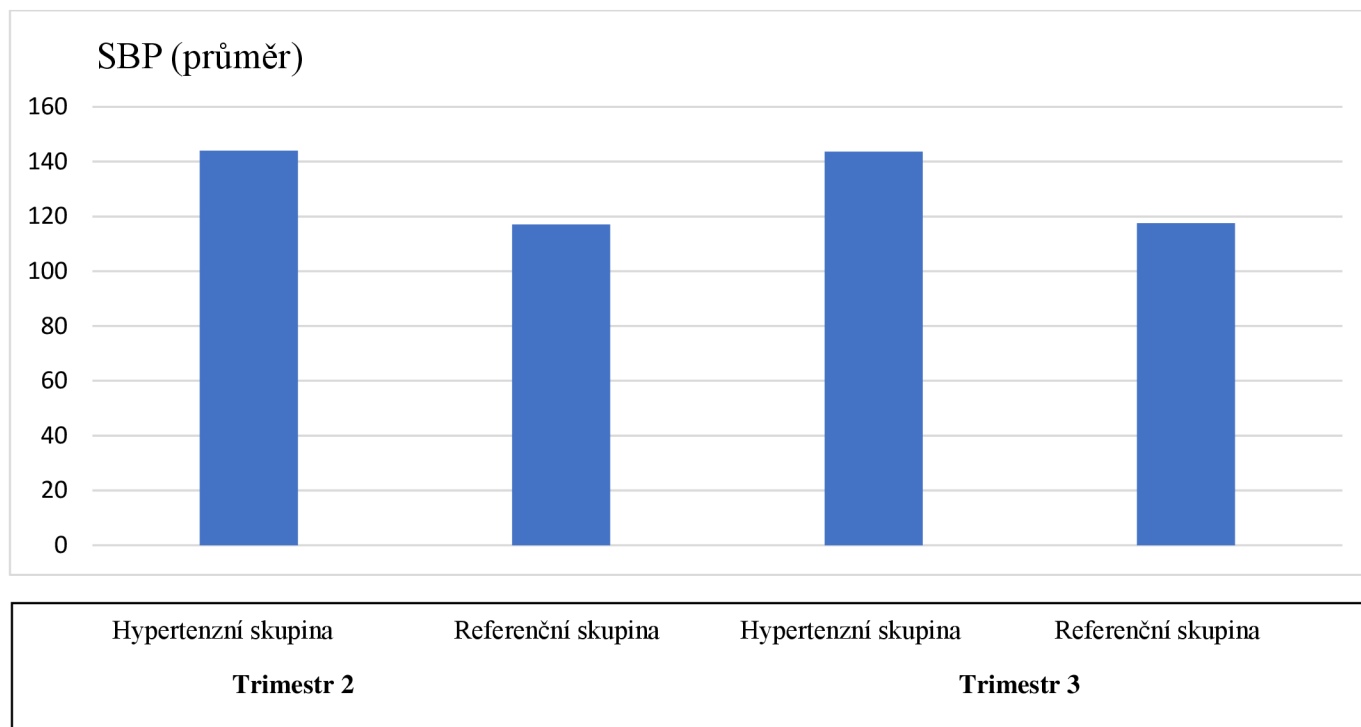
p-hodnota

0.26

Statistická významnost je získána pomocí Chi-square testu, , φ $P < 0.05$, $\varphi\varphi$ $P < 0.01$

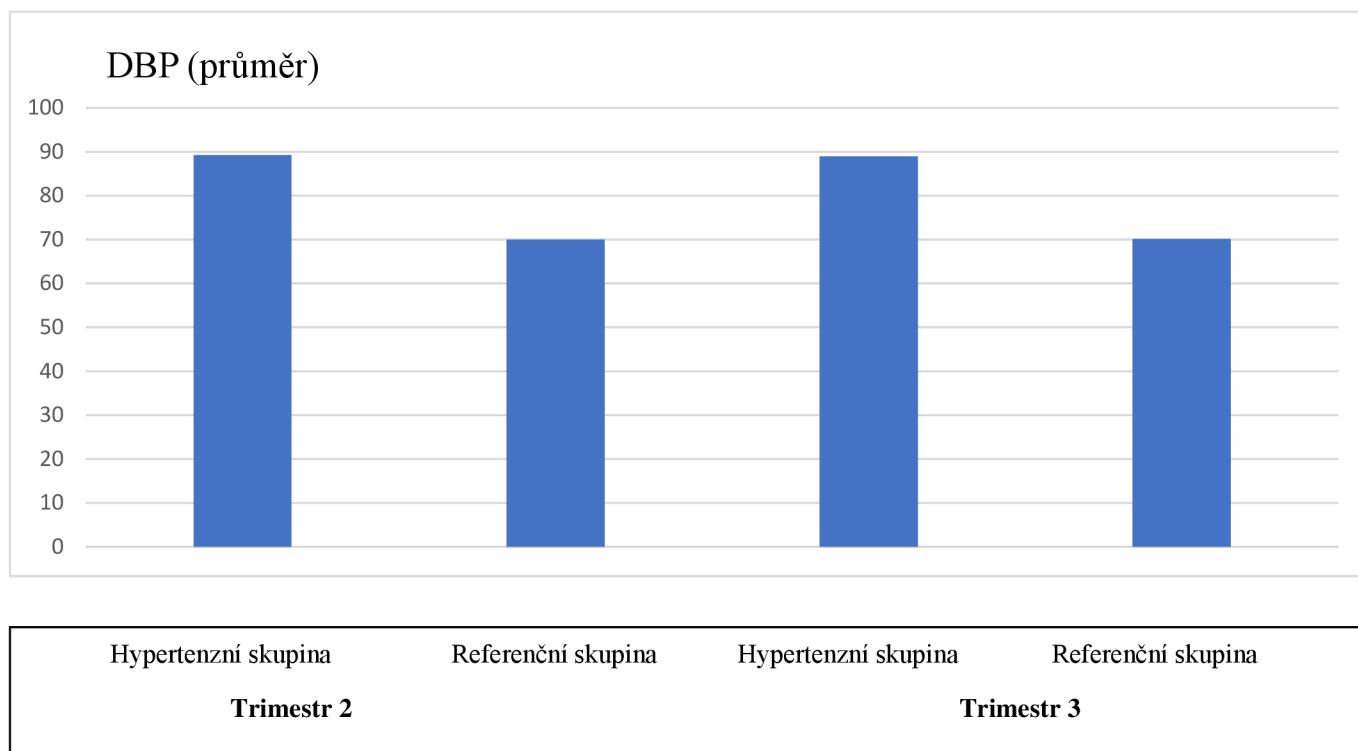
14.2 Grafy

Graf 1. Porovnání hodnot SBP referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích. Ve druhém a třetím trimestru jsme potvrdili statisticky významný rozdíl v SBP mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.001$; $p < 0.001$).



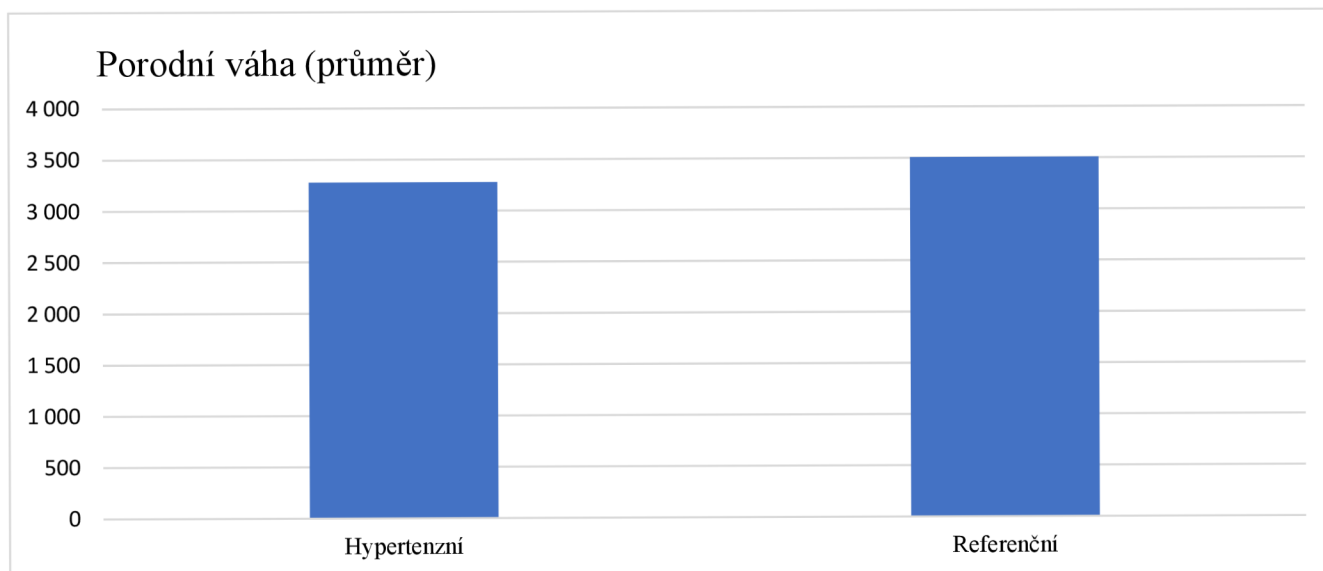
Statistická významnost je hodnocena dle Student t-testu, hodnoty uvedeny jako průměr (mm Hg).

Graf 2. Porovnání hodnot DBP referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích. Ve druhém a třetím trimestru jsme potvrdili statisticky významný rozdíl v DBP mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.001$; $p < 0.001$).



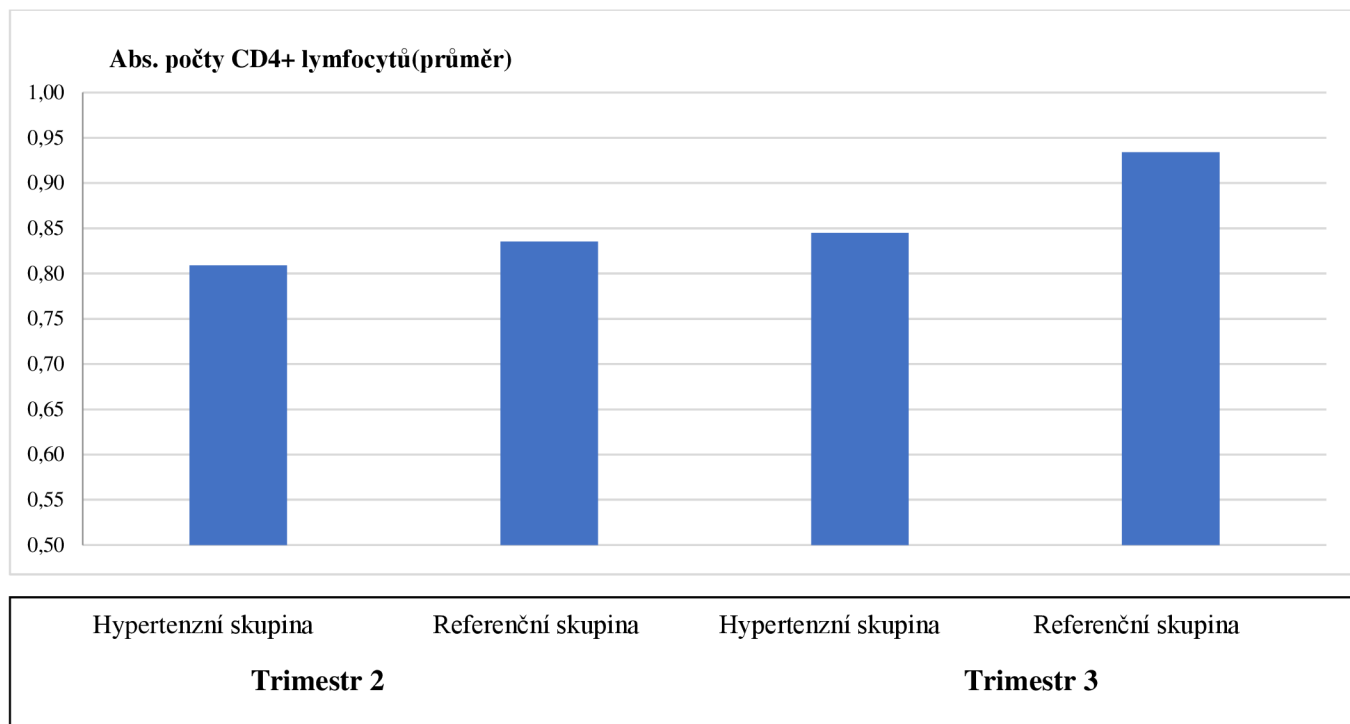
Statistická významnost je hodnocena dle Student t-testu, hodnoty uvedeny jako průměr (mm Hg).

Graf 3. Porovnání hodnot porodní váhy mezi referenční a hypertenzní skupinou, prokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.05$).



Statistická významnost je hodnocena dle Studentova t-testu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr (g).

Graf 4. Porovnání absolutních hodnot CD4+ lymfocytů (periferní krev) v referenční a hypertenzní skupině v jednotlivých časových obdobích, neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p=0.76; 0.42$).



Statistická významnost je hodnocena podle Studentova t-testu, hodnoty uvedeny jako $\times 10(9)/l$ CD4+.

15. Seznam tabulek

Tab. 1 - Klinické, imunologické, metabolické charakteristiky referenční a hypertenzní skupiny v jednotlivých obdobích.

Tab. 2- Porovnání hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA1c) referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích.

Tab. 3 - Hodnoty SBP srovnání mezi skupinami low a high, subjekty byly rozděleny do dvou skupin podle mediánu podle mediánu hladin cytokinů (IL-6; TNF- α ; IL-10): skupina low měla hodnotu nižší než medián, skupina high měla hodnotu vyšší než medián.

Tab. 4 Spearmanův korelační koeficient sledovaných parametrů (SBP; DBP), porodní váha, týden gestace v době porodu ve vztahu k hladinám cytokinů (TNF- α , IL-6, IL-10) a UA všechny subjekty.

Tab. 5 Riziko rozvoje PE porovnání skupiny low a high, subjekty jsou rozděleny do dvou skupin na podkladě mediánu hladin cytokinů (IL-6; TNF- α ; IL-10): skupina low má hodnoty nižší než medián, skupina high má hodnoty vyšší než medián. Data jsou prezentována jako relativní frekvence (%).

16. Seznam grafů a schémat

Schéma 1: Úloha cytokinů IL-4 a IL-12 v procesu regulace Th1/Th2 reaktivní fáze

Schéma 2: Cytokiny IL-2, IL-4 a IL-10 v procesu symetrické regulace Th1/Th2 fáze

Schéma 3: Paradigma poměru Th1/Th2/Th3 imunitní reakce. Cytokiny Th2 a Th3 reakce: interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) a tumor growth factor- β (TGF- β) umožňují zachování a pokračování těhotenství, zatímco excesivní produkce Th1 cytokinů [interleukin-1 (IL-1), interferonu gamma a tumor necrosis factoru- α (TNF- α)] vede k rejekci plodu

Graf 1: Porovnání hodnot SBP referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích. Ve druhém a třetím trimestru jsme potvrdili statisticky významný rozdíl v SBP mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.001$; $p < 0.001$).

Graf 2: Porovnání hodnot DBP referenční a hypertenzní skupina v jednotlivých časových obdobích. Ve druhém a třetím trimestru jsme potvrdili statisticky významný rozdíl v SBP mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.001$; $p < 0.001$).

Graf 3: Porovnání hodnot porodní váhy mezi referenční a hypertenzní skupinou, prokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p < 0.05$).

Graf 4: Porovnání absolutních hodnot CD4+ lymfocytů (periferní krev) v referenční a hypertenzní skupině v jednotlivých časových obdobích, neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi hypertenzní a referenční skupinou ($p = 0.76$; 0.42).

17. Přílohy

17.1 Originální práce s IF

Název práce: **Žák P.**, Souček M. Correlation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and interleukin 10 with blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes

Časopis Physiological Research, ISSN 0862-8408, akceptováno k tisku

SCOPUS Impact Factor 2017: 1.46 CURRENT IF March 8, 2019: 1.66

Correlation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and interleukin 10 with blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes

P. ŽÁK¹, M. SOUČEK¹

¹Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

Several pathophysiological mechanisms have been proposed in the development of pregnancy complications, including endothelial dysfunction, an inflammatory pathway and oxidative stress. The aim of the present study was to evaluate the correlation between proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and dual cytokine IL-10 in the mother's peripheral blood and systolic blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes (GDM).

We observed 40 women with GDM divided into a gestational hypertension group (n = 20) and comparison group (n = 20) with normal blood pressure. We found a significant positive correlation between TNF- α ; IL-6; IL-10 levels and systolic blood pressure (SBP) in the second trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.001); the third trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.05). We also proved correlations for diastolic blood pressure (DBP) during the second; third trimester (p <0.001; p <0.001; p <0.001); (p <0.001; p <0.001; p <0.0015). We demonstrated a statistically significant positive association between high TNF- α group and preeclampsia risk in the third trimester (p = 0.04). We also determined the negative correlation in the second trimester between birth weight and TNF- α ; IL-6, IL-10 levels (p <0.05; p <0.001; p <0.001). To conclude, our data highlight the importance of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in blood pressure regulation. In addition high levels of TNF- α have been associated with increased risk of preeclampsia. We found a significant negative correlation between levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and birth weight.

Key words: Hypertension • Preeclampsia • Interleukin 6 • Tumor necrosis factor alpha • Low birth weight

Corresponding author

P. Zak, Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic. Email: petr.zak@fnusa.cz

Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as diabetes diagnosed in the second or third trimester of pregnancy that was not clearly overt diabetes prior to gestation. Approximately 7% of all pregnancies are complicated by GDM. The prevalence may range from 1 to 14% of all pregnancies, depending on the population studied. Types 1 and 2 pregestational diabetes confer significantly greater maternal and fetal risk than GDM. In general, specific risks of uncontrolled diabetes in pregnancy include spontaneous abortion, fetal anomalies, preeclampsia, fetal demise, macrosomia, neonatal hypoglycemia, and neonatal hyperbilirubinemia, among others (ADA Standards of Diabetes Care 2018). As early as 1995 announced the original Th1/Th2 paradigm is based on Wegmann's statement: 'successful pregnancy is a Th2 phenomenon'. In pregnancy Th1-associated cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF)- α and interferon gamma and in general induction of an inflammatory response were associated with fetal demise (Chaouat *et al.* 2004). The production of Th2-type cytokines IL-4 and IL-10 may promote fetal survival by inhibiting Th1 reactivity (Azizieh *et al.* 2015). Many studies have reported a predominant Th2-type immunity and suppressed Th1-type immunity during normal pregnancy. In a normal pregnancy the levels of cytokines in the mother's serum are not always detectable. Elevated levels of cytokines in the mother's peripheral blood can initiate a cascade of inflammatory processes and lead to complications in a so far normal pregnancy (Lash *et al.* 2015). Elevated levels of cytokines can be the cause of placental dysfunction, which may result in intrauterine growth restriction (IUGR) or premature birth (PTB) (Challis *et al.* 2009). De Steenwinkel *et al.* proposed a hypothesis, that the levels of

maternal cytokines can significantly influence the growth of the fetus in women with rheumatoid arthritis (RA). They proved, that in the mother's serum during the first trimester, increased levels of interleukin 10 (IL-10) are associated with higher birth weight, and increased levels of interleukin 6 (IL-6) are associated with lower birth weight (De Steenwinkel *et al.* 2013). In studies on pregnant women, it has been proven that both TNF- α and IL-6 induce structural and functional changes of endothelial cells. Endothelial dysfunction is associated with many forms of hypertension and was, in human studies, at least partially mediated by increased levels of proinflammatory cytokines (Saito *et al.* 2001). Preeclampsia (PE) affects 5 to 8% of pregnancies and imposes a significant burden on the health care system with high maternal and fetal morbidity, intrauterine growth restriction (IUGR) and preterm birth. Without timely intervention, PE is conducive of a more grievous clinical picture of maternal seizures and convulsions which could culminate into coma and death (Shah *et al.* 2015). An up-regulation of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-18) was described in pregnancies complicated by PE (Wang *et al.* 1996), other studies have proved a decrease in levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 (Hennessy *et al.* 1999). Only a small number of studies analyzed the role of cytokines in the pathophysiology of oxidative stress in GDM. In current literature, we will find the cytokine TNF- α to be the most significant predictor of insulin resistance in pregnancy (Kirwan *et al.* 2002). However, other cytokines such as IL-6, IL-8 also significantly participate in the pathogenesis of insulin resistance in GDM (Gomes *et al.* 2013). In conclusion, current literature shows the importance of cytokines in the acceleration of proinflammatory state, in both GDM itself, and in the pathogenesis of certain pregnancy complications: hypertension, PE, low birth weight.

The aim of the present study was to evaluate the correlation between proinflammatory cytokines TNF- α ; IL-6 and dual cytokine IL-10 in the mother's peripheral blood and the development of pregnancy complications: increase of systolic blood pressure (SBP); diastolic blood pressure (DBP), risk of PE, low birth weight in women with GDM and gestational hypertension (hypertension group), and comparison group with GDM and normal levels of blood pressure (reference group).

Methods

The study has been approved by an ethics committee of St. Anne's University Hospital in Brno. There were 40 women with GDM included in the observations, divided into two groups, 20 women with GDM and gestational hypertension, and 20 women with GDM and normal blood pressure levels.

GDM criteria were as follows (one or more of the following criteria were met in pregnancy): fasting plasma glucose 5,1-6,9 mmol/l, 1-hour plasma glucose \geq 10,0 mmol/l, 2-hour plasma glucose \geq 8,5 mmol/l following a 75g oral glucose load. These women were monitored at the diabetes centre of St. Anne's University Hospital in Brno. All the women involved signed an informed consent before starting the study. To participate, subjects in gestational hypertension group, had to have in documentation new-onset hypertension occurring after 20 weeks' gestation. Blood pressure (BP) values measured at routine clinical visit in a gynecologist's office at 22 weeks' gestation had to be as

follows: SBP \geq 140 mm Hg and/or DBP \geq 90 mm Hg, reference group: women without an adverse obstetric history with normal blood pressure, i.e. lower than hypertension threshold in referred week of gestation. The reference group was chosen to fit the characteristics of the hypertension group in age, BMI and diabetes compensation (HbA1c levels). Subjects were not engaged in the study if at least one of the following criteria were met: chronic hypertension, history of drug treatment of dyslipoproteinemia, chronic diseases of the immune system, neurological disorders, malignancy, women who were smokers before and during their pregnancy. The control group comprised a consecutive sample of pregnant women followed-up at our setting and undergoing routine late second or third-trimester blood analysis and with none of the exclusion criteria. Tight control of glycemia level was maintained throughout study duration using diabetic diet. Since insulin was required to achieve glycemic control, we chose basal insulin to keep fasting glycemia in target range according to the established recommendations of the Czech Diabetes Society. BP levels were taken before the peripheral blood examination was carried during the second trimester (26. week) and the third trimester (38. week) in a quiet clinic room. For those who were engaged in the study, their BP was measured three times using an Oscillometric BP device (Omron Diagnostics) after an initial five-minute rest period. This typically occurred in a fasting state and in the morning. Three consecutive recordings were made 30 seconds apart. In this gestational hypertension group, the condition was treated according to the established recommendations of the Czech Diabetes Society. No adjustments to the treatment of these patients were put in place due to their participation in the trial. Methyldopa (a centrally acting adrenergic antagonist) was the first choice of antihypertensive agent prescribed to treat this condition. Betaxolol (beta-blocker) was a 2nd alternative treatment. The percentages of subjects; average dosages in mg per day were as follows: monotherapy of methyldopa (85; 164), monotherapy of betaxolol (0;0), a combination (betaxolol+methyldopa) (15; 437.50). Other classes of antihypertensive drugs were not used.

The peripheral blood examination was carried out from the venous plasma after 8 hours of fasting during the second trimester (26. week) and the third trimester (38. week) of pregnancy. From the immunological parameters we monitored the levels of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10, T lymphocyte and NK cells surface antigen expression, absolute count of CD4+ cells. To assess the Th1/Th2 immunological profile ratio we chose ratio of Th 1 cytokine IL-6/Th 2 cytokine IL-10. To evaluate activation of cell-mediated immunity we chose absolute counts of CD4(+) T cells, from the metabolic parameters we monitored glycaemia, glycated hemoglobin A1c (HbA1c), plasma uric acid (UA), immunoreactive insulin (IRI) and basic biochemical parameters. After centrifugation, all samples were frozen at -80°C until assayed. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF α were determined using Sandwich ELISA, Biotin-labelled antibody kits (Biovendor Research and Diagnostic Products): HUMAN INTERLEUKIN - 6 high sensitivity ELISA, HUMAN INTERLEUKIN - 10 high sensitivity ELISA, TNF-alpha Human High Sensitivity ELISA. The lower limit of quantification was IL-10, 1.0; IL-6 1.0; TNF- α 4.0. All cytokine levels are presented in pg/ml. Clinical characteristics were collected by medical record and physical examination. They included maternal age and gynecological history. From the acquired readings we calculated hepatic IR using the equation of Matthews et al. (HOMA-IR = (FPI x FPG) /22.5), where FPI stands for fasting plasma insulinaemia (mU/l), FPG for fasting plasma glycaemia (mmol/l) (Matsuda *et al.* 1999). Preeclampsia has been defined as blood pressure: 140 mm Hg or higher

SBP or 90 mm Hg or higher DBP after 20 weeks of gestation and proteinuria of at least 300 mg in a 24-hour urine collection. Gestational hypertension was defined as new-onset hypertension (SBP \geq 140 mm Hg and/or DBP \geq 90 mm Hg), occurring after 20 weeks' gestation (Wagner *et al.* 2004). Low birth weight (LBW) was defined by the W.H.O. criteria as a birth weight of less than 2500 g (up to and including 2499 g), the birth weight of an infant was the first weight recorded after birth. W.H.O. Infant Weight for Age Percentiles (newborns) calculation was used to calculate weight-for-age percentiles. Preterm infants are those born at <37 wk from first day of the last menstrual period, regardless of birth weight (Cutland *et al.* 2017). The observed parameters to be considered at the onset of labor include: week of gestation, mode of delivery (natural; cesarean section), labor induction, other labor complications.

Statistics

In terms of quantity, descriptive statistics of a sample includes: mean, median, standard deviation, min and max. For categorical variables, absolute frequencies (N) and relative frequencies (%) are calculated. Comparison of means (SBP; DBP; birth weight; absolute CD4+count) obtained in the second and third trimester on reference group and gestational hypertension group was done using Student t-test. The values of TNF- α , IL-10, IL-6 and UA were divided according to its median in a group with values lower than the median "low" and higher than the median "high". After completing the analysis of the acquired data, we could state that the sample was equally divided. When the cytokine level was not in sample measurable, the median of the detectable cytokine levels was taken. The Kruskal-Wallis test was chosen to analyze the difference between the groups "low" and "high" in SBP. It is a non-parametric method of testing that doesn't assume normal distribution, therefore being suitable for the comparison of two small sample groups, which corresponded the size of our analyzed sample, p-value is the resultant. A Chi-square test was chosen to evaluate the relationship between SBP and PE risk in a group low; high for IL-6; TNF- α ; IL-10 cytokines (the Chi-square test is intended to test if there is statistically significant difference in terms of frequencies between two categories). To evaluate the correlation between cytokine levels IL-6; TNF- α ; IL-10 and birth weight; systolic blood pressure SBP; diastolic blood pressure DBP variables, correlation matrix, that shows Spearman's rho correlation, was chosen. The Spearman's rank correlation coefficient, is a non-parametric measure of relation between variables using ranks to calculate the correlation. Sometimes, Spearman's correlation is defined as Pearson's correlation coefficient between rank variables. While Pearson's correlation describes how well relationship between variables can be described using linear function, Spearman's correlation assesses how well the relationship between variables can be described using a monotonic function. Statistically significant correlations are marked bold.

Results

The descriptive statistics of acquired readings is shown in Table 1. To assess the level of glycemic control achieved by each group we chose measurement of HbA1c level. There was no statistically significant difference in diabetes compensation (HbA1c levels) between hypertension and reference group in the second; third semester (p=0.78; p=0.75) (Table 2). In the second and third trimester we proved a statistically significant difference in SBP (Fig.1);

DBP (Fig. 2) between hypertension and reference group ($p < 0.001$; $p < 0.001$); ($p < 0.001$; $p < 0.001$). An interesting situation, regarding levels of IL-6, occurred after analyzing the acquired data. The median was the same as the minimum (more than 50% of the observed were equal to minimum i.e. 0,5). Therefore, we divided the observed sample of IL-6 into “low IL-6” for values up to 0,5 and inclusive and “high IL-6” for values above 0,5. Analogically, we used the same method for tracked levels of TNF- α , IL-10 and uric acid, dividing them according to the median into a group with a lower value than the median “low” and a higher than the median “high”. For the analysis between groups “low” and “high” in SBP, we chose the Kruskal-Wallis test. The analysis’ outcome of the mean SBP value in second and third trimester for groups low IL-6; high IL-6 (Table 3) Fig. 1, groups low TNF- α ; high TNF- α (Table 3) Fig. 2, groups low IL-10; high IL-10 (Table 3) Fig. 3. The relation was evaluated at a 5% level of significance, we proved a statistically significant difference in IL-6 ($p < 0.001$; $p < 0.001$), TNF- α ($p < 0.001$; $p < 0.001$), IL-10 ($p < 0.001$; $p = 0.0019$) (Table 2 3). After using the correlation matrix (Spearman correlation rho), we analyzed the correlation between IL-6; TNF- α ; IL-10 cytokine levels and SBP. We found a significant correlation between SBP and IL-6; TNF- α IL-10 levels in the second trimester 0.84; 0.55; 0.81 ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); the third trimester 0.85; 0.75; 0.45, ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.05$). We also proved correlations for DBP during the second; third trimester 0.79; 0.52; 0.76 ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); 0.87; 0.70; 0.49 ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.0015$) (Table 4). Using the Chi-square method of testing, we analyzed the relation between the cytokine levels and the risk of development of pregnancy complications. Where we proved a statistically significant relation between high TNF- α group and PE risk in the third trimester ($p = 0.04$), without the proof of statistically significant association for cytokine levels IL-6; IL-10 (Table 5). In the second trimester, the increase of PE risk didn’t reach a statistical significance for any of the monitored cytokines (data not shown).

We found the statistically significant difference in the birth weight ($p < 0.05$) (Fig. 3), while we did not prove statistically significant difference in the weight-for-age percentiles ($p = 0.17$) between hypertension and reference group. The evaluation of correlation coefficient for birth weight during the second trimester, proved statistically significant negative correlations for all the monitored cytokine levels TNF- α ; IL-10; IL-6 (-0.32; -0.51; -0.56), p -values ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$). In the third trimester, there were also negative correlations (-0.53; -0.27; -0.51), p -values ($p < 0.05$; $p = 0.096$; $p < 0.001$), thus IL-10 not reaching values of statistical significance. For our chosen Th1/Th2 immunological profile ratio of change (ratio IL-6/IL-10), we did not prove a statistically significant correlation with birth weight in the second trimester, but we have proved this correlation in the third trimester $p < 0.001$ (Table 4). To evaluate activation of cell-mediated immunity we chose absolute CD4(+) T cell count, we did not prove a statistically significant difference in the second and third trimester, between hypertension and reference group ($p = 0.76$; 0.42) (Fig. 4). There were no statistically significant differences between hypertension and reference group in peripheral blood leukocytes levels in the second trimester ($p = 0.18$), while we found statistically significant difference in the third trimester ($p = 0.04$). There were no statistically significant correlations between the levels of uric acid UA and the levels of TNF- α ; IL-10; IL-6 (data not shown), we did not prove the correlation between uric acid UA and the risk of PE or birth weight value. Low birth weight (LBW) is defined as a birth weight of less than

2500 g (up to and including 2499 g), as per the World Health Organization (Meikle *et al.* 2002). In our study, the minimum observed birth weight was 2760 g, thus none of the subjects met criteria for low birth weight. In addition levels of monitored cytokines TNF- α ; IL-10; IL-6 in the second trimester; third trimester did not statistically significantly correlate with the week of delivery (Table 4). We chose a level of proinflammatory cytokine IL-6 and tested whether there is a statistically significant difference between the hypertension and reference group. Obvious and unambiguous differences are observed between the control and hypertension group. In the second trimester, 100% of the observed reference group had a low IL-6, while only 10% of the hypertension group had a low IL-6 and 90% i.e. 18 had high IL-6 ($p < 0.001$). In the third trimester, 100% of the hypertension group had high IL-6 and all the low's IL-6 belong to the reference group.

Discussion

We assumed, that the levels of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α are an important part of the blood pressure control in pregnancy. This hypothesis, based on our acquired data, appears to be true. We have proved, that the mean SBP value is significantly higher for high IL-6 group, both in the second and third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$). Also, the elevation of mean SBP for high TNF- α group was statistically significant in both the second and third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$). There was also a proven statistically significant association between group low IL-10 and elevation of mean SBP in the second; third trimester ($p < 0.001$; $p = 0.019$). We found a significant positive correlation between TNF- α ; IL-6; IL-10 levels and SBP in the second trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); the third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.05$). We also proved correlations for DBP during the second; third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.0015$). Hence, our results support the hypothesis, that a proinflammatory state, (which in our opinion is significantly influenced by the elevated levels of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α with a possible deficit of anti-inflammatory IL-10), is associated with higher levels of blood pressure. Gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension are common, and their relation is not well understood. A population-based case-control study was conducted using 1992–1998, consecutive cases of pregnancy-induced hypertension were divided into four: eclampsia, severe preeclampsia, mild preeclampsia, and gestational hypertension. Cases were compared with controls who did not have pregnancy-induced hypertension. Gestational diabetes was more common in each case group (3.9% in eclamptics, 4.5% in severe preeclamptics, and 4.4% in both mild preeclamptics and those with gestational hypertension) than in controls (2.7%). After adjustment gestational diabetes was associated with increased risk of severe preeclampsia odds ratio (OR) = 1.5, mild preeclampsia OR = 1.5 and gestational hypertension OR = 1.4. PE is a pregnancy-associated disorder characterized by hypertension. In PE, cytokines such as TNF- α modify the expression of adhesion molecules in placental vessels, apoptosis of trophoblasts. Thus reduces trophoblast invasion and promotes placental ischemia. Defective placentation and decreased trophoblast

invasion cause reduction in uteroplacental perfusion pressure (RUPP) and placental hypoxia. RUPP could stimulate the release of circulating bioactive factors, that cause imbalance with the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor or cause the release of inflammatory cytokines, reactive oxygen species, hypoxia-induced factor-1. The circulating bioactive factors target endothelial cells causing generalized endothelial dysfunction. Decreased vasodilators and increased vasoconstrictors such as endothelin-1 and thromboxane A2, lead to increased vasoconstriction. Endothelin-1 (ET-1) is a major vasoconstrictor that may play a role in PE. (Shah *et al.*,2015). Wallace et al. hypothesize that reduced uterine perfusion pressure (RUPP) induced CD4(+) T cells increase blood pressure during pregnancy. In pregnant rats circulating TNF- α was elevated in recipients of RUPP CD4(+) T cells. These data support the hypothesis that TNF- α play an important role in the pathophysiology of hypertension in response to placental ischemia (Wallace *et al.*, 2011). The importance of ET-1 in blood pressure control has been demonstrated on animal models, where an endothelin A and B receptor antagonists significantly increased the glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal interstitial hydrostatic pressure. (Kato *et al.* 1995). The correct function of endothelium seems to be the key for maintaining normal blood pressure, and it is during the ischemia of placenta that the number of M1-macrophages grows and the synthesis of proinflammatory cytokines - TNF- α , IL-1 β and IL-18 increases. Those mentioned proinflammatory cytokines support the synthesis of highly effective vasoconstrictor endothelin and reduce the acetylcholine-induced vasodilation (Conrad *et al.* 1997). We emphasize, that endothelin, in animal models, decreased the excretion of sodium and the resulting decreased natriuresis is one of the main disorders participating in the development of hypertension. (Kato *et al.* 1995). A new lineage of T-helper (Th) cells that selectively produce IL-17 has been proposed. This population, which has been termed Th17, plays a critical role for the induction of inflammation. Activated dendritic cells increase production of proinflammatory cytokine IL-6 or IL-1, TGF-beta induced differentiation of native T cells diverted toward the Th17 cells pathway. The function of effector T cells, such as Th1, Th2 and Th17 cells, is regulated by CD4+ CD25+ regulatory T (Treg) cells. (Sheu *et al.* 2018). We may indeed recall the hypothesis Wallace et al. that reduced RUPP induced CD4(+) T cells increase blood pressure during pregnancy (Wallace et al., 2011). In our study we chose absolute CD4(+) T cell count to evaluate activation of cell-mediated immunity. We did not prove a statistically significant difference in absolute count of CD4(+) T cells in the second and third trimester between hypertension and reference group. We observed statistically significant difference in the third trimester ($p= 0,04$) in peripheral blood leukocytes levels, while we did not prove a significant difference in the second trimester ($p=0.18$) between hypertension and reference group. Our study had some limitations which should be pointed out: design of our study was to assess change in circulating cytokine levels regarding to blood pressure, PE risk and low birth weight. We did not investigate the role of the Th subclasses in the induction of cytokine production and from the same reason it is also difficult to interpret the relation between absolute leukocyte count and observed parameters in the third trimester.

IL-6 is, as a proinflammatory cytokine, released by various cells: endothelial, smooth muscle cells, macrophages. The literature review shows that elevated levels of IL-6 correlate with the elevation of blood pressure and are an independent risk factor for angiotensin II (Ang II) – induced hypertension (Ruiz *et al.*2002). It was

demonstrated in an animal model with induced hypertension (diet with increased servings of salt and distribution of Ang II infusion), that protein kinase B2 activates IL-6 mediated inflammation. A deletion of protein kinase B2 in these models then normalized the blood pressure (Ruiz *et al.* 2002). Angiotensin II, on its own, potentiates synthesis of TNF- α and IL-6 (Zhang *et al.* 2003). Gadonski *et al.* conducted a series of experiments on rats, where by applying a clip they induced artificial reduction of uterine perfusion (RUPP) and demonstrated an increase of plasmatic levels of IL-6, significant increase of arterial pressure and reduction of glomerular filtration (eGF) in rats with RUPP compared to the control group (Gadonski *et al.* 2006). Endothelial dysfunction, which is associated with many forms of hypertension was, in human studies, at least partially mediated by the increased levels of proinflammatory cytokines (Saito *et al.* 2001). We conclude, that IL-6 and TNF- α are, according to human studies and animal models, significantly involved in the pathogenesis of insulin resistance and pregnancy hypertension. Our results demonstrated a statistically significant association between elevated levels of cytokines IL-6 and TNF- α in the mother's peripheral blood and the elevation of SBP and DBP in GDM, a condition characterized by increased insulin resistance.

PE is diagnosed based on the presence of hypertension and proteinuria after the 20th week of pregnancy in women that had normal blood pressure prior to gestation. PE is a multisystem disease characterized by endothelial dysfunction, increased peripheral vascular resistance, coagulation abnormalities, oxidative stress, hyperlipidemia and increased production of cytokines. PE is connected with spiral arteries remodeling impairment, defective cytotrophoblast invasion, a change in M1 and M2 macrophages ratio and subsequent progressive placental ischemia. This change is accompanied by an increase of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β or IL18) (Raghupathy *et al.* 2013). Many factors may be involved in further activation of monocytes during pre-eclampsia. Factors may be derived from the stressed placenta, such as anti-angiogenic factors, placental microparticles or ATP, which are released at increased amounts from the preeclamptic placenta (Redman *et al.* 2000). Previous research by Lockwood *et al.*, demonstrated an elevated level of plasmatic IL-6 in women with PE and concluded, that decidua appears to be the source of IL-6 plasmatic elevation. Most likely through the mechanism of elevated levels of cytokines IL-1 and TNF- α , leading to an increased expression of IL-6 mRNA by decidual cells (Lockwood *et al.* 2008). Experimental models in rats demonstrated connections between monocyte stimulation by TNF- α and elevation of nonclassical monocytes, increased inflammatory response, glomerular inflammation, hypertension and proteinuria, the state leading to preeclampsia (Lamarca *et al.* 2005). Several studies show an interesting association between cytokines, uric acid and PE. In women with PE, an elevated level of uric acid was described as early as the 10th week of pregnancy (Powers *et al.* 2006). Our research results proved increased risk of PE in the third trimester only for group high TNF- α ($p=0.04$), groups high IL-6 and high IL-10 didn't meet the statistical significance criteria. In the second trimester, the increased risk of PE hasn't been statistically significant for any of the monitored cytokines (data not shown). The result of our research is fairly in accordance with the mentioned studies, we demonstrated a statistically significant association between mean SBP and levels of IL-6. If we bring back the hypothesis stated by Peraçolli *et al.*, that increased production of cytokine TNF- α is a conjoint pathophysiological mechanism for gestational hypertension and PE, where PE is just the most intensified version of this condition (Peraçolli *et al.* 2007) and understand, that elevation of blood

pressure is a crucial part of PE syndrome, then we can't rule out, that the elevation of cytokine TNF- α is closely linked to the risk of developing PE and a larger sample of pregnant women would be needed in order to prove statistically significant associations with the risk of PE and with cytokine IL-6. If we consider the association between the risk of PE and TNF- α wasn't significant during the second trimester, but was significant in the third trimester, we regard this as likely, that significant elevation of TNF- α in the mother's peripheral blood is a matter of advanced syndrome. Our research results proved increased risk of PE in the third trimester only for group high TNF- α ($p=0.04$), better understanding of the association between cytokines and PE risk may lead to more effective strategies for prenatal care and may help to find a new way to prevent it. When assessing the correlation coefficient for birth weight during the second trimester, we proved statistically significant negative correlations for all the monitored cytokines TNF- α ; IL-10; IL-6 ($p <0.05$; $p <0.001$; $p <0.001$). Negative correlations were also proved in the third trimester ($p <0.05$; $p=0.096$; $p <0.001$). Hence, in the third trimester, the correlation for IL-10 did not reach statistical significance. For the current literature, our results on correlation between cytokines and birth weight are rather contradictory. While our results proving a negative correlation between the levels of cytokine IL-6; TNF- α and birth weight remain consistent with prior research, our results for IL-10 are contradictory to literature sources. The study of Bartha et al. demonstrates an increased level of TNF- α in women with IUGR and placental insufficiency, but normal levels of TNF- α in women with IUGR and normal placental perfusion. The elevation of TNF- α was perceived as a phenomenon specific for IUGR with placental dysfunction (Bartha *et al.* 2003). De Steenwinkel et al. provided evidence of association between elevation of IL-6 and low birth weight in mothers with rheumatoid arthritis. A majority of literature shows the protective effect of IL-10 on fetoplacental unit (amongst other, by inhibition of secretion of proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α , interferon gamma) (Tinsley *et al.*2010). A decreased level of IL-10 in the decidual region and trophoblast was described in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction (IUGR) (Amu *et al.* 2006). On the contrary, we proved a negative correlation between birth weight and the levels of IL-10 in peripheral blood. Our study had some limitations. First, the biological effects of cytokines are determined by the interplay of cytokines and their soluble receptors. The levels of these soluble receptors were not determined. Secondly, it is known that body mass index may influence cytokine levels as well as pregnancy outcome and therefore it could be a potential confounder. (Curry *et al.*2008). Schmidt et al. found differences in pro- as well as anti-inflammatory cytokines when comparing obese and non-obese participants. Among the tested cytokines, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 and IFN- γ were elevated in both general and central obesity. These findings do not indicate whether cytokines are a cause or a consequence of obesity, nor the underlying molecular mechanisms (Schmidt *et al.*2015). In another study serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6 were significantly correlated with weight, BMI, waist circumference, hip circumference and waist-hip ratio (Park *et al.* 2005). In our study reference group was chosen to fit the characteristics of the hypertension group in both age, and BMI. We observed greater increase in BMI for the reference group compared to hypertension group in the third trimester. These findings support our hypothesis that proinflammatory cytokines play a role in regulating blood pressure and observed elevated levels of IL-6 and TNF- α are not related to changes in BMI over the third trimester. Despite the mentioned limitation of our study, we consider our findings of

elevated levels of proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α in relation to SBP and DBP in mothers with GDM inspiring and an interesting topic for future research.

Conclusion

We found a significant positive correlation between TNF- α ; IL-6; IL-10 levels and SBP in the second trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); the third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.05$). We also proved correlations for DBP during the second; third trimester ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$); ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.0015$). Furthermore, we proved a statistically significant higher risk of PE for high TNF- α group in the third trimester ($p = 0.04$). The evaluation of correlation coefficient for birth weight during the second trimester yielded statistically significant negative correlations for TNF- α ; IL-10; IL-6 p-value ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$). Prediction of PE is widely accepted to rely on multi-parametric approaches because no single screening test provides a reasonable risk assessment. The screening of cytokine levels (TNF- α ; IL-10; IL-6) during the second trimester might be premature from the clinical point of view, cost-benefit analysis performed in large clinical studies are needed. In our study, the minimum observed birth weight was 2760 g. Therefore none of the subjects met the criteria for low birth weight. The results of our study confirm the hypothesis, that the proinflammatory state, together with the elevation of proinflammatory TNF- α ; IL-6 cytokines, play an important role in the elevation of SBP and DBP. Moreover, we have found negative correlation between TNF- α ; IL-6 and birth weight. Our results are in accordance with the literature (De Steenwinkel *et al.* 2013), which shows that the levels of maternal cytokines can significantly influence the growth of the fetus in women with rheumatoid arthritis. Our results confirmed a similar effect of proinflammatory cytokines in women with GDM. Further studies are undoubtedly needed to clarify the association of maternal cytokine productions and pregnancy complications

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by the educational grant Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University. The authors are grateful for essential help with paper: statistical analysis and advice on the statistical presentation Matej Marek, laboratory staff Department of Clinical Immunology and Allergology St. Anne's University Hospital in Brno and especially study nurse Jana Havrankova.

References:

Azizieh F, Raghupath R: Tumor Necrosis Factor- α and Pregnancy Complications: A Prospective Study. *Med Princ Pract.* **24**: 165–170, 2015.

- Lash GE, Ernerudh J: Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage *J Reprod Immunol*. **108**:83-89, 2015.
- Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubancheta S, Zourbasa S, Sandrac O, Martal J. Th1/Th2 Paradigm in Pregnancy: Paradigm Lost? Cytokines in Pregnancy/Early Abortion: Reexamining the Th1/Th2 Paradigm *Int Arch Allergy Immunol* **134**:93–119, 2004.
- Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F: Inflammation and pregnancy. *Reproductive Sciences* **16**: 206–15, 2009.
- De Steenwinkel FD, Hokken-Koelega AC, de Man YA, de Rijke YB, de Ridder MA, Hazes JM: Circulating maternal cytokines influence fetal growth in pregnant women with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **72**:1995–2001, 2013.
- Saito S: Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* **47**:87–10, 2001.
- Sheu A, Chan Y1, Ferguson A, Bakhtyari MB, Hawke W, White C, Chan YF, Bertolino , Woon HG, Palendira Sierro F, Lau SM: A proinflammatory CD4⁺ T cell phenotype in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* **61**:1633–1643, 2018.
- Wang Y, Walsh SW: TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol* **32**:157–69, 1996.
- Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM: A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* **163**: 3491–5, 1999.
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE: TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. **51**:2207–13, 2002.
- Gomes CP, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Alexandre SM, Mattar R, Daher S: Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: A systematic review of the literature. *Am J Reprod Immunol*. **69**:545–57, 2013.
- Matsuda M, DeFronzo R: Insulin Sensitivity Indices Obtained from oral Glucose Tolerance Testing. *Diabetes Care* **22**:1462-1470, 1999.
- LANA K. WAGNER, M.D., First Choice Community Healthcare, Albuquerque, New Mexico
- WAGNER L: Diagnosis and Management of Preeclampsia, *Am Fam Physician* **70**:2317-2324, 2004.
- Cutland C, Lackritz E, Mallett T, Moore e, Bardají A, Chandrasekaran R, Lahariya Ch. Nisar H., Milagritos I., Tapia j., Pathirana J. Kochhar S., Muñoz F. and The Brighton Collaboration Low Birth Weight Working Group: Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data, *Vaccine*. **35**: 6492–6500, 2017.

Organization WH. International statistical classification of diseases and related health problems, tenth revision, 2nd ed. World Health Organization; 2004.

Kato T, Kassab S, Wilkins FC, Kirchner K, Keiser J, Granger JP: Endothelin antagonist improve renal function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **25**:883– 887,1995.

Conrad KP, Benyo DF: Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* **37**: 240 – 249,1997.

Wallace K, Richards S, Dhillon P, Weimer A, Edholm ES, Bengten E: CD4+ T-helper cells stimulated in response to placental ischemia mediate hypertension during pregnancy. *Hypertension* **57**:949–55, 2011.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de S., Groth B, Nanan R: Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia, *J Immunol* **183**:7023–7030, 2009.

Shah D, Khalil R: Bioactive Factors in Uteroplacental and Systemic Circulation Link Placental Ischemia to Generalized Vascular Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Biochem Pharmacol.* **15**: 211–226, 2015.

Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV: Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia *J Clin Invest* **92**: 99–104, 1993.

Taylor RN, Varma M, Teng NN, Roberts JM: Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* **71**:1675–7, 1990.

uiñones Galvan AI, Natali A, Baldi S, Frascerra S, Sanna G, Ciociaro D, Ferrannini E: Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol.* **268**:1–5, 1995.

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int.* **82**:12–22, 2002.

Zhang ZH, Wei SG, Francis J, Felder RB: Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **284**: R916–R927, 2003.

Gadonski G., B. Babbette D. LaMarca, Elizabeth Sullivan: Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat Role of Interleukin 6. *Hypertension* **48**: 711-716,2006.

Redman CW, Sargent IL: Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* **21**:597–602, 2000.

Lockwood Ch, Chih-Feng Yen, Murat Basar, Umit A. Kayisli: Preeclampsia-Related Inflammatory Cytokines Regulate Interleukin-6 Expression in Human Decidual Cells *AJP* June **172**:6, 2008.

- Peraçoli JC1, Rudge MV, Peraçoli M: Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. **57**:177-85, 2007.
- RAGHUPATHY RAJ: Cytokines as Key Players in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Med Princ Pract* **22** 8-19, 2013.
- LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP: Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat. Role of tumor necrosis factor. *Hypertension* **46**:1022–1025, 2005.
- Powers RW, Bodnar LM, Ness RB: Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery. *Am J Obstet Gynecol*. **194**:160, 2006.
- Fernandez-Vojvodich P., Zaman F., Säwendahl L.: Interleukin-6 acts locally on the growth plate to impair bone growth. *Annals of the Rheumatic Diseases* **72**:24 2013.
- Bartha JL1, Romero-Carmona R, Comino-Delgado R: Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand* **82**:1099-1102,2003.
- J. H. Tinsley, S. South, V. L. Chiasson, and B. M. Mitchell: Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *American Journal of Physiology*, **298**: 713–719, 2010.
- Amu S, Hahn-Zoric, A. Malik: Cytokines in the placenta of Pakistani newborns with and without intrauterine growth retardation, *Pediatric Research* **59**:254-258, 2006.
- Curry AE, Vogel I, Skogstrand K: Maternal plasma cytokines in early-and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. *J Reprod Immunol* **77**:152–60, 2008.
- Meikle S, Ferre C, Peterson H. Jeng G., Wilcox L: Low and Very Low Birth Weight in Infants Conceived with Use of Assisted Reproductive Technology *N Engl J Med* **346**:731-737, 2002.
- Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka: T Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS ONE* **10**:3, 2015.
- PARK HS, PARK JY, YU R: Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* **69**:29-35, 2005.
- Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care* **41**:137–S143, 2018.

Table 1 Clinical, immunological and metabolic characteristics of the reference and hypertension group at different time points.

Characteristic	Hypertension group (n=20)		Reference group (n=20)	
	Mean	Std. deviation	Mean	Std. deviation
Age at delivery (years)	33.55	2.67	34.10	3.24
Parity (%)				
Nulliparae	52.6		50.1	
Multiparae	47.4		49.9	
BMI at different time points (kg/m ²)				
Trimester 2	28.14	4.76	28.72	5.23
Trimester 3	27.27	7.49	29.46	4.83
Cytokine levels at different time points				
IL-6				
Trimester 2	2.74	2.96	0.5	0.0
Trimester 3	4.70	5.49	0.5	0.0
IL-10				
Trimester 2	3.04	3.91	0.57	0.28
Trimester 3	2.64	2.46	0.96	0.72
TNF-α				
Trimester 2	2.65	1.02	2.0	0.0
Trimester 3	4.07	2.89	2.00	0.0
C-peptide at different time points (ug/l)				
Trimester 2	2.35	0.66	2.24	0.78
Trimester 3	1.60	0.32	2.83	1.11
HOMA-IR at different time points				
Trimester 2	2.47	1.26	2.85	1.93

Trimester 3	2.04	1.05	2.7	1.59
Mean systolic blood pressure (SBP) at different time points				
Trimester 2	143.98	5.15	117.08	5.25
Trimester 3	143.63	6.73	117.55	5.65
Mean diastolic blood pressure (DBP) at different time points				
Trimester 2	89.25	2.84	70.0	4.0
Trimester 3	88.95	5.26	70.13	3.01
Preeclampsia cases (n)	3		0	
Newborns				
Mean birth weight (g)	3276.7	278.2	3506.0	165.0
Week of delivery (wk)	38.75	1.70	39.25	0.77
Mean weight-for-age percentiles	53.0	18.3	61.2	18.5

Unless otherwise indicated, values are mean (SD) or median (IQR) (detectable)

Values are presented as means \pm SD

Table 2. Comparison of the glycated hemoglobin (HbA1c) levels in reference group and gestational hypertension group at different time points.

Characteristic	Hypertension group	Reference group
Glycated hemoglobin (HbA1c)		
Trimester 2		
Mean	35.05	34.60
Std. deviation	4.45	5.62
Difference (p-value)	0.78	
Trimester 3		

Mean	35.68	35.16
Std. deviation	3.92	6.14
Difference (p-value)	0.75	

Values are expressed as mean \pm SD, statistical significance is p-value<0.05

Table 3. The SBP parameters comparisons between group low and group high, subjects were divided into two groups according to their median of cytokine level (IL-6; TNF- α ; IL-10): group low had a lower value than the median, group high had a higher value than median.

Characteristic	Trimester 2		Trimester 3	
	low IL-6	high IL-6	low IL-6	high IL-6
Mean	119.12	144.48	117.55	143.63
Std. deviation	8.28	5.19	5.65	6.73
p-value	<0.001 $\phi\phi$		<0.001 $\phi\phi$	
	low TNF- α	high TNF- α	low TNF- α	high TNF- α
Mean	126.65	146.08	123.36	145.62
Std. deviation	13.38	6.48	11.17	7.53
p-value	<0.001 $\phi\phi$		<0.001 $\phi\phi$	
	low IL-10	high IL-10	low IL-10	high IL-10
Mean	123.19	144.17	120.31	136.76
Std. deviation	11.67	8.13	7.14	14.47
p-value	<0.001 $\phi\phi$		0.0019 ϕ	

Unless otherwise indicated, values are mean (SD) or median (IQR) (detectable)., Statistical significance is from **Kruskal-Wallis test**

ϕ P<0.05, $\phi\phi$ P<0.01

Table 4 Spearman correlation coefficients of observed parameters (SBP; DBP), birth weight, week of delivery and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10) and UA among all subjects.

Characteristics	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-6/IL-10 ratio	UA
Trimester 2					
Mean SBP	0.55 $\phi\phi$	0.81 $\phi\phi$	0.84 $\phi\phi$	0.13	-0.02
Mean DBP	0.52 $\phi\phi$	0.76 $\phi\phi$	0.79 $\phi\phi$	0.11	0.01
Birth weight (g)	-0.32 ϕ	-0.51 $\phi\phi$	-0.56 $\phi\phi$	0.07	0.27
Week of delivery	-0.26	-0.24	-0.15	0.42	-0.03
Trimester 3					
Mean SBP	0.75 $\phi\phi$	0.45 ϕ	0.85 $\phi\phi$	0.84 $\phi\phi$	0.13
Mean DBP	0.70 $\phi\phi$	0.49 ϕ	0.87 $\phi\phi$	0.86 $\phi\phi$	0.11
Birth weight (g)	-0.53 ϕ	-0.27	-0.51 $\phi\phi$	-0.58 $\phi\phi$	0.12
Week of delivery	-0.27	-0.03	-0.08	-0.13	-0.26

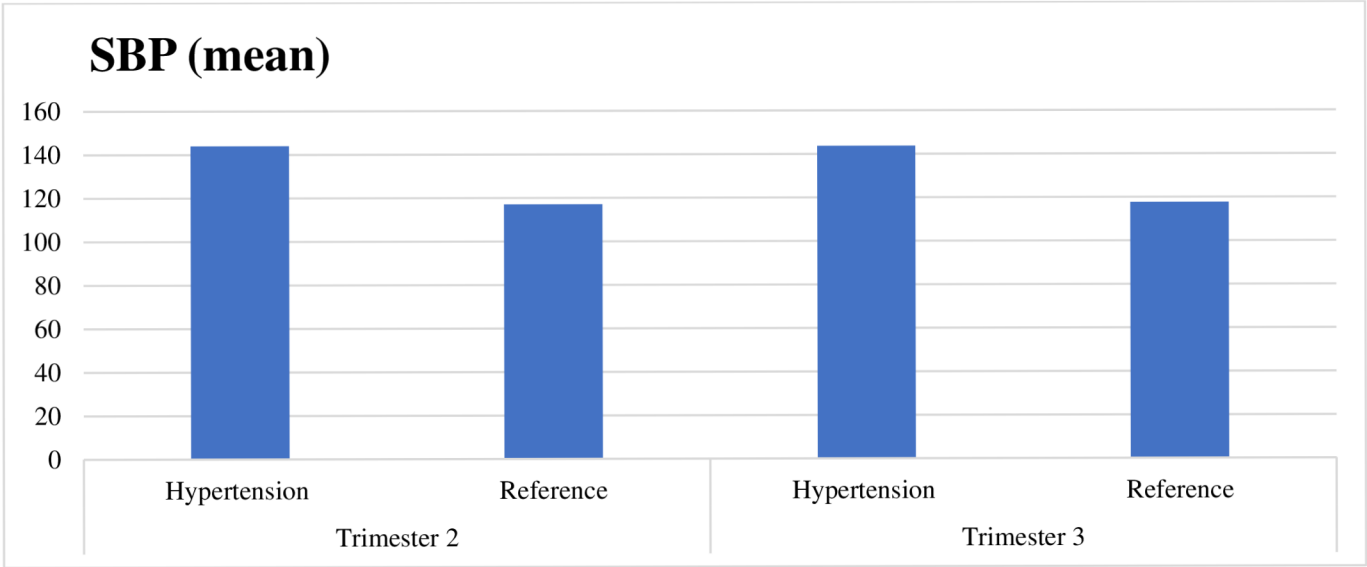
Statistical significance is from the Spearman's rank correlation coefficient ϕ $P < 0.05$, $\phi\phi$ $P < 0.01$

Table 5. The risk of preeclampsia parameters comparisons between group low and group high, subjects were divided into two groups according to their median of cytokine level (IL-6; TNF- α ; IL-10): group low had a lower value than the median, group high had a higher value than median. Data are presented as relative frequencies (%).

Characteristic		
Trimester 3	low IL-6	high IL-6
Relative frequencies (%)	0	10
p-value	0.15	
	low TNF-α	high TNF-α
Relative frequencies (%)	0	15.38
p-value	0.04ϕ	
	low IL-10	high IL-10
Relative frequencies (%)		
p-value	0.26	

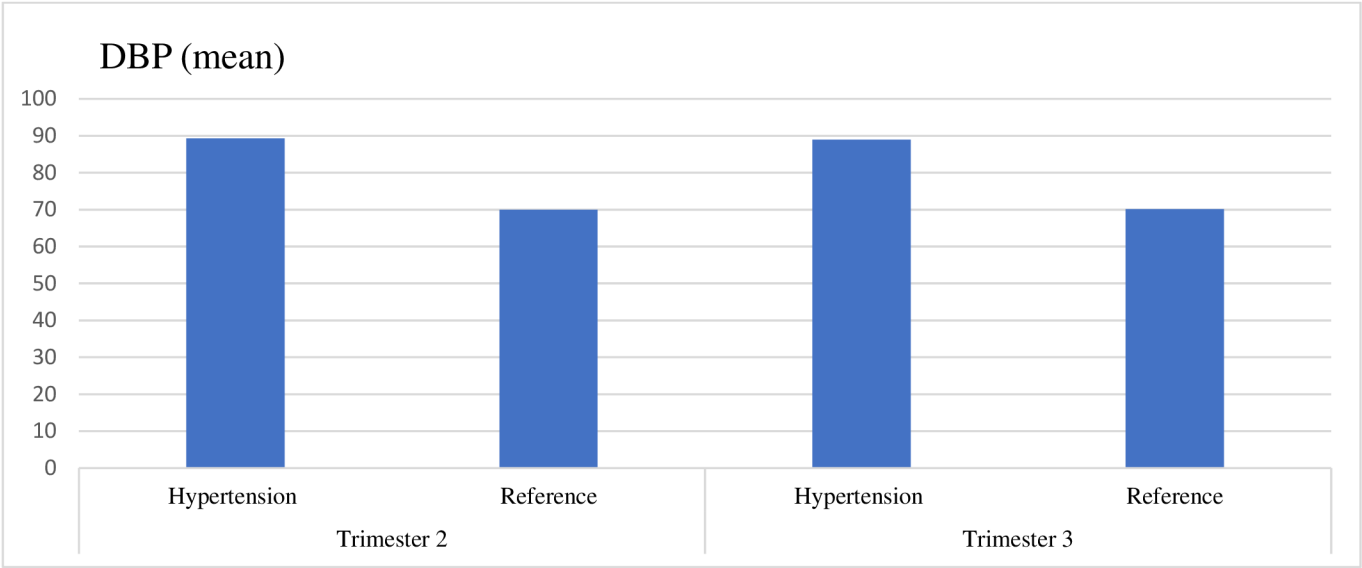
Statistical significance is from the **Chi-square test**, ϕ $P < 0.05$, $\phi\phi$ $P < 0.01$

Fig. 1. Comparison of the SBP in reference group and gestational hypertension group at different time points. In the second and third trimester we proved a statistically significant difference in SBP between hypertension and reference group ($p < 0.001$; $p < 0.001$).



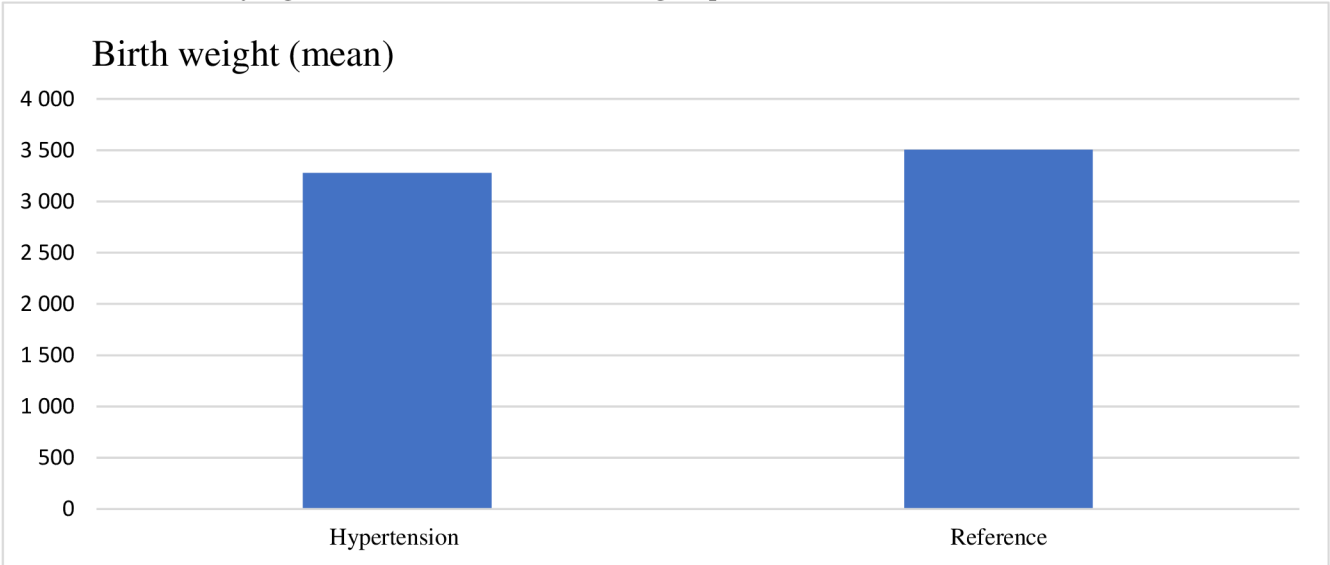
Statistical significance is from the **Student t-test**, values are expressed as mean (mm Hg).

Fig. 2. Comparison of the DBP in reference group and gestational hypertension group at different time points. In the second and third trimester we proved a statistically significant difference in DBP between hypertension and reference group ($p < 0.001$; $p < 0.001$).



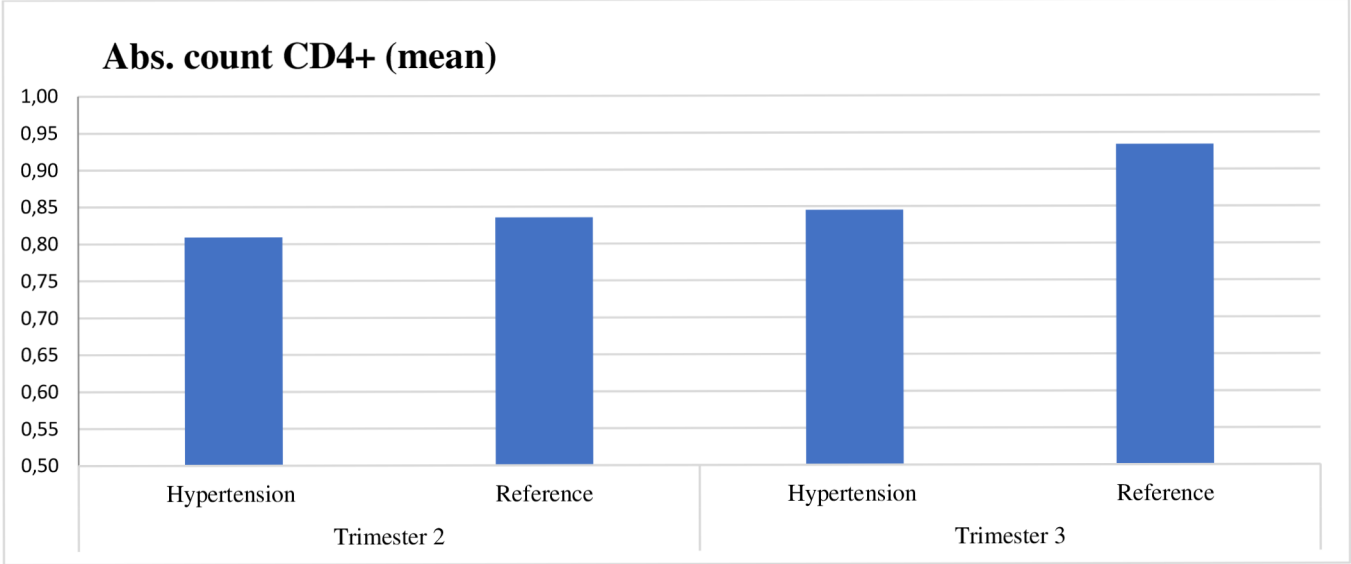
Statistical significance is from the **Student t-test**, values are expressed as mean (mm Hg).

Fig. 3. Comparison of the birth weight in reference group and gestational hypertension group, we found the statistically significant difference in birth weight ($p < 0.05$).



Statistical significance is from the **Student t-test**, values are expressed as mean (g).

Fig. 4. Comparison of the absolute CD4+ count (peripheral blood) in reference group and gestational hypertension group at different time points, we did not prove a statistically significant difference in the second and third trimester, between hypertension and reference group (p=0.76; 0.42).



Statistical significance is from the **Student t-test**, values are expressed as x 10(9)/l CD4+.

17.2 Příloha č. 3: Publikace vztahující se k tématu disertace

Příjmení, jméno, titul, uço:	Žák, Petr, MUDr., 20494
------------------------------	-------------------------

Souhrn

Publikace	Počet	IF/Q-WOS
Jimp	Prvoautorské	1
	Spoluautorské	
Jrec	Prvoautorské	8
	Spoluautorské	1
Další	Knihy	
	Kapitoly v knize	
	Příspěvky ve sborníku	1
	Jiné (patenty...)	

Detailní přehled publikační aktivity

Originální práce s IF¹

A. Prvoautorské

1. Bibliografický záznam práce² **Žák P**, Souček M. Correlation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and interleukin 10 with blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes Physiological Research, AV ČR, Institute of Physiology, 2019. ISSN 0862-8408, akceptováno k tisku

IF ³	Q WOS	WOS kategorie
1.324	Q4	Physiology

Citace (bibliografické záznamy citací)⁴

- 1.
- 2.
- 3.

2. Bibliografický záznam práce

IF	Q WOS	WOS kategorie

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.

¹ U publikací s IF (Impakt faktor) uvádějte i kategorii dle WOS a Q WOS (Impakt faktor kvartil), příklad: IF=1,167; GENETICS & HEREDITY Q4 (v případě více kategorií, uveďte kategorii s nejvyšším příslušným kvantilem).

² S ohledem na provádění následných kontrol dle nařízení/směrnice LF MU uvádějte při citování článků v případě více tvůrců všechny autory, NEPOUŽÍVEJTE zkratku „et al.“, „aj.“ (nebo ekvivalent v řeči, ve které je článek napsán).

³ Uvádějte IF v roce publikování. Pokud je publikace zatím pouze přijata k tisku, uvádějte aktuální IF časopisu. Po schválení oborovou radou je možné uvádět i publikace před zahájením Ph.D. studia.

⁴ Uvádějte jen nejvýznamnější citace. Je možné uvést i více citací než tři. Neuvádějí se autocitace, za autocitace se považuje i citace spoluautorů.

- 2.
- 3.

B. Spoluautorské

1. Bibliografický záznam práce

IF	Q WOS	WOS kategorie

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

2. Bibliografický záznam práce

IF	Q WOS	WOS kategorie

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

Originální práce v recenzovaných časopisech

A. Prvoautorské

1. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Úspěšné využití kombinace s fixním poměrem bazálního inzulínu a GLP-1 RA u pacienta s téměř čtvrt století trvajícím diabetem 2. typu. Kazuistiky v diabetologii 2019; 17 (1): 10–12.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

2. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Přínosy fixní kombinace inzulín glargine/lixisenatid u pacientů dlouhodobě léčených pro diabetes 2. typu ve světle nových dat. Farmakoterapie 2019; 15(1):1-89-92.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

3. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Budeme již brzy mít finální důkaz kardiovaskulární bezpečnosti DPP-4 inhibitory? Kardiol Rev Int Med 2019; 21(1): 33-36.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

4. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Léčba koncentrovaným prandiálním inzulínem lispro 200 U/ml u pacientky s diabetes mellitus 2. typu po transplantaci jater. Kazuistiky v diabetologii 2018;16 (2): 32–34.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

5. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Využití self-titračního algoritmu při léčbě vysokou dávkou bazálního inzulínu v kombinaci s jednou týdně aplikovaným GLP-1 receptorovým agonistou. Kazuistiky v diabetologii 2018;16 (3): 9–11.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

6. Bibliografický záznam práce **Žák, P.** Zahájení léčby kombinací bazálního inzulínu a krátce působícího GLP-1 receptorového agonisty s fixním poměrem vedlo k zásadnímu zlepšení kontroly postprandiální glykemie. Kazuistiky v diabetologii 2018;16 (4): 35–37.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

7. Bibliografický záznam práce **Žák, P.**, Souček M. Kardiovaskulární riziko u diabetiků a diabetiček. Med. praxi 2015; 12 (1): 22–26.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

8. Bibliografický záznam práce **Žák, P.**, Olšovský J. Léčba agonisty GLP-1 RA a kontrola hmotnosti Vnitřní lékařství 2015; 61(4): 316-319.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.
- 3.

B. Spoluautorské

1. Bibliografický záznam práce Krusová D, **Žák, P.** Podíl medikace na rozvoji kontrastní látkou indukované nefropatie u rizikových pacientů. Vnitřní lékařství, 2006; 52(11), 1114 (abstrakt)

2.

Citace (bibliografické záznamy citací)

- 1.
- 2.

3.

3. Bibliografický záznam práce

Citace (bibliografické záznamy citací)

1.

2.

3.

Další publikace

Knihy
Kapitoly v knize
Příspěvky ve sborníku
Žák P., Šťastná P. Změna v parametrech metabolického syndromu v důsledku zahájení terapie Glucagon like peptid 1 RA lixisenatidu u obézního diabetika 2. typu s anamnézou metforminem indukované fototoxické dermatitidy. 18. Kongres o ateroskleróze sborník abstrakt, 2015. Hypertenze a kardiovaskulární prevence. 2016; 5 (1): 65.
Jiné

.....
datum a podpis uchazeče

18. Souhrn poznatků disertační práce

V naší práci jsme prokázali u sledovaných žen s gestačním diabetem signifikantní korelaci mezi hladinami cytokinů TNF- α ; IL-6; IL-10 v periferní krvi a systolickým krevním tlakem ve druhém trimestru; ve třetím trimestru. Také jsme prokázali signifikantní korelace pro diastolický krevní tlak ve druhém; třetím trimestru. Potvrdili jsme statisticky významné zvýšení rizika preeklampsie pro skupinu high TNF- α ve třetím trimestru a negativní korelaci pro období druhého trimestru mezi porodní váhou a hladinami cytokinů TNF- α ; IL-6, IL-10. Predikce rozvoje preeklampsie je široce akceptována na podkladě zhodnocení více parametrů, protože žádný jednotlivý parametr nemá dostatečnou sílu průkazu. Skrining hladin cytokinů v periferní krvi (TNF- α ; IL-10; IL-6) během druhého trimestru se může zdát být předčasný, je nutné provést cost-benefit analýzy v rámci rozsáhlých randomizovaných klinických studií. V naší studii byla minimální porodní váha 2760 g, tedy žádné z dětí nenaplnilo kritéria pro nízkou porodní hmotnost. Naše výsledky podporují hypotézu, že prozánětlivý stav spojený se zvýšením hladin prozánětlivých cytokinů TNF- α ; IL-6 hraje významnou roli ve zvýšení krevního tlaku. Dále jsme prokázali negativní korelaci mezi prozánětlivými cytokiny TNF- α ; IL-6 a porodní hmotností. Získané výsledky jsou ve shodě s nálezy v odborné literatuře, kde hladiny uvedených cytokinů signifikantně ovlivnily růst plodu u žen revmatoidní artritidou. Naše výsledky potvrdily podobný efekt zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů u žen s gestačním diabetem.

Publikace výsledků disertační práce: Žák P, Souček M. Correlation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and interleukin 10 with blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes Physiological Research, AV ČR, Institute of Physiology, 2019. ISSN 0862-8408, akceptováno k tisku.

Školitel:

Prof. MUDr. Miroslav Souček CSc.

Autor:

MUDr. Petr Žák