

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Hodnocení vybraných ukazatelů
intraamniálního zánětu u pacientek
s předčasným porodem komplikovaným
předčasným odtokem plodové vody (PPROM)**

Bc. Nella Bukáčková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultant: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

V tomto bodě bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Ctiradu Andrášovi, Ph.D. za praktické vedení této diplomové práce a také za jeho předávání rad, inspirace, motivace a dostatečné trpělivosti. V neposlední řadě bych ráda poděkovala panu PharmDr. Petrovi Jílkovi, CSc. za formální vedení diplomové práce a umožnění této práci vzniknout.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14. 5. 2020

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD	9
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Imunitní systém v těhotenství	12
3.2 Komplementový systém v těhotenství	15
3.2.1 Deficience složek komplementového systému v těhotenství	17
3.2.2 Komplementový systém u těhotných s autoimunitním onemocněním ..	18
3.2.3 Komplementový systém u opakujících se potratů	20
3.2.4 Komplementový systém u těhotných s preeklampsií	20
3.2.5 Komplementový systém u předčasných porodů	22
3.3 Definice předčasného porodu	22
3.3.1 Příčiny předčasného porodu	24
3.3.2 Předčasný odtok plodové vody	24
3.3.3 Management předčasného porodu	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Soubor pacientek	31
4.2 Odběry vzorků plodové vody	31
4.3 Diagnostika intraamniálního zánětu	32
4.3.1 Stanovení hladiny IL-6 v plodové vodě	32
4.3.2 Průkaz přítomnosti <i>Ureaplasma species</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> a <i>Chlamydia trachomatis</i>	32
4.3.3 Detekce dalších bakterií v plodové vodě	32
4.3.4 Aerobní a anaerobní kultivace ze vzorků plodových vod	33
4.3.5 Stanovení diagnózy mikrobiální invaze do amniální dutiny a intraamniálního zánětu, rozdělení souboru pacientek do hlavních skupin dle diagnózy	33

4.4	Měření vybraných parametrů komplementového systému ve vzorcích plodových vod.....	34
4.4.1	Stanovení C3 složky komplementového systému.....	34
4.4.2	Stanovení aktivních C3a a C5a složek komplementového systému	36
4.4.3	Stanovení C5 složky komplementového systému	37
4.4.4	Stanovení solubilní formy regulační bílkoviny komplementového systému CD59	38
4.4.5	Statistické zpracování.....	39
5.	VÝSLEDKY	40
5.1	Hladina komplementové C3 složky v plodové vodě pacientek s PPROM.....	40
5.1.1	Porovnání hladin komplementové C3 složky u pacientek s a bez IAI.....	41
5.1.2	Porovnání hladin komplementové C3 složky u pacientek s a bez MIAC.....	41
5.1.3	Porovnání hladin komplementové složky C3 u pacientek s IAI a/nebo MIAC	42
5.2	Hladina komplementové C3a složky v plodové vodě pacientek s PPROM.....	43
5.2.1	Porovnání hladin komplementové C3a složky u pacientek s a bez IAI ...	43
5.2.2	Porovnání hladin komplementové C3a složky u pacientek s a bez MIAC	44
5.2.3	Porovnání hladin komplementové složky C3a u pacientek s IAI a/nebo MIAC	44
5.3	Koncentrace komplementové C5 složky v plodové vodě pacientek s PPROM	45
5.3.1	Porovnání hladin komplementové C5 složky u pacientek s a bez IAI.....	45
5.3.2	Porovnání hladin komplementové C5 složky u pacientek s a bez MIAC.....	45
5.3.3	Porovnání hladin komplementové složky C5 u pacientek s IAI a/nebo MIAC	46
5.4	Koncentrace komplementové C5a složky v plodové vodě pacientek s PPROM.....	46
5.4.1	Porovnání hladin komplementové C5a složky u pacientek s a bez IAI ...	46
5.4.2	Porovnání hladin komplementové C5a složky u pacientek s a bez MIAC	47
5.4.3	Porovnání hladin komplementové složky C5a u pacientek s IAI a/nebo MIAC	47
5.5	Hladina CD59 v plodové vodě pacientek s PPROM.....	48
5.5.1	Porovnání hladin CD59 u pacientek s a bez IAI.....	48
5.5.2	Porovnání hladin CD59 u pacientek s a bez MIAC	48
5.5.3	Porovnání hladin CD59 u pacientek s IAI a/nebo MIAC.....	48
6.	DISKUSE	50

7. ZÁVĚR.....	55
8. POUŽITÉ ZKRATKY.....	56
9. SEZNAM TABULEK.....	59
10. SEZNAM GRAFŮ.....	60
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	61

ABSTRAKT

Nella Bukáčková

Hodnocení vybraných ukazatelů intraamniálního zánětu u pacientek s předčasným porodem komplikovaným předčasným odtokem plodové vody (PPROM)

Diplomová práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Záměrem této práce je zhodnocení vybraných parametrů vrozené imunity a zánětu v souvislosti s jejich klinickým využitím v časně predikci předčasného porodu a předčasné ruptury plodových obalů (PPROM). Mezi potencionální biomarkery byly zařazeny tyto složky komplementového systému: C3 složka, aktivovaná C3 složka (C3a), C5 složka a aktivovaná C5 složka (C5a). Do seznamu byla také přidána regulační bílkovina komplementového systému protektin (CD59).

Metody: Ve studii bylo pracováno se souborem 136 pacientek vybraných dle specifických kritérií jako jsou jednočetné těhotenství či PPRM. S využitím imunochemických metod byla stanovena koncentrace interleukinu 6 v plodové vodě a průkazem bakteriální nukleové kyseliny mikrobiální kolonizace amniální dutiny pomocí polymerázové řetězové reakce. Pro analýzu vybraných složek komplementového systému byla zvolena enzymová imunoanalýza (ELISA).

Výsledky: Statisticky byl prokázán rozdíl v koncentracích C3, C3a a CD59 mezi pacientkami s intraamniálním zánětem a bez zánětu; v hladinách C5 a C5a nebyl prokázán dostatečný rozdíl u pacientek s přítomností či absencí zánětu.

Závěry: Komplementové složky C3, C3a a CD59 se jeví jako vhodné pro detekci přítomnosti intraamniálního zánětu u těhotných pacientek s možným rizikem PPRM.

Klíčová slova: Intraamniální zánět, PPRM, předčasný porod, komplementový systém

ABSTRACT

Nella Bukáčková

Evaluation of selected biomarkers for early detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of fetal membranes (PPROM)

Master's thesis

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Specialist in Laboratory Methods

Background: The aim of this work is to evaluate selected parameters of innate immunity and inflammation in connection with their clinical use in early prediction of premature labor complicated with premature rupture of fetal membranes (PPROM). Potential biomarkers include the following components of the complement system: C3 component, activated C3 component (C3a), C5 component and activated C5 component (C5a). The regulatory protein of the complement system, the protectin (CD59) was also added to the list.

Methods: The study was conducted with a group of 136 patients selected according to specific criteria such as a single pregnancy or PPRM. Using immunochemical methods, the concentration of interleukin 6 in amniotic fluid was determined and bacterial nucleic acid was detected by microbial colonization of the amniotic cavity by a polymerase chain reaction. Enzyme immunoassay (ELISA) was chosen for the analysis of selected components of the complement.

Results: There was a statistical difference in C3, C3a, and CD59 concentrations between patients with and without inflammation; insufficient difference at C5 and C5a levels are evident in patients with or without inflammation.

Conclusions: Complement components C3, C3a, and CD59 are identified as detecting the risk of intra-amniotic inflammation in pregnant patients with a potential risk of PPRM.

Key words: Intra-amniotic Inflammation, PPRM, Preterm Labor, Complement System

1. ÚVOD

Předčasný odtok plodové vody a ruptura plodových obalů (PPROM; Preterm Premature Rupture of Membranes) neboli únik plodové vody před zahájením pravidelné děložní činnosti dříve než ve 37. týdnu gestace, je komplikací současného zdravotnictví a podstatným zdravotním rizikem pro matku, plod i novorozence. PPRM postihuje asi 3 % ze všech těhotenství. [1] Počet studií a znalostí o patofyziologii PPRM se průběžně zvyšuje, nicméně stále se nedaří riziko předčasného porodu komplikovaného PPRM u pacientek z celého světa podstatně snížit a včas diagnostikovat. [2] Terapie PPRM vyžaduje přesnou a včasnou diagnostiku, která vede k následnému zvážení přínosu při pokračování těhotenství nebo indukci rychlého porodu. [1]

Komplementový systém je klíčovým nástrojem přirozené obraně složky imunity. Za normálních podmínek je zodpovědný za opsonizaci, degradaci potencionálních patogenů a stimulaci dalších imunitních mechanismů. [3] Aktivace komplementového systému v průběhu těhotenství je fyziologickým procesem, ačkoliv výrazně vysoké hladiny aktivovaných složek komplementu mohou souviset s předčasným porodem. [4]

Komplementová složka 3 (C3) je spojujícím činitelem všech tří cest aktivace komplementové kaskády. Neaktivní forma C3 se skládá z 1 633 aminokyselin a její molekulová hmotnost dosahuje 180 kDa. Lidský C3 je v pořadí aminokyselin ze 77 % shodný s C3 myši. C3 je pomocí C3-konvertázy rozštěpen na 2 aktivní fragmenty – aktivovanou komplementovou složku 3 (C3a) a C3b. Anafylatoxin C3a je významný především jako mediátor lokálního zánětu. Současně může C3b působit jako opsonin vázající se kovalentně na povrch patogenu, čímž ho označí pro fagocytózu. Získané deficity C3 složky jsou spojovány s vracejícími se pneumokokovými a meningokokovými infekcemi. Plazmatické hladiny C3 a C3a jsou také zvýšeny u cévních onemocnění, zejm. u ischemických příhod mozkových. [5, 6]

C3a je malý polypeptid složený ze 74 aminokyselin. Jedná se o peptid s velmi malou stabilitou, a proto je častěji detekován ve stabilnější formě jako C3a-desArg. Složka C3a způsobuje lokální zánětlivé reakce, které zahrnují kontrakci hladké

svaloviny, zvýšenou permeabilitu cév, uvolňování histaminu žírnými buňkami a bazofily. [5]

Lidská komplementová složka 5 (C5) je 5. členem komplementové kaskády. Její molekulová hmotnost je 195 kDa. Zralá forma C5 je složena ze dvou dimerů: α řetězec s molekulovou hmotností 120 kDa a β řetězec s molekulovou hmotností 75 kDa. Po aktivaci se pomocí C5 konvertázy rozštěpí na malou aktivovanou komplementovou komponentu 5 (C5a) a větší C5b. Anafylatoxin C5a se váže na C5a receptory a iniciuje vznik akutní zánětlivé reakce. Časná zánětlivá reakce způsobená C5a je přítomna u sepse či systémového lupusu erythematodes. Větší polypeptid C5b reaguje se složkami C6, C7, C8 a C9, čímž dochází k vytvoření komplexu atakujícího membránu (MAC) – C5b-9, který se zúčastňuje buněčné lýzy, aktivace a produkce prozánětlivých mediátorů. Nedostatek C5 je spojován s novorozeneckými dermatitidami. [5, 6]

C5a je malý polypeptid složený ze 74 aminokyselin s molekulovou hmotností 11 kDa. C5a po štěpení z C5 existuje velmi krátce a jeho nestabilní forma je přeměna na více stabilní, nicméně stejně aktivní formu C5a-desArg. Jako anafylatoxin působí prozánětlivě a jako chemoatraktant působí na eozinofily nebo monocyty. Jeho koncentrace je zvýšená u sepsí způsobených gram-negativními bakteriemi, u ischemických srdečních onemocnění a v nepřeborném množství autoimunitních onemocnění. [5]

CD59 je glykoprotein vyskytující se na povrchu buněk. Jeho funkcí je regulace (inhibice) komplementem indukované lýzy buněk. Zároveň se podílí na signální dráze vedoucí k aktivaci T lymfocytů. Deficience CD59 vede k onemocněním a komplikacím jako hemolytická anémie nebo trombóza. [5]

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Uskutečněná studie měla za cíl stanovit koncentrace vybraných parametrů infekce a zánětu, které by mohly s minimální invazivitou predikovat PPRM a předčasný porod. Nové parametry se měly ověřit na souboru pacientek rozdělených do 4 skupin. První skupina s nejzávažnějším postižením, tedy prokázaný probíhající zánět (chorioamnionitidu a/nebo funisitidu) a mikrobiální invazi do plodové vody. Druhá skupina má rovněž prokázané zánětlivé změny, ale bez průkazu infekčního agens v plodové dutině. Třetí skupina je charakterizována pouze mikrobiálním osídlením bez zánětu. Čtvrtá skupina slouží jako kontrolní a skládá se z pacientek bez mikrobiální invaze i bez prokázaného zánětu. Výsledky testování vybraných parametrů vrozené imunity a zánětu by měly být statisticky vyhodnoceny a porovnány ve výše zmíněných skupinách. Smyslem této práce je posouzení testovaných parametrů z hlediska klinické využitelnosti. Studie je součástí širšího projektu zaměřeného na hledání potenciálních biomarkerů pro predikci předčasného porodu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Imunitní systém v těhotenství

Imunitní systém (IS) matky v těhotenství prochází řadou zásadních změn. Představa považující těhotenství za období imunologické slabosti matky a vyšší náchylnosti k infekcím, je dnes již přežitkem. Současné teorie potvrzují opak, tedy funkčnost a vysokou aktivitu IS během těhotenství. [7, 8] Imunitní systém matky je plně kompetentní a schopný ochránit sebe i vznikající nový život před většinou rizikových situací, zejména infekčních. Navíc matka musí především v časných stadiích gravidity řešit klíčové dilema. Na jedné straně je její imunitní systém vystaven antigenní výbavě plodu, který je *de facto* semialoštěp, tzn. z poloviny má HLA výbavu a další charakteristiky otce. Pro matku je plod částečně cizí a imunitní systém matky musí pomocí specifických mechanismů tkáně plodu tolerovat. Na druhé straně musí být matka připravena bránit sebe i plod před infekčními hrozbami a před negativními vlivy zevního prostředí. [6-8] Tolerance plodu je udržována po celou dobu těhotenství a s přicházejícím porodem postupně slábne – dává prostor pro úspěšný zrod nového života. Správný průběh těhotenství z imunologického hlediska je zajištěn humorálními i buněčnými složkami imunity, zapojují se mechanismy vrozené i adaptivní imunity. Na straně obrany proti infekci můžeme jmenovat antigen prezentující buňky (APC), zejména dendritické buňky a buňky monocyto-makrofágové, buňky přirozené cytotoxicity (ILC, Innate Lymphoid Cells), k nim patří zejména NK buňky, a dále B-lymfocyty a protilátky a také T-lymfocyty všech subpopulací a subsetů. Na straně tolerance plodu je třeba zmínit regulační T-lymfocyty (Treg), specializované uterinní (uNK) buňky, regulační HLA molekuly, zejména HLA G, regulační a inhibiční faktory komplementového systému a další mechanismy. Významnou a nezastupitelnou roli hraje i neuroendokrinní systém. [6] Těhotenství je také považováno za Th2 fenomén, kdy je z důvodu tolerance plodu vychýlena rovnováha mezi základními efektorovými subsety T-lymfocytů Th1/Th2 ve prospěch Th2 subsetu, který je považován za méně rizikový z hlediska iniciace poškozujícího zánětu. Úlohu regulačních Treg T-lymfocytů potvrzuje zjištění, že s nimi spojené cytokiny jako interleukin 10 (IL-10) a transformující růstový faktor beta (TGF- β) jsou ve zvýšené míře přítomny ve druhém trimestru a v části třetího trimestru, zatímco značná část prvního

trimestru a konec těhotenství jsou charakterizovány zvýšenou zánětlivou aktivitou. [9, 10]

Imunitní systém je aktivní i během menstruačního cyklu, kdy dochází k cyklické remodelaci dělohy směřující k vytvoření vhodných podmínek pro uhníždění embrya. Kromě klíčového vlivu endokrinního systému na proměny děložní sliznice byly zaznamenány i výrazné změny v zastoupení jednotlivých populací a subpopulací lymfocytů. Nejpodstatnějšími jsou Treg a uterinní NK buňky (uNK), jejichž množství narůstá v období luteální fáze z důvodu přípravy na implantaci embrya. Cílená migrace těchto buněk je řízena chemokiny, zejm. makrofágovým zánětlivým proteinem 1β (MIP- 1β) [3]. Množství uNK je odhadováno na 70 % ze všech leukocytů a množství leukocytů je popisováno jako 30-40 % zastoupení ze všech buněk přítomných v děložní sliznici, což leukocyty řadí k nejvýznamnějším činitelům v procesu přípravy na těhotenství. [8, 11]

Příprava na toleranci plodu začíná již při oplodnění. Bylo prokázáno, že seminální plazma tlumí efektorové $CD4^+$ i $CD8^+$ T-lymfocyty a podporuje diferenciaci regulačních T-lymfocytů. Seminální plazma dále obsahuje vysoké hladiny prostaglandinu E, který působí imunosupresivně na cytotoxické NK buňky, $CD8^+$ T lymfocyty a pomocné induktorové $CD4^+$ lymfocyty, reguluje diferenciaci dendritických buněk (DC) směrem k tolerogenním formám. Po vzniku zygoty, která obsahuje kombinaci genomu matky a otce, je vajíčko před IS ženy chráněno zónou pellucidou, která funguje jako obranná bariéra. Po migraci zygoty do děložní dutiny musí dojít k nidaci vajíčka do intersticiálního prostoru a prostoru spirálních artérií. Podmínkou je rozrušení extracelulární matrix, kde se uplatňují matrixové metaloproteinázy, jejichž producentem jsou zejména uNK. [6, 12]

Imunitní mechanismy, obstarávající zdravý průběh těhotenství, zahrnují taktéž anatomické bariéry mezi matkou a plodem, jejichž funkcí je omezení kontaktu pouze na trofoblastové buňky plodu. Neméně důležitým imunitním mechanismem je schopnost plodu snížit expresi svých antigenních charakteristik na membráně trofoblastu, včetně HLA molekul I. a II. třídy, čímž je zajištěna ochrana před $CD8^+$ cytotoxickými lymfocyty. Zároveň ale trofoblast exprimuje speciální

molekuly HLA-E a HLA-G, které chrání před aktivací NK buněk matky a následným zničením plodových buněk. Solubilní forma HLA-G je fyziologicky detekovatelná v seminální plazmě mužů a v krevní plazmě mužů i žen, následně membránové formy HLA-G jsou mimo jiné přítomny na epitelových buňkách thymu. HLA-G se vazbou na specifické receptory podílí na snižování cytotoxické aktivity uNK a indukují transformaci DC a makrofágů do tolerogenních forem, což má za následek vznik Treg, resp. indukovaných T regulačních lymfocytů (iTreg). Treg dosahují maxima ve 2. trimestru, poté jejich počet v krevním oběhu matky klesá a po porodu se počty ustalují na normálních hodnotách. Ochranu před aktivovanými T lymfocyty zajišťuje i zvýšená exprese molekuly Fas ligand (FasL) na povrchu deciduálních buněk a trofoblastu, což po kontaktu s receptory na T lymfocytech spouští jejich apoptózu a aktivované T lymfocyty hynou. Před cytotoxickým poškozením komplementovým systémem jsou tkáně plodu opatřeny protectinem (CD59), který zabraňuje vzniku komplexu atakujícího membránu (MAC, Membrane Attack Complex). Pravděpodobně podporuje imunotoleranci i fetální mikrochimerismus, ke kterému dochází v období 6. týdnu těhotenství a přetrvává i dlouho po porodu. [6]

Důležitým imunologickým fenoménem spojeným s těhotenstvím je nastavení vztahu mezi jednotlivými subsety pomocných T lymfocytů (Th; Helper T cell). Naivní Th0 buňky jsou diferencovány do subsetu Th1, zapojeného do buněčné imunity a do Th2, spojeného spíše s humorální imunitou. V těhotenství dochází k relativnímu potlačení Th1 subsetu ve prospěch Th2 typu imunitní odpovědi, čímž je docíleno tolerance alloantigenů plodu a ochrany před možným poškozujícím zánětem. [13] Nicméně, současné poznatky shrnují tuto teorii tolerance jako nedostatečnou a příliš zjednodušující a přiklánějí se ke klíčové úloze regulačních subsetů Treg. [8]

Těhotenství se dělí do tří imunologických fází, z nichž je každé období charakteristické odlišnými biologickými procesy. [14] První trimestr a časná fáze druhého trimestru je popisována jako prozánětlivá. Je spojena s „ranními nevolnostmi“, které jsou klinickými projevy obrany proti biologickým dějům zahrnujícím invazi zárodečných buněk do mateřských endoteliálních buněk apod. [8] V druhé imunologické fázi, která je časově variabilní a každá žena ji prodělává jinak, dochází k největšímu vývoji a růstu plodu. Matka a plod jsou ve velmi úzkém

vztahu symbiózy, a proto jsou procesy spíše protizánětlivé. Závěrem těhotenství, v období, kdy jsou orgány plodu vyvinuty, se IS matky připravuje na porod, který je vyvolán obnovením zánětlivé reakce. Poslední fáze je charakteristická invazí imunitních buněk do myometria a indukci zánětu. Prozánětlivé podněty vyvolají kontrakce dělohy, porod dítěte a následné odvrhnutí placenty. [15, 16] Závěrem lze tedy těhotenství charakterizovat jako protizánětlivé i prozánětlivé období, v závislosti na gestačním věku. [17]

3.2 Komplementový systém v těhotenství

Komplementový systém je, mimo jiné, reprezentativní součástí procesu napomáhající oplodnění a nadcházejícího úspěšného těhotenství. Mnoho činitelů působících biologické změny v graviditě bylo popsáno výše, nicméně nové studie potvrzují taktéž neopominutelný vliv delikátní regulace aktivace komplementového systému. [18, 19]

Komplementový systém se účastní všech fází těhotenství a je součástí vrozené imunity. Obsahuje více než 40 faktorů, které mohou interagovat v procesu komplementové kaskády a podněcovat rozvoj zánětlivé reakce. Rozvoj komplementové kaskády vede vlivem enzymatického štěpení k aktivaci složek opsonizujících cílové molekuly k fagocytóze a podporujících prostřednictvím anafylatoxinů chemotaxi a zánět. Komplementový systém může být aktivován třemi způsoby: klasická cesta aktivace, alternativní cesta aktivace a lektinová cesta aktivace. Všechny tři cesty mohou vést ke zvýšené syntéze C3 a C5 konvertáz, vedoucí ke štěpení složek C3 a C5 na jejich produkty, respektive C3a a C5a. Aktivace konvertázy C5 vede ke vzniku terminální aktivace komplementového systému a tvorbě MAC. [20]

Iničiační molekulou klasické cesty aktivace komplementového systému je složka C1q, která je silně zastoupena ve stromatu děložní sliznice a jejímž úkolem je rozpoznání poškozených buněčných struktur, apoptotických tělísek a povrchů mikroorganismů. Za fyziologických podmínek C1q hraje důležitou roli ve formování placenty a udržení těhotenství. C1q je prostředníkem mezi trofoblastem a deciduálními endotelovými buňkami, kdy tato interakce neaktivuje komplementovou kaskádu. [20-24]

Alternativní cesta je jedním z evolučně nejstarších procesů. V případě alternativní cesty je C3b kovalentně navázáno na povrchu buňky a zároveň inaktivováno solubilním či na povrchu vázaným komplementovým regulátorem, faktorem H. V případě selhání tohoto inhibitoru je započata aktivace alternativní cesty. Dochází k aktivaci mnoha molekul C3 a současně k opsonizaci cílové struktury pomocí C3b a následné fagocytóze. [20]

Lektinová cesta je aktivována navázáním lektinu vázající manosu (MBL; Mannan-binding Lectin) nebo fikolinů na povrch bakterií nebo patogenních hub obsahující sacharidové struktury typu mananu nebo N-acetylglukosaminu. To vede k aktivaci specifických proteáz MASP (MBL-associated Serine Proteases) a nastartování komplementové kaskády. [20]

Při klasické a lektinové cestě je C3 konvertáza aktivovaná rozštěpením složky C4, což ovlivňuje její hladiny v plazmě a reguluje aktivaci těchto dvou cest. [18, 20]

Vzhledem k přítomnosti apoptických buněk a volných deoxyribonukleových kyselin (DNA) v počátku těhotenství, by mohlo rovněž docházet k nežádoucí aktivaci komplementového systému, nicméně tomu tak není vlivem regulačních proteinů produkovaných syncytiotrofoblastem. [18, 19] Komplementové regulační proteiny jsou důležité v ochraně zdravých buněk před jejich zničením. Většina komplementových inhibitorů je složena asi z 60 aminokyselinových jednotek, které dávají vznik doméně nazývané se protein regulující komplement (CCP; Complement Control Protein). [20]

Hlavním regulátorem alternativní cesty je C3 inhibitor. Faktor H je složen z 20 CCP domén s různou specifitou pro solubilní C3b i C3b vázaný na buněčném povrchu. [20, 25] Dalšími regulátory vazby na membránu jsou CD35, CD46 a CD55, které se účastní zejména klasické a alternativní cesty aktivace. [20] Regulační protein CD35 inhibuje C3 aktivaci a navázáním na C3b a C4b částice zajišťuje jejich odstranění. [26] CD46 neboli membránový proteinový kofaktor (MCP; Membrane Cofactor Protein), má vlastnost kofaktoru faktoru I, čímž podporuje inaktivaci C4b a C3b. Protein CD55 neboli faktor urychlující rozpad (DAF; Decay-accelerating Factor) se podílí na rozkladu C3 konvertázy. Současně jsou vlastní buňky chráněny před nežádoucím sestavením MAC komplexu a následnou lýzou protectinem (CD59), který je jediným MAC inhibitorem na povrchu buněčných membrán, který

blokuje vznik a zanoření polymerizujícího komplexu C9 do membrány buňky. [20, 27, 28] Protectin, MCP a DAF jsou molekuly obsažené v proteasomech produkovaných prostatou. Účelem těchto vesíků je ochrana spermií před komplementovým systémem ženy v cizorodém prostředí reprodukčního traktu. Jediným pozitivním regulátorem komplementového systému je properdin, který působí jako antagonist faktorů H, tedy stabilizuje C3 konvertázu. [29, 30]

Obecně lze tedy říci, že pro těhotenství je aktivace, respektive regulace aktivace komplementového systému, velmi rozhodující. Jakákoliv odchylka v aktivaci, či regulaci komplementového systému může vést k nepříznivým vlivům na budoucí těhotenství a způsobovat spontánní potraty, předčasné porody a preeklampsii. [31-33]

3.2.1 Deficience složek komplementového systému v těhotenství

Kvalitativní (funkční) a kvantitativní deficience hlavního regulačního proteinu klasické i lektinové cesty, inhibitoru C1, vede k neregulované aktivaci složek komplementové kaskády. V laboratorním nálezu takto postižených jedinců jsou detekovány zvýšené hladiny C3a a C5a v plazmě, což má za následek syntézu hned několika mediátorů převážně s anafylaktickým, chemotaktickým a vazoaktivním účinkem. Inhibitor C1 má také vliv na funkci kininové a koagulační kaskády. Při patologické poruše inhibitoru dochází ke zvýšení hladin konečného produktu kininové kaskády, bradykininu, což vede ke zvýšené permeabilitě cév a ke vzniku angioedému. Onemocnění cév zvyšují riziko spontánního potratu a ohrožují těhotenství. [24, 34]

Vrozené poruchy komplementových složek patří mezi vzácná onemocnění. Jedná se o poruchu jakékoliv části komplementové kaskády a jejich regulátorů. Poruchy počátečních složek komplementové kaskády vedou k autoimunitním onemocněním, jako je systémový lupus erythematodes. [34]

Deficience následných složek a faktorů se projevuje nejčastěji opakovanými, někdy i letálními, bakteriálními infekcemi. Mezi patogeny patří nejčastěji bakterie s polysacharidovým pouzdrem jako je např. *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* anebo *Haemophilus influenzae*. Deficit důležitého opsoninu C3b vede ke

zvýšené náchylnosti k pyogenním infekcím. Stejně se může projevit i nedostatek faktoru B nebo MASP2. [34]

Atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS) je vzácné a závažné onemocnění, způsobené poruchou funkce regulačních faktorů alternativní cesty komplementového systému, mezi které patří faktor H, faktor I nebo MCP. AHUS je spojeno s projevy hemolytické anémie, trombocytopenie nebo trombotické mikroangiopatie. Mikrotromby, vzniklé po poškození endotelu cév komplementovým systémem, ohrožují zejména placentu a ledviny. AHUS zvyšuje riziko závažných komplikací jako je spontánní potrat, preeklampsie anebo membranoproliferativní glomerulonefritida. [35]

Vrozené poruchy terminální fáze komplementové kaskády, resp. C5-C9 jsou taktéž vzácné. Klinická manifestace těchto onemocnění je velmi různorodá. Nicméně typickým projevem jsou meningokokové infekce, vyplývající z poruchy vzniku MAC a zajištění ochrany před opouzdřenými bakteriemi. [36]

Regulační proteiny jako je CD59, či CD55, jsou navázány na membránu buňky pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Mutace v genu pro tvorbu GPI kotvy způsobuje onemocnění paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH), které je charakteristické chybním membránových proteinů vlivem nepřítomnosti spojující GPI kotvy. Nedostatkem protektivních proteinů dochází k nadměrné lýze buněk alternativní cestou aktivace komplementového systému. Důsledkem je hemolýza, trombocytopenie a trombóza cév. PNH ovlivňuje fyziologický průběh těhotenství až u jedné poloviny žen s tímto onemocněním a způsobuje komplikace jako je předčasný porod. [24]

3.2.2 Komplementový systém u těhotných s autoimunitním onemocněním

Autoimunitní onemocnění ovlivňující průběh všech etap těhotenství jsou zejména antifosfolipidový syndrom (APS) a systémový lupus erythematosus (SLE). [19, 37]

Laboratorním nálezem u APS jsou protilátky proti fosfolipidovým autoantigenům. Antifosfolipidové protilátky (APLA) obsahují vazebné místo pro

negativně nabité fosfolipidy, jako je kardiolipin, fosfatidylserin aj., navázané na kofaktory proteinové struktury. Vazba fosfolipidu s kofaktorem (např. annexin V) způsobí odhalení nových antigenů, specifických pro vazebná místa na APLA. Jedná se o onemocnění postihující zejména cévy a způsobující trombotické změny, trombocytopenii, u těhotných opakované potraty, preeklampsii, předčasné porody a intrauterinní růstovou restrikcí. Antifosfolipidový syndrom způsobuje změny spirálních artérií s mikrotrombotizací placenty, což vede ke snížení perfúze placenty, hypoxii a usmrcení plodu. [37]

Annexin V je protein vyskytující se v placentě převážně na povrchu endotelových a trofoblastových buněk. Jeho umístění na buněčných membránách, v okolí negativně nabitého fosfolipidu, vytváří ochrannou bariéru proti aktivaci koagulační kaskády. V přítomnosti patologických APLA je tato ochrana porušena a dochází ke zvýšení rizika koagulačních a trombotických komplikací. Annexin V je vyjmut z povrchu membrány, navázán jako kofaktor na fosfolipidy a pomocí neoantigenů také na APLA. Tento proces vede k aktivaci klasické cesty komplementové kaskády s výslednou terminální fází a tvorbou MAC komplexu. V důsledku dochází k poškození buněk trofoblastu a endotelu cév placenty, silné trombotizaci tkáně a následné ztrátě funkce. V souvislosti s aktivací komplementového systému dochází k uvolnění C5a, jakožto prozánětlivého chemoatraktantu, jeho navázání na receptor C5aR na povrchu neutrofilních granulocytů a jejich následnou aktivaci. [31, 37]

Onemocnění SLE, je také manifestováno autoprotilátkami, resp. celým spektrem autoprotilátek. Protilátky vytváří imunokomplexy s nukleoproteiny, fosfolipidy i složkami komplementového systému, které se hromadí v orgánech a tkáních. Častými orgány postiženými zánětem jsou ledviny, plíce nebo kůže. Vzniklé imunokomplexy jsou příčinou aktivace komplementového systému, který působí zejména prozánětlivě s výsledným poškozením daného orgánu. SLE může rovněž souviset s komplikacemi v graviditě s rizikem preeklampsie, intrauterinní růstové retardace plodu a potratem. [24, 38]

3.2.3 Komplementový systém u opakujících se potratů

Potrat je definován jako spontánní zástava těhotenství před dosažením životaschopnosti fetu. Potrat prodělá pravděpodobně 15 % zjištěných těhotenství a z toho 1 % žen trpí opakujícími se potraty, které jsou definovány jako tři a více přerušovaných těhotenství. [39]

Komplementový systém je taktéž spojován s problematikou opakovaných potratů, a to jak v případě aktivace pomocí protilátek i bez protilátkové přítomnosti. Aktivace komplementu pomocí protilátek byla studována u těhotných myší s antifosfolipidovým syndromem, u kterých docházelo vlivem vysokých hladin komplementových aktivátorů k poškození placenty a následné ztrátě plodu. [37] Zvýšené hladiny C3 a C4 v plazmě byly nalezeny u pacientek s nevysvětlitelnými opakujícími se potraty. [40]

Souhrnně lze říci, že obě skupiny, s nevysvětlenou příčinou potratů a s antifosfolipidovými protilátkami, měly vyšší hladiny komplementových faktorů v séru. Nedostatečná inhibice komplementu nejspíše přispívá k odmítnutí plodu. Zda je samotná inhibice komplementu dostatečná k zachování těhotenství a zabránění potratu ale není objasněno. [41]

3.2.4 Komplementový systém u těhotných s preeklampií

V raných fázích těhotenství je nutné zapojení regulovaného zánětu k placentaci a zajištění zdravého průběhu těhotenství. [42] Tento fakt se prakticky projevuje i u aktivace komplementu jako zvýšené hladiny solubilních C3a a C5a složek komplementu. [43] Nicméně v případě preeklampsie jsou prozánětlivé reakce nadměrné. Apoptované struktury, jako jsou např. poraněná tkáň pocházející z placenty nebo poškozené mateřské endoteliální buňky, zvyšují potřebu odstraňování odpadu pomocí fagocytózy [44], čímž dochází ke zvýšené aktivaci komplementového systému. Je to způsobeno zvýšenou poptávkou po opsonizaci apoptických buněk. [45]

Komplement náleží do první linie imunologické obrany v krevní cirkulaci a tkáních a působí také jako regulátor adaptivních imunitních procesů. Vilózní buňky trofoblastu zanořující se do tkání matky mohou potencionálně aktivovat

komplement skrze protilátky přítomné v matčině cirkulaci. Současně syncytiotrofoblast, jakožto povrch placenty, je vystaven kontaktu s mateřskou krví a aktivace komplementu vede k uvolnění prozánětlivých a chemotaktických působků, resp. anafylatoxinů, s potencionálním vznikem zánětu, trombocytopenie anebo poškození cévních stěn. [20, 46]

Preeklampsie je onemocnění postihující celosvětově 2-10 % těhotných a způsobující závažné kardiovaskulární a respirační komplikace u matky i dítěte. [47] Preeklampsie je diagnostikována na základě hypertenze a proteinurie matky, objevující se po 20. týdnu gravidity s přidruženým klinickým a laboratorním nálezem jako je trombocytopenie, poruchy funkce jater, bolest hlavy anebo velmi častá vaskulopatie placenty, či jiných orgánů matky. Jedná se o onemocnění způsobující novorozenecká úmrtí a následná postižení, navzdory intenzivním snahám o objasnění její etiologie a patogeneze, která dodnes není zcela jasná. [20, 48]

Důsledkem preeklampsie je primárně porucha funkce placenty a její vyživovací funkce plodu s následnou nitroděložní růstovou restrikcí plodu. Charakteristikou preeklampsie je pozměněná placenta s nedostatečnou trofoblastickou invazí do stěn spirálních a bazálních artérií a také neúplnou penetrací do myometria. U artérií nedochází k jejich dostatečné dilataci jako u fyziologického těhotenství. Zásobování placenty není uspokojivé a dochází k hypoxii s následnou ischemií tkáně. Dysfunkce epitelu ovlivňuje rovnováhu faktorů podílejících se na angiogenezi i antiangiogenezi. [48]

Bylo prokázáno hned několik genových variant spojených s preeklampsií. Jedním z nich je variace v genu kódující komplementový receptor 3 a 4, který interaguje s ligandem iC3b. Oponin iC3b je inaktivovaný C3b pomocí faktoru I. Poruchy těchto receptorů ovlivňují správné navázání komplementového faktoru, resp. správnou funkci komplementového systému v procesu očišťování organismu fagocytózou. Tato patologie může podporovat hromadění neodstraněných pozůstatků buněk v tkáních matky a způsobovat zánět nebo poškození cév. [49-51]

Závěrem, protilátky, degradační produkty nebo nedostatečná regulace komplementové aktivity může vést ke komplementové dysregulaci s vyústěním v zánětlivé cévní poškození a podílet se na rozvoji preeklampsie. [20]

3.2.5 Komplementový systém u předčasných porodů

Předčasný porod (PP) je patologický stav postihující zdraví novorozence i matky. Studie zkoumající vliv komplementového systému na fyziologii porodu odhalily intrauterinní zánět a zvýšené hladiny zánětlivých markerů v krvi žen s PP. Aktivace komplementového systému v brzkém období gestace (do 20. týdne těhotenství), může být prediktivním faktorem pozdějšího spontánního PP. [52]

Zvýšené hladiny faktoru Bb v počátcích těhotenství jsou asociovány s PP a postihují těhotné s intraamniálním zánětem či bez zánětu. Zvýšené množství C5a v krvi matek je rovněž asociováno s PP, nicméně v souvislosti intraamniální infekcí či zánětem. [52, 53]

Komplementový regulátor CD55 je zvýšen v průběhu normálního těhotenství na povrchu buněk bílé krevní řady a jeho exprese se dále významně navyšuje v případě předčasného porodu. Zvýšení je pravděpodobně způsobeno aktivací zánětlivé reakce v krvi matky. K nejvýraznějšímu vzestupu hladin CD55 došlo v případě žen, u kterých nastal PP až po 34. týdnu těhotenství, což vysvětluje snahu CD55 o potlačení probíhajícího zánětu u žen s PP. [54]

Protektivní protein CD55 by mohl být užitečný pro předpověď PP, a to buď sám, nebo v kombinaci s jiným ukazatelem zánětu. [55]

3.3 Definice předčasného porodu

Předčasný porod je charakterizován jako patologický stav, ke kterému dochází v případě dřívějšího porodu, než je fyziologicky stanovená hranice (37. týden těhotenství). V kritických případech se PP může zásadně podílet na novorozenecké mortalitě, či morbiditě. [56, 57]

K PP dochází přibližně u 6-8 % těhotných žen. Riziko PP se dá v některých případech předběžně stanovit již v raném stádiu těhotenství (anamnéza, infekce, patologie dělohy a děložního čípku, vyšetření na asymptomatickou bakteriurii a bakteriální vaginózu). [58]

PP se rozděluje dle časového schématu na časný předčasný porod (do 33⁺⁶ týdnů těhotenství) a na pozdní předčasný porod (rozhraní mezi 34⁺⁰ a 36⁺⁶ týdnem těhotenství). Přestože v České republice je za nejnižší mez PP považován 24. týden

gestace, všeobecně uznávanou nejnižší hodnotou PP je 20. až 22. týden těhotenství. [59] Prevalence časného spontánního porodu je okolo 1 %. [58]

V posledních desetiletích došlo k zásadnímu pokroku v oblasti péče i o velmi nezrale narozené novorozence (narozené již mezi 24. a 27. týdnem těhotenství). Nicméně až jedna polovina takto narozených dětí trpí zdravotními komplikacemi, které souvisí s nedonošením. Mezi takovéto komplikace patří například mozková obrna, chronické plicní onemocnění, slepota, mentální retardace, neurosenzorická ztráta sluchu, vývojové handicapy, či pozdější různé komplikace. [56, 57] Taktéž u později narozených dětí (mezi 32. a 36. týdnem těhotenství) by se závažnost následků neměla podceňovat. Těmto dětem hrozí riziko rozvoje syndromu akutní dechové tísně, žloutenka, teplotní nestabilita, obtíže se správným vyživováním, či v neposlední řadě opožděný vývoj mozku. [60, 61]

Ovšem i z finančního hlediska je zdravotní péče o předčasně narozené novorozence výzvou. Data z USA poskytují informace o výdajích za krátkodobou a dlouhodobou zdravotní péči o předčasně narozené děti. Náklady na zdravotní péči se pohybují v hodnotách desetkrát vyšších, než odpovídá fyziologicky narozeným zdravým jedincům. [62, 63] Samozřejmě tyto odhady nezahrnují těžko vyčíslitelné emoční a psychologické dopady na tyto děti a jejich rodiny. [56]

Nejčastějšími příčinami novorozenecké úmrtnosti v globálním měřítku jsou PP, závažné infekce a asfyxie. [58] PP je dominantou spíše vyspělých zemí, kde došlo k největšímu nárůstu případů v posledních třiceti letech. [62] Statistiky vypovídají o tom, že se ročně narodí předčasně asi 15 milionů dětí, z nichž více než 1 milion novorozenců umírá z příčin spojených s komplikacemi předčasného porodu a jedná se dokonce až o polovinu všech úmrtí novorozenců. [58, 63] PP jsou druhou nejčastější příčinou smrti u dětí do 5 let a nejzávažnějším původcem přímé smrti novorozence v prvních měsících života. [64]

Přes snahy porodníků o zlepšení situace v otázce množství předčasně narozených dětí se vize nedaří naplnit a PP se tak stává prioritou ve zvyšování úrovně veřejného zdraví. [57, 63] V dnešní době je známo mnoho biologických faktorů souvisejících s PP, nicméně žádný z nich sám o sobě neumí s dostatečnou správností a přesností předurčit přicházející PP. [56] Jedním z klíčových cílů je

hledání vhodných biomarkerů nebo jejich kombinací, které by spolehlivě predikovali PP, zejména riziko infekce a zánětlivých komplikací. [58]

3.3.1 Příčiny předčasného porodu

Příčin PP může být mnoho, ale obecně se dají rozdělit na dvě základní skupiny: iatrogenní a spontánní předčasné porody. Iatrogenní PP je důsledkem lékařského zásahu, a to z důvodů, které ovlivňují přímo samotný plod a/nebo stav matky. Výsledkem tohoto rizikového stavu je nutnost ukončení těhotenství před 37. týdnem gestace. Příkladem důvodu pro iatrogenní PP je preeklampsie, intrauterinní růstová restrikce, či riziko hypoxie plodu. Na druhé straně ke spontánnímu PP dochází samovolně i přes veškeré snahy porodníků porod oddálit. Je známo, že více než 80 % PP připadá právě na skupinu spontánních PP. Spontánní PP je opět dělen, a to na podskupinu spontánní předčasný porod se zachovalým vakem blan a na porod s předčasným odtokem plodové vody a rupturou plodových obalů (PPROM; Preterm Premature Rupture of Membranes). [56]

Z dosavadních poznatků se dá předpokládat, že spontánní PP je způsoben různorodým souborem spouštěčů. Mezi nejčastější příčiny PP patří gynekologické krvácení, porucha čípku, infekce, malnutrice, vícečetné těhotenství a předčasný odtok plodové vody. [65]

3.3.2 Předčasný odtok plodové vody

Spontánní ruptura plodových obalů předchází fyziologickému porodu, který nastává přirozeně či je vyvolán v rozmezí 12 až 24 hodin. Naopak PPRM je charakterizován jako porušení plodových obalů s odtokem plodové vody nerespektující gestační věk (před 37. týdnem těhotenství) a nástup pravidelných děložních kontrakcí. [1, 66] Jiní autoři PPRM definují jako porušení plodových obalů s odtokem plodové vody a latencí mezi nástupem děložní činnosti alespoň v hodinovém intervalu. [67] V případech, kdy riziko infekce převáží risk narození nevyvinutého jedince, je porušení plodových obalů a porod dokonce doporučován. [66] PP je z 30-40 % způsoben právě PPRM a celkově je PPRM komplikací asi 2-4 % těhotenství. Nejčastější je tzv. pozdní PPRM, který se objevuje mezi 34.-37. týdnem těhotenství. [1, 68]

Příčin PPRM může být mnoho. Mezi faktory nejčastěji spjaté s PPRM patří: infekce v choriodeciduálním prostoru, mikrobiální intraamniální zánět, nižší obsah kolagenu v plodových obalech, lokalizovaný defekt plodových obalů anebo apoptóza buněk plodových obalů. [1]

Fetální membrány slouží jako bariéra proti infekci, proto v případě jejich porušení jsou komplikacemi ohroženi jednak plod, ale samozřejmě i matka. [66] Mikrobiální a zánětlivé komplikace se objevují zhruba u 30-35 % všech PPRM a jsou charakteristické jednak přítomností mikroorganismů a/nebo intraamniálním zánětem. Nejčtenějšími mikroorganismy způsobujícími komplikace jsou genitální mykoplazmata, resp. *Ureaplasma parvum* a *Ureaplasma urealyticum*. [68] Infekce a intraamniální zánět mohou být odpovědné za aktivaci vrozené imunity plodu vedoucí k zánětlivé odpovědi. Ačkoliv produkce prozánětlivých mediátorů patří mezi obranné mechanismy plodu, nadměrná sekrece těchto látek může mít na plod negativní důsledky. Zánětlivá odpověď plodu se dá detekovat ze vzorku pupečnickové krve pomocí inflamatorních markerů, jejímž hlavním zástupcem je IL-6. Hladiny IL-6 vyšší než 11 pg/ml se definují jako syndrom fetální zánětlivé odpovědi (FIRS; Fetal Inflammatory Response Syndrome), který zvyšuje riziko závažných novorozeneckých morbidit. [69, 70] Nejvyšších hodnot IL-6 dosahují těhotné s kombinací infekce v choriodeciduálním prostoru a zároveň s mikrobiálním intraamniálním zánětem. [71] Diagnostika intraamniálního zánětu je založena na detekci zvýšené hladiny inflamatorních mediátorů v plodové vodě. Původcem zánětu mohou být samotné mikroorganismy (intraamniální infekce) či látky pocházející z plodových obalů a placenty (sterilní zánět). [2] V klinické praxi se jako tradiční ukazatel intraamniálního zánětu stanovuje hladina bílých krvinek, glukózy a laktátu v plodové vodě. Novějšími testy jsou stanovení IL-6 v plodové vodě pomocí imunochromatografických POCT testů a/nebo analýza IL-6 elektrochemiluminiscenčním imunostanovením „ECLIA“. Tato vyšetření mají výhodu zejména v rychlosti jejich vyhodnocení, s poskytnutím výsledku v řádu dvou desítek minut. [72]

Diagnostika PPRM je především klinická. Dominantním diagnostickým znakem (až 90 % všech případů) je odtok plodové vody v anamnéze a potvrzení odtoku plodové vody z hrdla či přítomnost depa v zadní klenbě poševní. [66] Pokles

množství plodové vody při ultrazvukovém vyšetření nelze považovat samo o sobě jako verifikaci diagnózy PPRM. Nicméně v některých případech ke stanovení diagnózy může zásadně přispět. [1]

Péče o potenciální pacientku s PPRM zahrnuje potvrzení diagnózy PPRM, potvrzení gestačního stáří, dokumentace stavu plodu a rozhodnutí o způsobu porodu. [66] Management pacientek s PPRM se globálně rozchází ve svém postupu. Obecně řečeno lze pacientky s PPRM sledovat a léčit ambulantně anebo za hospitalizace. [73] V České republice se těhotné s PPRM vždy hospitalizují ve vhodném zařízení dle jejich gestačního stáří a management pacientek se stanovuje individuálně dle jejich stavu. Prvním krokem před stanovením postupu u pacientek s PPRM je nutnost vyloučení hypoxie plodu, závažného vaginálního krvácení a chorioamnionitidy, která se projevuje horečkou matky nad 37,5 °C a přítomností alespoň dvou z těchto příznaků: tachykardie plodu či matky, citlivost dělohy, hnísavý vaginální výtok, leukocytóza, závažné krvácení anebo hypoxie plodu. Těhotenství s PPRM a komplikacemi, jako je některý z výše uvedených příznaků, by mělo být co nejdříve ukončeno adekvátním zákrokem. [72]

Terapie PPRM se upravuje dle gestačního stáří pacientky a zahrnuje podání kortikosteroidů, tokolytik (výjimečně) a antibiotik. Vhodnou podpůrnou terapií je podání antibiotik, které se indikuje u všech žen s PPRM. Vzhledem k možné mikrobiální infekci, se již při příjmu pacientky odebírá vzorek na vaginorektální kultivaci a okamžitě se empiricky podávají profylaktická antibiotika. V případě pacientky bez klinických příznaků intraamniálního zánětu se v podávání antibiotik dále nepokračuje a u pacientek, kterým vyšel pozitivní mikrobiologický nálezn, se přechází na cílenou léčbu založenou na znalostech agens a jeho citlivosti. [74] Antibiotika zároveň prodlužují dobu mezi PPRM a děložními kontrakcemi, pozitivně ovlivňují potřebu podávání surfaktantu nezralému novorozenci, snižují riziko bronchopulmonální dysplazie a abnormalit mozku. [75] Vzhledem k předpokladu nejčastější infekce genitálními mykoplazmaty je lékem volby erytromycin. V České republice bohužel není erytromycin v intravenózní formě dostupný, proto se substituuje azitromycinem či claritromycinem. [72]

V souvislosti s PPRM hrozí vyšší riziko rozvoje komplikací při následném jednočetném těhotenství, avšak nesnižuje se šance na další těhotenství. [76]

PPROM je dnes těhotenská komplikace, kterou nelze léčebnými postupy zabránit ani ji předpovědět. Nicméně nové studie využívající tkáňové modely z plodových obalů napovídají, že progesteron či 17-alfahydroxyprogesteron kaproát mohou účinkovat jako prevence proti zeslabení plodových obalů a jejich následné protržení. [77]

3.3.3 Management předčasného porodu

Management předčasného porodu zahrnuje následující postup: stanovení rizika hrozícího PP; diagnostika PP; objasnění etiologie PP; zjištění stavu plodu; podání profylaktické terapie plodu; zahájení tokolýzy. [58]

Vzhledem k limitovaným možnostem prevence PP je majoritní snahou lékařů porod co nejvíce oddálit a optimalizovat podmínky pro příchod plodu. Základní podpůrnou léčbou je podání terapeutické dávky kortikoidů pro podporu vyžívání plicní tkáně plodu, díky které se sníží zejména riziko rozvoje respiračních obtíží po narození. U rodiček s pravidelnými kontrakcemi, včetně pokročilého vaginálního nálezu, nemá profylaktické podávání kortikoidů význam. Alternativou ke kortikoidům je podávání látek stimulujících plicní surfaktant, aminofylinu nebo ambroxolu. Současně se aplikují látky zpomalující děložní činnost, které napomáhají prodloužení období pro podávání léčebné dávky kortikoidů a maximalizují tak jejich účinnost. Odsunutí termínu PP může taktéž pomoci získat dostatek času pro převoz matky do vhodného zařízení s péčí o předčasně narozené novorozence. [56, 58, 65]

Predikce PP se opírá zejména o preventivní terapii s cílením zvláště na ženy v rizikové populaci. Současné metody terapie rizikových žen se odvíjí od klinické manifestace v období gravidity. Těhotným ženám bez klinických symptomů, ale se známým rizikovým faktorem, může příznivě pomoci podávání progesteronu. [78-80] Progesteron podaný mezi 20. až 34. týdnem sníží riziko porodu před 34. týdnem až o 25 %. Naopak se neosvědčil klidový režim v nemocnici či doma, který je celosvětově doporučován ke snížení rizika PP. V randomizovaných výzkumech u dvoučetných těhotenství byl nedostatek pohybu prokázán jako faktor podílející se na vyšším riziku PP. Rovněž se dle studie klidový režim podílí na zvyšujícím se riziku žilní trombózy, svalové atrofie či stresu. [58]

Terapie žen s klinickými příznaky je založena obvykle na potlačení děložní aktivity pomocí tokolytik a podání dalších látek jako jsou inhibitory cyklooxygenázy, inhibitory syntézy prostaglandinu, blokátory vápníkových kanálů, či antagonisté receptorů pro oxytocin. [81, 82] Indikací pro podání tokolytik je více než 6 kontrakcí za hodinu a zároveň přítomnost změn na cervixu. Závěrečné rozhodnutí o nasazení tokolytické léčby musí být založeno na potenciálním benefitu pro plod z důvodu nežádoucích účinků širokého spektra tokolytik. Dnes se dává velký důraz na antagonisty oxytocinu, které patří mezi tokolytika s minimálními vedlejšími účinky na matku. [58] Rovněž se jako profylaxe mohou podávat antibiotika (v případě přítomnosti infekce), kortikosteroidy anebo síran hořečnatý. [56] U více než poloviny (necelých 80 %) žen, které jsou přijaty do porodnice s děložními kontrakcemi mezi 24. a 36. týdnem těhotenství, se o PP nejedná. K rozpoznání reálného PP se využívá zejména vyšetření cervikometrie a stanovení cervikovaginálního fetálního fibronektinu. [58]

Rozpoznání rizikových těhotných žen je velmi individuální. Pro jejich lepší charakterizaci, a zároveň pro indikaci vhodnější terapie, je zásadní se zaměřit na mechanismus PP, jeho příčinu a na identifikaci spolehlivých biomarkerů pro časnou detekci PP. [83]

Základní otázkou, kterou je nutné si položit, je – pomocí jakých ukazatelů lze PP predikovat před jejich klinickými projevy a jaké jsou možnosti terapie žen s rizikem PP, resp. PPRM? Dnešní screeningové testy pro předpověď spontánního PP kombinují více přístupů a lze je rozdělit do tří základních kategorií: rizikové faktory, velikost děložního čípku a biochemické markery. [56]

Rizikové faktory PP

Jedním z možných rizikových faktorů předčasného porodu je demografie s příkladem nízkého socioekonomického statusu, nedostatečné prenatální péče, extrémů ve věku matky anebo malnutrice. Taktéž lze mezi rizikové chování zařadit kouření, užívání drog, alkoholu nebo těžkou fyzickou práci. Významné jsou také genetické predispozice PP, resp. rodinná historie, děložní malformace, předchozí předčasný porod, PPRM nebo předchozí operace porodních cest. Riziko PP po jednom či více po sobě následujících předčasných porodech graduje

(jeden PP – 15%; dva PP – 30%; tři – 45%). Na druhou stranu 85 % žen porodí předčasně bez dřívější zkušenosti s PP. Dopad na období porodu má také vícečetné těhotenství a další těhotenské komplikace jako je preeklampsie anebo gestační diabetes mellitus. [58, 84, 85]

Nicméně, vzhledem k tomu, že většina žen nemá v minulosti přítomny žádné rizikové faktory, pomocí kterých by se dal PP předpovědět, jsou rizikové faktory samostatně pro screening PP nepoužitelné. Hodnocení samotných rizikových faktorů je tedy považováno za velice nespolehlivé a způsobuje falešnou negativitu až u 50 % pacientek. [65, 84]

Délka děložního čípku

Variace ve velikosti děložního čípku může být způsobena biologicky, či patologicky v důsledku krvácení, infekce vedoucí k zánětu anebo po vícečetném těhotenství. Délku děložního čípku lze monitorovat pomocí ultrazvuku – cervikometrie, ve 22.-24. týdnu gravidity. Velikost cervixu pod desátý percentil charakteristický pro dané období gestace zvyšuje až šestinásobně riziko dřívějšího porodu, resp. riziko spontánního PP je nepřímě úměrné velikosti cervixu. [58, 65] Zároveň byla potvrzena souvislost mezi délkou děložního čípku a množstvím T-regulačních lymfocytů. V situaci, kdy byl počet těchto lymfocytů snížen a zároveň byl děložní čípek zkrácen, vzrostlo riziko předčasného porodu až třicet pětkrát. [86]

Celosvětově nelze, v závislosti na nutnosti ultrazvukového vybavení, považovat cervikometrii za rutinní vyšetření predikující PP, ačkoliv v rozvinutých zemích se měření délky děložního čípku považuje za jeden z nejlepších prediktivních ukazatelů PP. [56, 87]

Biochemické parametry

Laboratorní parametry jsou v medicíně nezastupitelnými a užitečnými nástroji diagnostiky a monitorování různých onemocnění. Nejinak je tomu i v případě predikce PP. Hledání vhodných markerů využitelných pro spolehlivou předpověď PP je cílem bádání mnoha vědeckých skupin na celém světě. Laboratorní parametry jsou sofistikované, reprodukovatelné a dostupné pro všechna klinická pracoviště. Optimální pro analýzu jsou tělní tekutiny, kde lze vhodnými metodami

detekovat stovky různých proteinových i neproteinových analytů. Biologické tekutiny jako jsou krev (sérum, plazma), sliny, amniotická tekutina a cervikovaginální tekutina (CVF; Cervicovaginal Fluid) jsou snadněji přístupné pro odběr než bioptické vzorky. Tyto tekutiny jsou bohatým zdrojem proteinů a metabolitů, které vykazují změny v hladinách při zánětu a zpravidla mají dynamiku spojenou s gestačním stářím plodu. Další vhodnou cestou k poznání mechanismů porodu a zánětu je použití vzorků tkáně matky a/nebo plodu. Lze využít vaginální epitelie, děložní čípek, endometrium, myometrium, placentu a fetální membrány. S pokrokem v genomice a proteomice je dnes možná identifikovat tisíce genů, či jejich produktů i z velmi malého vzorku tkáně. [88, 89] Pro potřebu klinických pracovišť je optimální, pokud lze analýzu vhodného biomarkeru provést přímo u lůžka pacienta nebo v ambulanci. Takové testy se nazývají POCT (Point of Care Testing) nebo bed-side. Do mnoha klinických oborů včetně gynekologie a porodnictví již pronikají. Další generací těchto testů je uspořádání v podobě multiplexu, tzn. provedení stanovení několika (až mnoha) parametrů v jednom kroku v jednom vzorku pacienta. Toto uspořádání je vhodné i proto, že na základě dosavadních zkušeností nebude patrně jeden izolovaný biomarker stačit pro spolehlivou predikci PP nebo PPRM. [90]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Soubor pacientek

Studie byla provedena na souboru 136 pacientek z Porodnické a gynekologické kliniky FN v Hradci Králové přijaté na kliniku v průběhu roku 2019. Pacientky byly do studie vybrány dle následujících kritérií: a) jednočetné těhotenství komplikované předčasným odtokem plodové vody mezi 24⁺⁰ a 36⁺⁶ gestačním týdnem a b) věk matky vyšší než 18 let. Vylučovací kritéria byla: a) komorbidity spojené s těhotenstvím i předcházející graviditou (růstová restrikce plodu, gestační a pregestační diabetes, gestační i chronická hypertenze, preeklampsie aj.), b) abnormality plodu, c) příznaky fetální hypoxie a d) významné vaginální krvácení. Gestační stáří bylo určeno pomocí fetální biometrie v prvním trimestru. Ženy s PPRM mezi 24⁺⁰ a 34⁺⁶ gestačním týdnem byly léčeny antibiotiky. Pacientky s intraamniálním zánětem klaritromycinem v první linii a dále dle mikrobiologického nálezu, zatímco pacientky bez intraamniálního zánětu benzylpenicilinem. Matky dále dostávaly kortikosteroidy (betametason) pro podporu maturace plic a snížení neonatální mortality a morbidity. Předčasná ruptura plodových obalů spolu s odtokem plodové vody (PPROM) byla diagnostikována porodníkem pomocí sterilního spekula na základě hromadění plodové vody v posterior fornix vaginy. V případě nejasného výsledku byla ztráta plodové vody potvrzena přímo na klinice stanovením inzulinu podobného růstového faktoru vázajícího proteinu (IGFBP-1; Insulin-like Growth Factor-binding Protein) POCT testem (Actim PROM test; Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) ve vaginální tekutině.

4.2 Odběry vzorků plodové vody

Vzorky plodové vody byly odebrány pacientkám po přijetí před podáním antibiotik a kortikosteroidů. Pro odběr byla použita transabdominální amniocentéza pod kontrolou ultrazvuku. Bylo aspirováno cca 2-3 ml plodové vody. Po odběru byla plodová voda rozdělena do čtyř alikvotů. V prvním byla stanovena POCT testem hladina IL-6, druhý a třetí byl odeslán do mikrobiologické laboratoře pro PCR analýzu na přítomnost *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*

a *Chlamydia trachomatis*. Z těchto podílů byla také sekvenována 16S rRNA a provedena aerobní a anaerobní kultivace. Poslední podíl plodové vody byl centrifugován po dobu 15 minut při 2000 *g* pro odstranění buněk a debris. Supernatant byl dále rozdělen do tří alikvotů a zmražen na -80 °C pro analýzu komplementových proteinů.

Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas před odběrem plodové vody. Projekt byl schválen institucionální etickou komisí.

4.3 Diagnostika intraamniálního zánětu

4.3.1 Stanovení hladiny IL-6 v plodové vodě

Koncentrace IL-6 byla stanovena ve vzorcích plodových vod pomocí imunochemické metody na analyzátoru Cobas e602 v rámci Cobas 8000 platformy (Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko). Měření bylo provedeno na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové dle instrukcí výrobce. Měřicí rozsah je 1,5 – 50 000 pg/ml.

4.3.2 Průkaz přítomnosti *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis* a *Chlamydia trachomatis*

DNA pro průkaz těchto patogenů byla izolována z plodové vody pomocí kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Nukleová kyselina byla dále analyzována pomocí Real-time PCR metody na přístroji Rotor-Gene 6000 (Qiagen) za použití komerčního kitu AmpliSens® *C. trachomatis/Ureaplasma/M. hominis*-FRT kit (Federal State Institution of Science, Central Research Institute of Epidemiology, Moskva, Ruská federace). Jako kontrola byl použit housekeepingový gen pro beta-aktin. Analýza byla provedena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové

4.3.3 Detekce dalších bakterií v plodové vodě

Bakteriální DNA byla detekována pomocí PCR metody cílené na 16S rRNA. Byly použity následující primery: 5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3' (V3 region) a 5'-ACATTTCAACAC-GAGCTGACGA-3' (V6 region). Každá reakce obsahovala 3 µl

analyzované DNA, 500 nM primerů a DNA polymerázu (NEB, Ipswich, MA, USA) v celkovém objemu 25 μ l. Amplifikace byla provedena na cykleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Produkty byly vizualizovány na agarozovém gelu. Pozitivní nálezy byly následně sekvenovány pomocí BigDye Terminator kitu v.3.1 (Thermo Fisher Scientific). Bakterie byly identifikovány pomocí knihovny SepsisTest™ BLAST. Průkaz bakteriální DNA byl proveden na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové

4.3.4 Aerobní a anaerobní kultivace ze vzorků plodových vod

Vzorky plodových vod byly kultivovány na Columbia agaru, v selektivním mediu pro *Gardnerella vaginalis*, na MacConkeyho agaru, v selektivním mediu pro *Neisseria sp.*, na Sabouraudovu agaru a Schaedlerovu anaerobním agaru. Kultury byly pěstovány 6 dní a denně kontrolovány. Jednotlivé druhy byly identifikovány pomocí MALDI techniky na analyzátoru MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Německo). Za kultivační vyšetření byl odpovědný Ústav klinické mikrobiologie FN Hradec Králové.

4.3.5 Stanovení diagnózy mikrobiální invaze do amniální dutiny a intraamniálního zánětu, rozdělení souboru pacientek do hlavních skupin dle diagnózy

Diagnóza mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC; Microbial Invasion of the Amniotic Cavity) byla u pacientek určena pomocí pozitivního PCR nálezu *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* nebo kombinace těchto druhů. Další možností určení MIAC jsou pozitivita 16S rRNA nebo pozitivní výsledek aerobní nebo anaerobní kultivace z plodové vody.

Intraamniální zánět (IAI; Intra-Amniotic Inflammation) je definován pomocí hladiny základního prozánětlivého cytokinu IL-6 v plodové vodě. Hodnoty nad 3 000 pg/ml charakterizují probíhající IAI.

Přítomnost IAI a MIAC, případně jejich kombinace je důležitým diagnostickým znakem, který má vliv na použitou léčbu a na celkový přístup k pacientce. Z tohoto důvodu je zkoumaná skupina žen rozdělena do čtyř základních skupin dle MIAC a/nebo IAI. První skupina nemá pozitivní nález MIAC ani IAI,

tz. jedná se o těhotenství bez mikrobiální invaze i bez známek zánětu (MIAC-/IAI-). Druhá skupina má mikrobiální kolonizaci amniální dutiny ale bez známek zánětu (MIAC+/IAI-). Třetí skupina má příznaky intraamniálního zánětu bez průkazu infekčního agens (MIAC-/IAI+). Zánět v tomto případě může být vyvolán jinými faktory, jako jsou poškození a stárnutí tkání (zejména plodových obalů), a označujeme ho jako sterilní. Poslední skupina má známky mikrobiální invaze do amniální dutiny spojené s intraamniálním zánětem. Zánět je v tomto případě pravděpodobně vyvolán imunitní reakcí na přítomné patogeny (MIAC+/IAI+).

4.4 Měření vybraných parametrů komplementového systému ve vzorcích plodových vod

Pro analýzu vybraných složek komplementového systému byla zvolena ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay) technika s využitím komerčních souprav firem Abcam a Hycult Biotech. Ve všech případech bylo postupováno dle instrukcí výrobců. Vzhledem k tomu, že se z odborné literatury nepodařilo zjistit, jaké jsou přibližné hladiny měřených proteinů ve vzorcích plodových vod, byl proveden pro každou metodu ředící předpokus, kde bylo stanoveno optimální ředění vzorků. Pro analýzu vzorků bylo využito promývacího zařízení na ELISA techniky MW-12A od firmy Mindray a výsledné absorbance byly měřeny na ELISA spektrofotometru (readeru) Multiskan RC od firmy Thermo Fisher Scientific. ELISA technikou byly stanoveny hladiny C3 a C5 složek komplementového systému a jejich aktivních forem C3a a C5a. Dále byly stejnou technikou změřeny koncentrace regulačního proteinu CD59.

4.4.1 Stanovení C3 složky komplementového systému

Pro analýzu byla použita ELISA souprava *Complement C3 Human ELISA Kit* od firmy Abcam (Cambridge, UK), založená na principu kompetitivní enzymové imunoanalýzy využívající imunochemickou reakci antigenu s protilátkou.

Princip: Protilátky specifické pro komplementovou složku C3 jsou navázány na dně jamky 96-jamkové ELISA destičky. Nespecifické vazby jsou zablokovány speciálním pufrem. Do jamky je poté přidán vzorek pacienta obsahující C3 složku

komplementového systému a přesné množství biotinem značené C3 složky. Značená i neznačená (pacientská) C3 složka soutěží o vazebná místa na protilátkách. Čím je vyšší hladina C3 u pacienta, tím menší část značené C3 se může navázat na protilátku. Množství navázané biotinem značené C3 složky se po promytí jamky vizualizuje enzymovou reakcí. Nejprve je do jamky přidán streptavidin značený křenuvou peroxidázou (HRP), který specificky reaguje s biotinem. Po dalším promytí je množství enzymu (HRP) určeno po přidání enzymového substrátu z barevné reakce vznikajícího produktu. Čím intenzivnější zbarvení, tím větší podíl navázané značené komponenty C3 a tím nižší hladina C3 v patientském vzorku. Kalibrační závislost odpovídá nepřímé úměrnosti. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standardy), ze kterých je posléze vytvořena kalibrační závislost (křivka).

Pomůcky a chemikálie: Souprava obsahuje reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8, 12 stripů), kalibrační vzorky (standardy), biotinovaný antigen, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát (tetramethylbenzidin), zastavovací (stop) roztok. Skladování použitých reakčních roztoků (vyjma konjugátu a biotinovaného antigenu) je výrobcem doporučeno při 4 °C. Doporučená teplota skladování konjugátu a detekční protilátky je -20 °C.

Pracovní postup: Prvním krokem pracovního postupu je příprava reagensů a jejich následná temperace na laboratorní teplotu (18-25 °C). Je vhodné rozmyslet, kde na ELISA destičce budou umístěny kalibrační vzorky (standardy) a kde patientské vzorky. Druhým krokem je přidání vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek. Následně je přidán roztok značené C3 složky s navázaným biotinem. Destička se uzavře z důvodu prevence odpařování a inkubuje se po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. Následuje promytí celé destičky promývacím pufrem. Promytí se několikrát opakuje. Třetím krokem je přidání konjugátu streptavidinu a peroxidázy, následováno inkubací po dobu 30 minut. Po inkubaci následuje opět promývání. Ve čtvrtém závěrečném kroku je přidán chromogenní substrát, který je hydrolyzován v barevný produkt. Vzniklá modrá barva je přeměněna na žlutou po okyselení stop roztokem. Neprodleně po barevné reakci je vhodné odečítat intenzitu zbarvení (absorbanci) pomocí ELISA readeru, a to při vlnové délce 450 nm.

Výsledek: Hladiny C3 složky komplementového systému ve vyšetřovaných vzorcích jsou odečteny z kalibrační křivky. Jedná se o závislost koncentrace standardů/vzorků na absorbanci výsledného zbarvení v jamce. Minimální detekovatelné množství C3 je 0,2 µg/ml.

4.4.2 Stanovení aktivních C3a a C5a složek komplementového systému

Pro analýzu byla použity ELISA soupravy *Human C3a* a *Human C5a* od firmy Hycult (Uden, Holandsko), založené na principu sendvičové enzymové imunoanalýzy.

Princip: Fragmenty C3a a C5a jsou silně nestabilní a rychle přechází na odolnější formy C3a-desArg a C5a-desArg. Stanovení těchto metabolitů je pro zhodnocení hladin C3a a C5a optimálním řešením. Protilátky specifické pro neoepitopy C3a-desArg a C5a-desArg jsou navázány na dně jamek 96-jamkových ELISA destiček. Po přidání vzorků a kalibračních standardů jsou C3a-desArg (nebo C5a-desArg) navázány na protilátky. Následuje promytí a napipetování detekčních protilátek proti C3a-desArg (C5a-desArg) značených biotinem. Po dalším promytí je v obou metodikách přidán konjugát streptavidinu s peroxidázou. Celý komplex je poté pro C3a i C5a vizualizován substrátem (tetramethylbenzidinem, TMB), kdy dochází k barevné změně. Koncentrace C3a (C3a-desArg) nebo C5a (C5a-desArg) jsou přímo úměrné intenzitě zbarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standardy), ze kterých jsou posléze vytvořeny kalibrační závislosti (křivky).

Pomůcky a chemikálie: Soupravy obsahují reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8, 12 stripů) s navázanou protilátkou proti C3a-desArg nebo C5a-desArg, kalibrační vzorky (standardy), biotinované detekční protilátky (proti C3a-desArg nebo C5a-desArg), konjugáty streptavidin-peroxidáza, chromogenní substráty (tetramethylbenzidin), zastavovací (stop) roztoky.

Pracovní postup: Prvním krokem pracovního postupu je příprava reagensů a jejich následná temperace na laboratorní teplotu (18-25 °C). Je vhodné rozmyslet, kde na ELISA destičce budou umístěny kalibrační vzorky (standardy) a kde patientské

vzorky. Druhým krokem je přidání vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 60 minut. Pro stanovení C5a-desArg je inkubace při teplotě 37°C. Následuje promytí celé destičky promývacím pufrem. Promytí se několikrát opakuje. Ve třetím kroku je přidána detekční biotinovaná protilátka proti C3a (nebo C5a). Inkubace je provedena po dobu 60 minut. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a inkubován 60 minut. Po posledním promytí je přidán substrát (TMB) a po 30 minutách inkubace je reakce zastavena okyselením. Neprodleně po zastavení reakci je nutné odečíst intenzitu zbarvení pomocí ELISA readeru, a to při vlnové délce 450 nm.

Výsledek: Koncentrace C3a (C5a) je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství pro C3a je 31,3 pg/ml a pro C5a 0,3 ng/ml.

4.4.3 Stanovení C5 složky komplementového systému

Pro stanovení C5 složky komplementového systému byl vybrán Complement C5 Human ELISA kit od firmy Abcam (Cambridge, UK) založen na principu sendvičové ELISA imunoanalýzy.

Princip: V jamkách ELISA destičky je navázána specifická protilátka proti C5 složce lidského komplementového systému. Po přidání vzorků a kalibračních standardů je C5 zachycen protilátkami. Následuje promytí a napipetování detekční protilátky proti C5 složce značené biotinem. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidinu s peroxidázou. Streptavidin se specificky váže na biotin. Celý komplex je poté vizualizován substrátem (tetramethylbenzidinem, TMB), kdy dochází k barevné změně. Koncentrace C5 je přímo úměrná intenzitě zbarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standarty), ze kterých je posléze vytvořena kalibrační závislost (křivka).

Pomůcky a chemikálie: Souprava obsahuje reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8, 12 stripů) s navázanou protilátkou proti C5, kalibrační vzorky (standarty), biotinovanou detekční protilátkou proti C5, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát (tetramethylbenzidin), zastavovací (stop) roztok.

Pracovní postup: Prvním krokem pracovního postupu je příprava reagensů a jejich následná temperace na laboratorní teplotu (18-25 °C). Je vhodné rozmyslet, kde na ELISA destičce budou umístěny kalibrační vzorky (standarty) a kde patientské vzorky. Druhým krokem je přidání vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 120 minut. Následuje promytí celé destičky promývacím puforem. Promytí se několikrát opakuje. Ve třetím kroku je přidána detekční biotinovaná protilátka proti C5. Inkubace je provedena po dobu 60 minut. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a inkubován 30 minut. Po posledním promytí je přidán substrát (TMB) a po cca 15 minutách inkubace je reakce zastavena okyselením. Neprodleně po zastavení reakce je nutné odečíst intenzitu zbarvení pomocí ELISA readeru, a to při vlnové délce 450 nm.

Výsledek: Koncentrace C5 je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství C5 je 0,31 ng/ml.

4.4.4 Stanovení solubilní formy regulační bílkoviny komplementového systému CD59

Hladina solubilní formy CD59 byla měřena ve vzorcích plodových vod pomocí ELISA techniky. Byl vybrán komerční kit *Human sCD59* od firmy Hycult (Uden, Holandsko), založený na principu sendvičové enzymové imunoanalýzy.

Princip: Na dně jamek mikrotitrační destičky je navázána protilátka proti solubilní formě lidského proteinu sCD59. Po přidání vzorků plodových vod s neznámou koncentrací sCD59 a kalibračních standardů je sCD59 navázán na protilátky. Následuje promytí a napipetování detekční protilátky proti sCD59 značené biotinem. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidinu s peroxidázou. Celý komplex je poté vizualizován substrátem (tetramethylbenzidinem, TMB), kdy dochází k barevné změně. Koncentrace sCD59 je přímo úměrná intenzitě zbarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standarty), ze kterých je posléze vytvořena kalibrační závislost (křivka).

Pomůcky a chemikálie: Souprava obsahuje reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8, 12 stripů) s navázanou protilátkou proti sCD59, kalibrační vzorky

(standardy), biotinovanou detekční protilátku proti sCD59, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát (tetramethylbenzidin), zastavovací (stop) roztok.

Pracovní postup: Prvním krokem pracovního postupu je příprava reagensů a jejich následná temperace na laboratorní teplotu (18-25 °C). Je vhodné rozmyslet, kde na ELISA destičce budou umístěny kalibrační vzorky (standardy) a kde patientské vzorky. Druhým krokem je přidání vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Následuje promytí celé destičky promývacím puřem. Promytí se několikrát opakuje. Ve třetím kroku je přidána detekční biotinovaná protilátka proti sCD59. Následuje inkubace po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a inkubován 60 minut. Po posledním promytí je přidán substrát (TMB) a po 30 minutách inkubace je reakce zastavena okyselením. Neprodleně po zastavení reakci je nutné odečíst intenzitu zabarvení pomocí ELISA readeru, a to při vlnové délce 450 nm.

Výsledek: Koncentrace sCD59 je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství sCD59 je 0,4 ng/ml.

4.4.5 Statistické zpracování

Hladiny změřených složek komplementového systému u souboru 136 pacientek byly statisticky vyhodnoceny. Výsledky stanovení vybraných proteinů komplementového systému byly analyzovány pomocí statistického software MedCalc (MedCalc software Ltd., Ostend, Belgie). Ve všech skupinách byla provedena základní statistická analýza včetně výpočtu aritmetického průměru, mediánu, směrodatné odchylky a kvartilů (25% a 75% percentilů). Ve všech skupinách byla také ověřena normalita dat pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Následně byly pomocí testovací statistiky zjišťovány rozdíly v hodnotách naměřených parametrů komplementového systému mezi skupinami pacientek. V případě normality dat byl použit Studentův t-test a v opačném případě neparametrický Mann-Whitneyův test. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

Během sledovaného období bylo vyhodnoceno 136 pacientek jako vhodných pro naši studii dle výše popsaných kritérií. Současně byla shromážděna demografická data a klinická data popisující základní informace o pacientkách v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a/nebo s diagnostikovaným IAI či nikoliv. Poskytnutá data jsou uvedena v následující tabulce (viz Tab. 1). Věk a BMI pacientek se ve skupinách pacientek statisticky nelišili.

Tab. 1: Demografická a epidemiologická data charakterizující soubor pacientek s PPRM.

DEMOGRAFICKÁ A EPIDEMIOLOGICKÁ DATA	PŘÍTOMNOST MIAC A IAI (N = 23)	PŘÍTOMNOST IAI (BEZ MIAC) (N = 10)	PŘÍTOMNOST MIAC (BEZ IAI) (N = 21)	ABSENCE MIAC ČI IAI (N = 82)
BMI	22,6 (17-32)	23,7 (18-32)	21,7 (17-35)	22,4 (17-57)
CRP	14 (1-113)	6,6 (2-29)	3,4 (1-16)	4,3 (1-59)
GESTAČNÍ VĚK	207 (168-257)	219 (168-257)	241 (210-157)	245,5 (160-258)
VĚK PACIENTKY	30 (21-38)	30 (25-38)	29 (20-39)	30,6 (18-43)
POČET LEUKOCYTŮ	15,6 (9-22)	13,3 (9-23)	10,8 (6-22)	12,2 (8-24)
VÁHA PLODU	1065 (650-3540)	1715 (560-2860)	2350 (1760-3010)	2390 (440-3480)

Body mass index (BMI) před těhotenstvím [kg/m², median (rozpětí)]; Věk pacientky [roky, median (rozpětí)]; hladina C-reaktivního proteinu (CRP) při příjmu [mg/l, median (rozpětí)]; gestační věk pacientky při odběru [dny, median (rozpětí)]; počet leukocytů při příjmu [$\times 10^9/l$, median (rozpětí)]; váha plodu [gramy, median (rozpětí)]

5.1 Hladina komplementové C3 složky v plodové vodě pacientek s PPRM

Koncentrace komplementových složek (včetně C3) je znázorněna v následující tabulce (viz Tab. 2). Pacientky jsou zde rozděleny do čtyř skupin dle klinické anamnézy a naměřené hladiny vybraných molekul jsou statisticky vyhodnoceny. Pro představu je v tabulce uveden median a rozpětí od minimální hodnoty k hodnotě maximální.

Tab. 2: Statisticky vyhodnocená data parametrů pro danou skupinu pacientek.

MĚŘENÝ PARAMETR	PŘÍTOMNOST MIAC A IAI (N = 23)	PŘÍTOMNOST IAI (BEZ MIAC) (N = 10)	PŘÍTOMNOST MIAC (BEZ IAI) (N = 21)	ABSENCE MIAC ČI IAI (N = 82)
C3	22,3 (8-509)	22,9 (7-88)	10,1 (1-44)	12,7 (3-155)
C3a	203 (15-278)	250,5 (182-290)	182 (87-273)	205,5 (1-289)
C5	514,7 (248- 22 579)	449,4 (307-1609)	483,7 (185-2094)	396,5 (93-13 400)
C5a	0,71 (0,01-6,91)	0,70 (0,28-2,39)	0,97 (0,01-2,45)	0,9 (0,01-27,60)
CD59	136,9 (71-203)	130,6 (98-162)	114,3 (76-176)	122 (39-284)

*Komplementová složka C3 [$\mu\text{g/ml}$, median (rozpětí)]; Komplementová složka C3a [ng/ml , median (rozpětí)];
Komplementová složka C5 [ng/ml , median (rozpětí)]; Komplementová složka C5a [ng/ml , median (rozpětí)];
CD59 [ng/ml , median (rozpětí)]*

5.1.1 Porovnání hladin komplementové C3 složky u pacientek s a bez IAI

Podstatou diagnostiky zánětu v amniální dutině je potvrzená souvislost mezi vzniklým zánětlivým procesem a vyšším rizikem PPRM, resp. PP. I v naší studii jsme nejprve porovnávali hladiny vybraných parametrů v širším měřítku dvou skupin pacientek – s IAI a bez zánětu. Z výsledků vyplývá statistická odlišnost u molekuly C3, která byla zvýšená u pacientek se zánětem (pacientky s IAI: median 22,3 $\mu\text{g/ml}$, rozpětí 8-509; pacientky bez zánětu: median 12,5 $\mu\text{g/ml}$; rozpětí 1-155; $p = 0,0006$).

5.1.2 Porovnání hladin komplementové C3 složky u pacientek s a bez MIAC

Zároveň byla porovnána koncentrace parametrů u pacientek v závislosti pouze na přítomnosti mikrobiální kolonizace či bez ní. V posledním desetiletí byla potvrzena přítomnost fyziologické mikrobiální kolonizace intraamniální dutiny i u zdravých pokročilých těhotenstvích. Vzhledem k těmto poznatkům lze usuzovat,

že ne každá mikrobiální kolonizace musí spouštět zánětlivé reakce. Z těchto důvodů jsme se také rozhodli stanovit hladiny parametrů u skupiny pacientek s MIAC v porovnání s pacientkami ze skupiny bez diagnostikované MIAC. Výsledkem měření koncentrací C3 nebyla prokázána statistická odlišnost mezi pacientkami s mikrobiální kolonizací a bez ní.

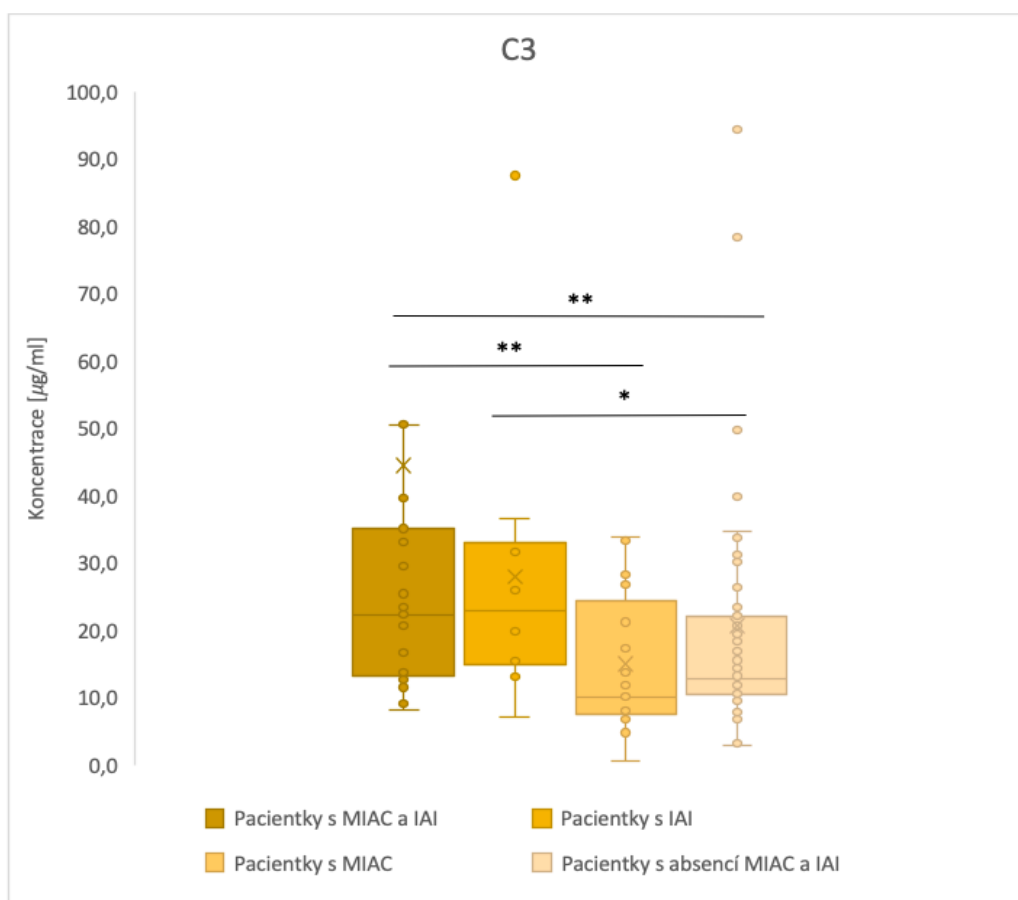
5.1.3 Porovnání hladin komplementové složky C3 u pacientek s IAI a/nebo MIAC

Jedním z dalších kroků této analýzy bylo porovnání jednotlivých diagnostických skupin pacientek mezi sebou a vyhodnocení využitelnosti vybraných parametrů.

Koncentrace C3 komplementové složky v plodové vodě u pacientek s MIAC a zároveň probíhajícím IAI byla vyšší než u pacientek pouze s přítomností mikrobiální kolonizace (pacientky s MIAC a IAI: median 22,3 $\mu\text{g/ml}$, rozpětí 8-509; s kolonizací: median 10,1 $\mu\text{g/ml}$, rozpětí 1-44; $p = 0,0079$). Zároveň byla koncentrace C3 u pacientek s MIAC a IAI taktéž vyšší než u souboru pacientek s absencí MIAC či IAI (pacientky s absencí MIAC či IAI: median 12,7 $\mu\text{g/ml}$, rozptyl 3-155; $p = 0,006$). Statistický rozdíl mezi skupinou s MIAC a IAI a pacientkami pouze s IAI nebyl nalezen (viz Graf 1).

Koncentrace C3 komplementové složky v plodové vodě u pacientek s IAI (bez MIAC) byla vyšší než u skupiny pacientek s absencí MIAC či IAI (pacientky s MIAC a IAI: median 22,3 $\mu\text{g/ml}$, rozptyl 8-509; pacientky s absencí MIAC či IAI: median 12,7 $\mu\text{g/ml}$, rozpětí 3-155; $p = 0,0434$; Graf 1).

Graf 1: Koncentrace C3 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.



Horní a spodní úsečky znázorňují minimální a maximální hodnoty; úsečka ve středu znázorňuje median; křížek znázorňuje aritmetický průměr; horní a spodní hranice boxu znázorňují 75% a 25% percentily.

5.2 Hladina komplementové C3a složky v plodové vodě pacientek s PPRM

Statisticky vyhodnocené koncentrace hladin C3a ve skupinách pacientek jsou znázorněny v Tab. 2.

5.2.1 Porovnání hladin komplementové C3a složky u pacientek s a bez IAI

Koncentrace C3a se mezi pacientkami s IAI a bez IAI statisticky neodlišovala.

5.2.2 Porovnání hladin komplementové C3a složky u pacientek s a bez MIAC

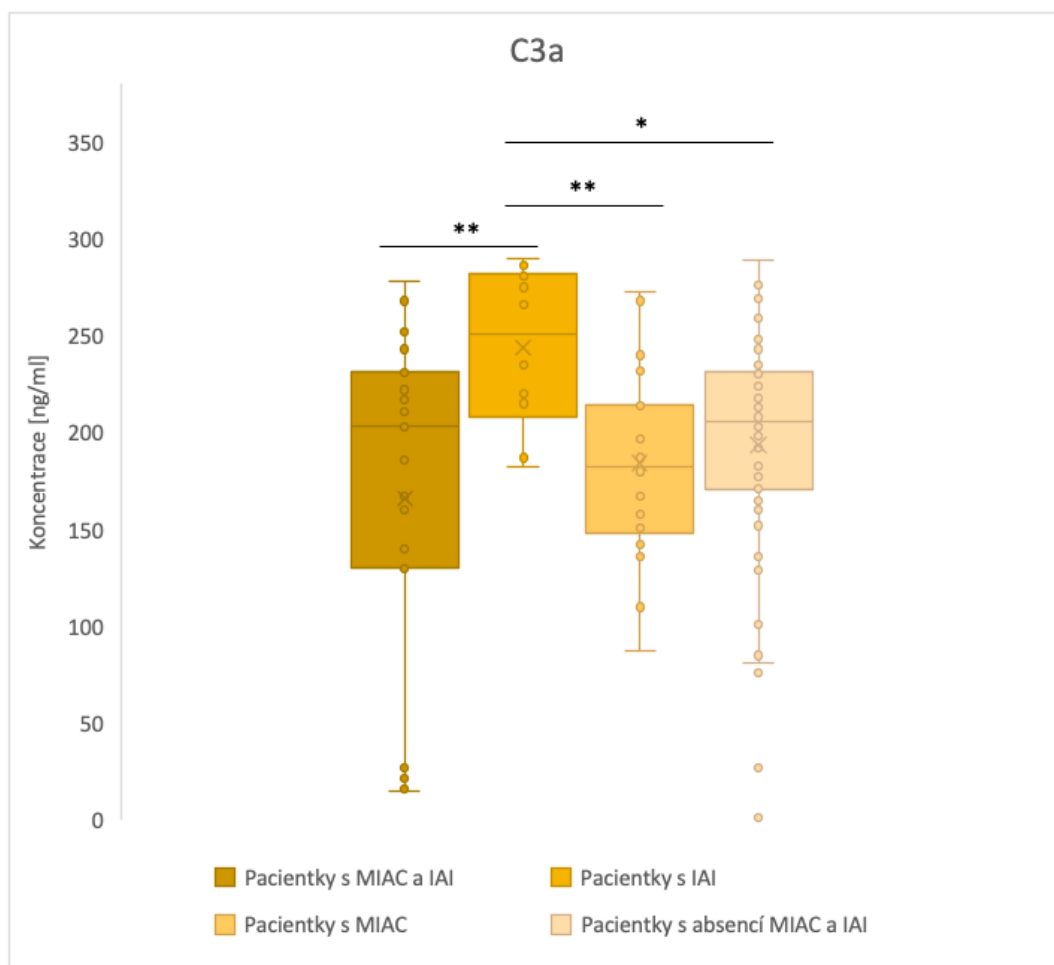
Hladiny aktivované složky C3a u pacientek s mikrobiální kolonizací nevykazovaly statisticky významnou odlišnost od koncentrací C3a pacientek bez kolonizace mikroby.

5.2.3 Porovnání hladin komplementové složky C3a u pacientek s IAI a/nebo MIAC

Množství aktivované komplementové složky C3a u pacientek s MIAC a IAI bylo detekováno vyšší než u skupiny pacientek pouze s přítomností IAI (pacientky s MIAC a IAI: median 203 ng/ml, rozpětí 15-278; pacientky s IAI: median 250,5 ng/ml, rozpětí 182-290; $p = 0,0097$; Graf 2).

Koncentrace aktivované složky komplementu C3a v souboru pacientek s IAI byla vyhodnocena jako vyšší než koncentrace C3a u pacientek s MIAC a u žen s absencí MIAC či IAI (pacientky s IAI: median 250,5 ng/ml, rozpětí 182-290; pacientky s MIAC: median 182 ng/ml, rozpětí 87-273; $p = 0,021$; pacientky s absencí MIAC či IAI: median 205,5 ng/ml, rozpětí 1-289; $p = 0,0062$; Graf 2).

Graf 2: Koncentrace C3a v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.



Horní a spodní úsečky znázorňují minimální a maximální hodnoty; úsečka ve středu znázorňuje median; křížek znázorňuje aritmetický průměr; horní a spodní hranice boxu znázorňují 75% a 25% percentily.

5.3 Koncentrace komplementové C5 složky v plodové vodě pacientek s PPRM

5.3.1 Porovnání hladin komplementové C5 složky u pacientek s a bez IAI

Statistická odlišnost u pacientek s IAI a bez IAI nebyla u parametru C5 prokázána.

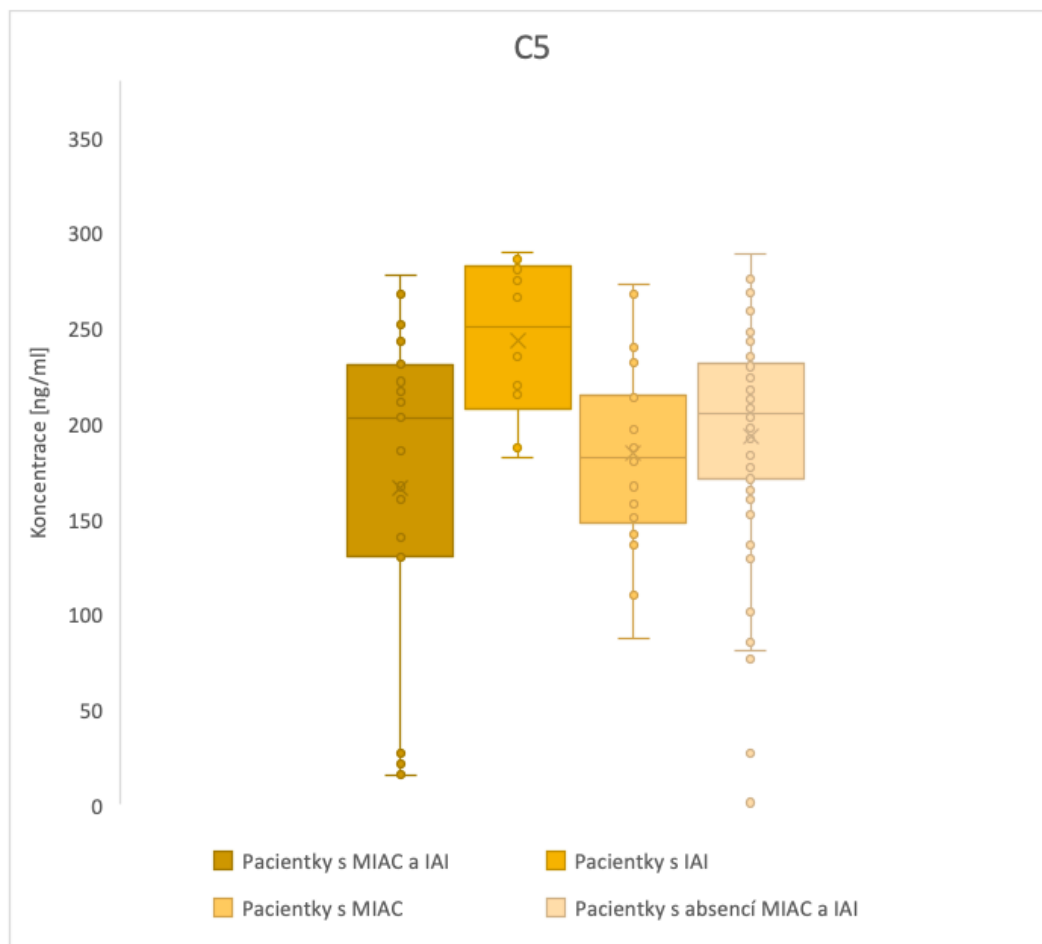
5.3.2 Porovnání hladin komplementové C5 složky u pacientek s a bez MIAC

C5 komplementová složka statisticky nezměnila svou koncentraci při porovnání pacientek s a bez mikrobiální kolonizace.

5.3.3 Porovnání hladin komplementové složky C5 u patientek s IAI a/nebo MIAC

Hladiny koncentrací komplementových složek C5, se v průřezu souborů našich patientek, statisticky nelišily. Základní statistické parametry jsou uvedeny v Tab. 2 a Graf 3.

Graf 3: Koncentrace C5 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.



Horní a spodní úsečky znázorňují minimální a maximální hodnoty; úsečka ve středu znázorňuje median; křížek znázorňuje aritmetický průměr; horní a spodní hranice boxu znázorňují 75% a 25% percentily.

5.4 Koncentrace komplementové C5a složky v plodové vodě patientek s PPRM

5.4.1 Porovnání hladin komplementové C5a složky u patientek s a bez IAI

Koncentrace C5a se mezi patientkami s IAI a bez IAI statisticky neodlišovala.

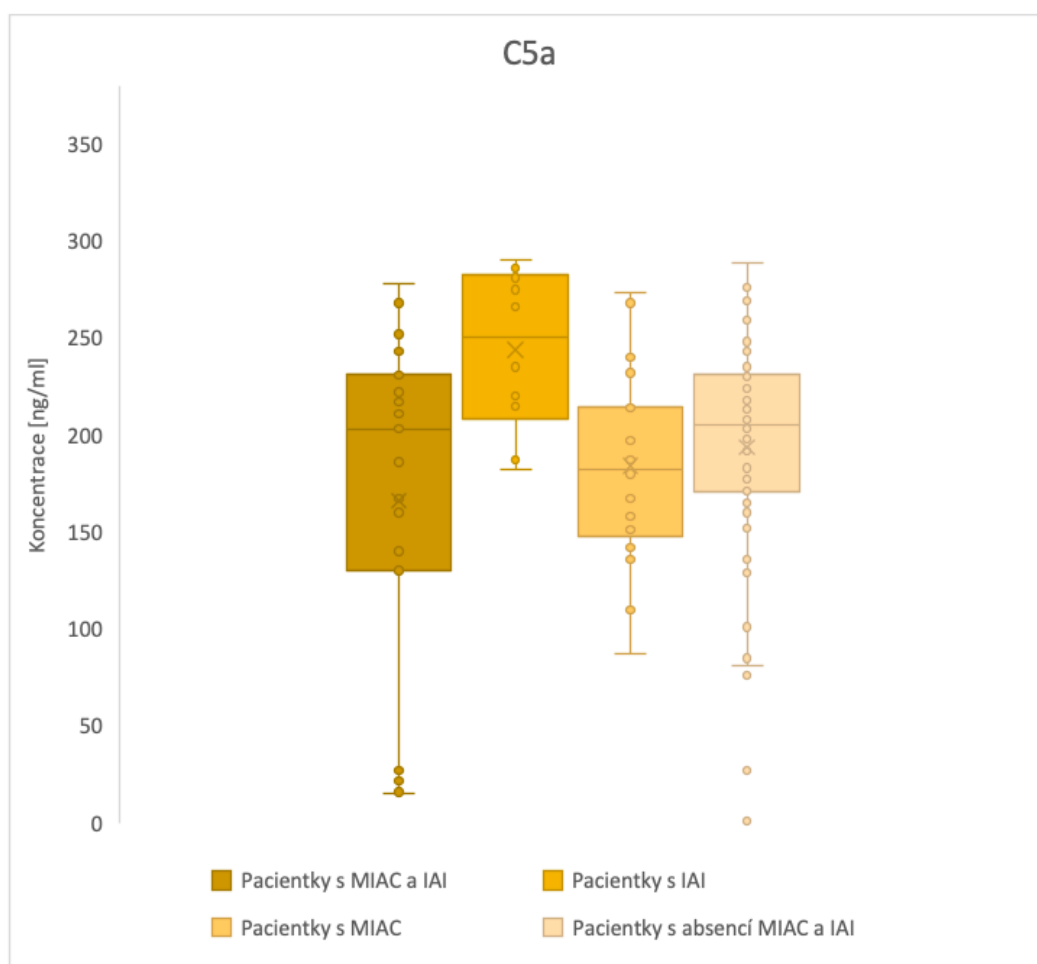
5.4.2 Porovnání hladin komplementové C5a složky u pacientek s a bez MIAC

Statistická odlišnost mezi hladinami C5a u pacientek s kolonizací a bez kolonizace nebyla prokázána.

5.4.3 Porovnání hladin komplementové složky C5a u pacientek s IAI a/nebo MIAC

Koncentrace aktivované komplementové složky C5a se zásadně nezměnila v průběhu měření konkrétních souborů pacientek. Výsledky naměřených koncentrací C5a jsou uvedeny v Tab. 2 a Graf 4.

Graf 4: Koncentrace C5a v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.



Horní a spodní úsečky znázorňují minimální a maximální hodnoty; úsečka ve středu znázorňuje median; křížek znázorňuje aritmetický průměr; horní a spodní hranice boxu znázorňují 75% a 25% percentily.

5.5 Hladina CD59 v plodové vodě pacientek s PPRM

Přehled koncentrací CD59 ve čtyřech souborech pacientek je znázorněn v Tab. 2.

5.5.1 Porovnání hladin CD59 u pacientek s a bez IAI

CD59 prokázala vyšší hladiny u pacientek s IAI než ve skupině pacientek bez zánětu (pacientky s IAI: median 136,4 µg/ml, rozpětí 71-203; bez IAI: median 120,8 µg/ml, rozpětí 39-284; $p = 0,0118$).

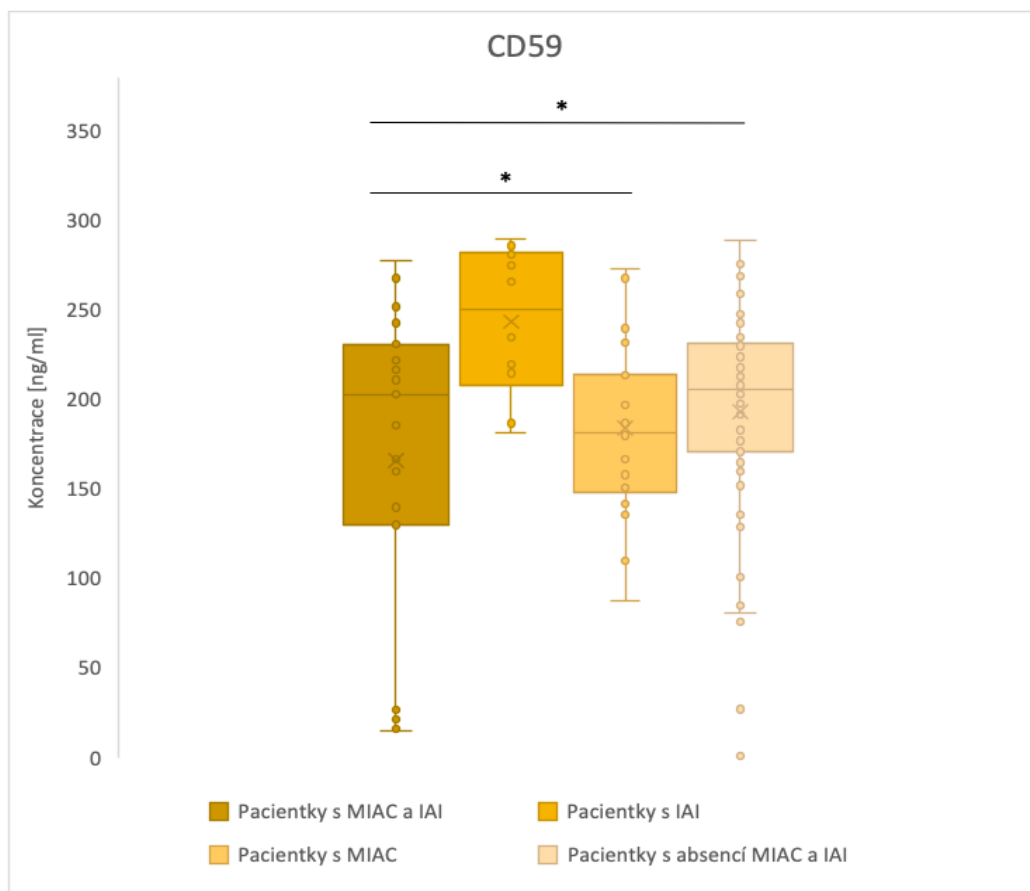
5.5.2 Porovnání hladin CD59 u pacientek s a bez MIAC

Zároveň se CD59 významně nesnížilo ani nezvýšilo u pacientek s MIAC v porovnání s pacientkami bez MIAC.

5.5.3 Porovnání hladin CD59 u pacientek s IAI a/nebo MIAC

Koncentrace CD59 byla vyhodnocena jako vyšší u skupiny pacientek s MIAC a IAI než u žen pouze s MIAC (pacientky s MIAC a IAI: median 136,9 ng/ml, rozpětí 71-203; pacientky s MIAC: median 114,3 ng/ml, rozpětí 76-176; $p = 0,0157$; Graf 5). Současně byla vyhodnocena koncentrace CD59 vyšší u této skupiny pacientek než u pacientek s absencí MIAC či IAI (pacientky s absencí MIAC/IAI: median 122 ng/ml, rozpětí 39-284; $p = 0,0361$; Graf 5)

Graf 5: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.



Horní a spodní úsečky znázorňují minimální a maximální hodnoty; úsečka ve středu znázorňuje median; křížek znázorňuje aritmetický průměr; horní a spodní hranice boxu znázorňují 75% a 25% percentily.

6. DISKUSE

Cílem této práce bylo zhodnocení koncentrace vybraných parametrů, resp. C3, C3a, C5, C5a a CD59 v plodové vodě pacientek s PPRM a zároveň zhodnocení podstatných změn hladin mezi těmito parametry v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a/nebo IAI. Dalším cílem bylo zhodnotit, zda by daný parametr mohl sloužit jako vhodný biomarker pro včasnou diagnostiku předčasného porodu komplikovaného PPRM.

Hladiny měřených proteinů v souboru pacientek odrážely klinický stav. Z výsledků námi provedených měření vyplývá, že pacientky s IAI (sterilní zánět i zánět s mikrobiální kolonizací) mají vyšší hladiny C3 než pacientky pouze s MIAC či s celkovou absencí mikrobiální kolonizace a zánětu. Následně bylo zjištěno, že hodnoty C3a, tedy aktivované formy C3, byly zvýšeny u souboru pacientek s IAI oproti ženám pouze s mikrobiální kolonizací. Nejvyšších hodnot dosahovaly pacientky pouze s diagnostikovaným sterilním intraamniálním zánětem, jednalo se tedy o vyšší koncentrace než u pacientek s kombinací MIAC a IAI. Dalším výsledkem měření byla zvýšená koncentrace CD59 u žen s IAI než u pacientek pouze s MIAC či bez kolonizace a zánětu.

Výsledky poukazují na zapojení C3 a C3a do intraamniálního zánětu s mikrobiální kolonizací i do sterilního IAI u pacientek s PPRM. Zároveň i koncentrace CD59, jako hlavní regulační složky komplementové aktivity se pravděpodobně zvýšila v důsledku vyšší aktivity komplementového systému korespondující s probíhajícím zánětem jako ochrana vlastních buněk před cytotoxickým působením složek komplementu. Zhodnocení množství C5 a C5a v plodové vodě nepotvrdilo statisticky významné rozdíly v koncentraci tohoto parametru u našich souborů pacientek, tedy v závislosti na přítomnosti MIAC a IAI, souběžně obou, či naopak nepřítomností zánětu i kolonizace. Skupina pacientek se sterilním zánětem měla hladiny C5 a C5a oproti ostatním skupinám celkově zvýšené, nicméně ne statisticky významně, což může mít souvislost s malou velikostí studijní skupiny (N = 10).

Předčasný porod je patologický stav ohrožující matku narozené dítě. Jedná se pravděpodobně o komplexní proces, kde je významně zapojen imunitní systém.

Ke klíčovým prvkům tohoto procesu patří kontraktilita myometria, cervikální zrání či ruptura membrán. [91] Dle Menonovy studie je PPROM onemocnění zárodečných obalů, u kterého dochází k oxidačnímu stresu s následným akcelerovaným stárnutím tkání obalů. Tento proces vede ke vzniku sterilního zánětu, oslabení membrány a následné ruptuře. [92] Výsledek těhotenství při proběhlé PPROM je závislý na gestačním věku, stavu plodu a přítomnosti infekce. U nízkého gestačního stáří je preferován tzv. pasivní management, kdy se porodník snaží oddálit porod a vhodnými zásahy stimulovat zrání plodu. I tak přibližně 50 % pacientek s touto diagnózou porodí zhruba do týdne po PPROM. [1]

V průběhu času bylo shromážděno velké množství poznatků o tomto patofyziologickém procesu. Bylo prokázáno spojení prostaglandinů a enzymů degradujících matrici s oslabením membrán vedoucím k jejich prasknutí. [93] Z dalších studií je dnes již patrné, že PP je asociován i s pozitivní mikrobiální kulturou v plodové vodě – až u 38 % pacientek s PPROM. [94] Tento poznatek koresponduje i s naší studií, ve které bylo až u 32 % (44 pacientek ze 136) žen diagnostikována mikrobiální kolonizace. Mikrobiální kolonizace je vyšší u pacientek s PPROM než u žen s předčasným porodem se zachovaným vakem blan. Nicméně i v situaci, kdy jsou membrány neporušeny, dochází k mikrobiální kolonizaci a to asi u 12,8 % žen. [94] Zásadně důležitá je metoda mikrobiální identifikace – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR; Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction) odhalí větší množství mikroorganismů v amniotické tekutině než pouhá kultivace. Dle studie bylo více než 50 % pacientů s negativní kulturou ve skutečnosti osídleno. [95] Mimo jiné i CRP či hladina leukocytů v krvi byla v naší studii častěji zvýšená u pacientek s IAI, ačkoliv ani CRP ani počet leukocytů nejsou dostatečně specifickým ukazatelem IAI. [96]

Vzhledem k úzké vazbě k fetu se nabízí jako nejvhodnější zdroj biomarkerů amniotická tekutina. I přes výhody této tekutiny se s velkou pravděpodobností nestane její odběr rutinní metodou pro screening PP, zejména z důvodu rizika vyvolání vlastního předčasného porodu, poškození plodu nebo i způsobení možné infekce při odběru. I přesto se amniotická tekutina pro hledání nových biomarkerů velmi často využívá. U pacientek bez přítomnosti intrauterinní infekce byla analyzována v amniotické tekutině celá řada biomarkerů zahrnující cytokiny IL-6,

IL-8, IL-16 a mnoho dalších mediátorů zánětu spojených s PP nebo PPROM. [56, 97, 98]

Neinvazivní metoda, která by umožnila snadné a spolehlivé určení přítomnosti IAI u pacientů s PPROM by měla značné přednosti ve snižování potřeby aminocentézy při hodnocení zánětlivého stavu v plodové dutině. Příkladem je studie ověřující nové rychlé „bedside“ testy vhodné k diagnostice a monitoringu intraamniálního zánětu u pacientek s PPROM. Amniotická tekutina byla v tomto případě odebrána neinvazivně, transcervikálně, pomocí nového přístroje – transcervikálního sběrače amniotické tekutiny. Jeho principem je získávání tekutiny z endocervikálního kanálu. Studie byla zaměřena na rychlý test detekující koncentrace IL-8 obsaženého v neinvazivně odebrané amniotické tekutině. Výsledky byly porovnány s počtem bílých krvinek stanoveným v plodové vodě získané aminocentézou. Závěrem této studie bylo potvrzení schopnosti tohoto diagnostického testu specificky a dostatečně citlivě zhodnotit stav IAI. Vysoká negativní prediktivní hodnota testu by usnadnila identifikaci rizikových pacientek bez nutnosti aminocentézy a umožnila včasnou indukci porodu. Současně autoři navrhují možnost využití této metody u pacientek s PPROM, kde komentují zvyšující se IAI s dobou latence. [99, 100]

Při hledání nových biomarkerů byla neinvazivně vyšetřována koncentrace progesteronu ve slinách u žen s alespoň jedním rizikovým faktorem předčasného porodu. Byly detekovány snížené hladiny progesteronu v období mezi 24. a 34. týdnem těhotenství u žen s hrozícím brzkým PP. Autoři těchto výzkumů proto navrhují měřit hladiny progesteronu u rizikových skupin žen s následnou možnou terapií pomocí substituce progesteronu. [101, 102]

Mateřská krev, resp. plazma nebo sérum, jakožto velmi snadno přístupná tekutina s minimální invazí při odběru, se jeví jako vhodný nástroj pro hledání specifických biomarkerů. Nicméně zásadním nedostatkem tohoto přístupu je skutečnost, že organismy matky a plodu jsou sice mnohočetně provázány, ale představují samostatné celky. Je žádoucí, aby se choroby (infekční i jiné) nepřenášely na plod a opačně. Mateřská krev tedy nemusí spolehlivě odrážet situaci (infekce, zánět) plodu. Tato skutečnost vede často k neúspěchu studií využívajících tento zdroj biomarkerů. Příkladem výzkumu biomarkerů v periferní krvi je studie,

kteřá měřila 27 proteinů u žen s hrozícím předčasným porodem. Mezi potencionální biomarkery patřily IL-10, granulocyt-makrofág-kolonie stimulující faktor (GM-CSF, CSF2), solubilní IL-6 receptor alpha (sIL6R), tumor nekrotizující faktor beta (TNF β), velikost děložního čípku a další. Nicméně samotné měření cervixu prezentuje výrazně lepší předpověď PP než stanovení biochemických markerů v mateřské krvi. [56, 103]

Cervikovaginální tekutina (CVF) je směs sekretů z vaginy, endocervixu, decidui a amniochorinu sloužící jako důležitý diagnostický materiál při monitorování zdraví matky a plodu. Na rozdíl od amniotické tekutiny je CVF jednoduše přístupná s minimální invazivitou odběru a vysokou bezpečností. Existují dva běžně používané biomarkery pro klinické testy v předpovědi PP. Jedním je fetální fibronektin (fFN) a fosforylovaný insulinu podobný růstový faktor vázající protein 1 (phIGFBP1; Phosphorylated Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1). [56] Fetální fibronektin je glykoprotein produkovaný amniocyty a trofoblastem, který zajišťuje spojení mezi plodem a dělohou. [58] Není detekovatelný mimo období mezi 16. a 20. týdnem těhotenství. Hladiny fFN by mohly odrážet narušení choriodeciduálního prostoru a s předstihem identifikovat spontánní PP. [104] Dle studií se podařilo předpovědět PP s týdenním až dvoutýdenním předstihem u žen se symptomy (78-89% citlivost a 86% specifická) i bez symptomů (68-76% citlivost a 88-89% specifická). [105] V klinické praxi se stanovení fFN využívá zejména jako negativní prediktivní hodnota, která může rozhodnout o pohotovostním převozu pacientky do specializovaného zdravotnického zařízení. [56, 106] PhIGFBP1 je vylučován deciduálními buňkami a proniká do cervikální tekutiny v momentě, kdy se fetální membrána odtrhne od decidui. Klinické studie poukazují na to, že je phIGFBP1, stejně jako fFN, vhodný pro svou negativní predikci PP (92% specifická), nicméně nevyhovující svou citlivostí. Zároveň ho ale lze využít jako pozitivní prediktivní parametr u asymptomatických žen. [107, 108]

Komplementový systém hraje důležitou roli v časném i předčasném porodu a obecně v průběhu celého těhotenství. Někteří autoři se shodují na možnosti využití komplementu pro predikci pozdějšího spontánního předčasného porodu, kdy dochází k jeho nadměrné aktivaci již v počátečních fázích těhotenství

(<20 týdnů gestace). [4, 52] Původ aktivace komplementu se přikládá klinickému zánětu, nicméně může tomu být i v důsledku nekrózy tkání placenty, tkáňové ischemie či abnormální placentace. Další studie podporují hypotézu vyvolání PP vlivem interakce C5a s jeho receptorem prostřednictvím nukleárního faktoru κ B (NF- κ B). Zároveň autoři upozorňují na zvyšující se riziko PP při dysregulaci komplementu, konkrétně v případě C3a a C5a. [109] Jiná studie zmiňuje využití parametrů IL-6, C3a a C5a v mateřské plazmě žen s předčasnou dilatací děložního čípku nebo s krátkým děložním hrdlem v případě PP. Dále doporučují k předvídání PP kombinovat tyto biomarkery s klinickou anamnézou. [110] Kimova studie prokázala zvýšené hladiny C3a (nikoliv C5a) v amniotické tekutině u pacientek s cervikální nedostatečností či krátkým cervixem. Tyto pacientky také trpěly vyšším rizikem IAI a PP, což může souviset také s aktivací komplementového systému v amniotické tekutině. [111]

Z výsledků naší studie se C3 a C3a jeví jako vhodné biomarkery pro stanovení sterilního i nesterilního IAI u pacientek s PPRM v plodové vodě. V momentě, kdy bychom detekovali IAI pomocí zvýšené koncentrace C3, lze za určitých podmínek předpokládat i zvýšené hodnoty C3a a naopak. Současně by se dalo pomýšlet i na využití CD59, i když vykazovalo nižší specifitu než C3 a C3a.

7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovení koncentrace vybraných parametrů komplementového systému v plodové vodě u pacientek s PPROM; zhodnocení dynamiky koncentrace daných molekul v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI; zhodnocení statistických výsledků zkoumaných proteinů a jejich možné využitelnosti v klinické praxi jako biomarkerů předčasného porodu komplikovaného PPROM.

S využitím enzymové imunoanalýzy jsme stanovili koncentraci vybraných molekul u 136 těhotných pacientek s komplikací PPROM. Soubor pacientek jsme rozdělili do 4 skupin dle přítomnosti zánětu a/nebo průkazu infekčního agens v plodové vodě.

Pro testování bylo vybráno 5 parametrů přirozené imunity a zánětu – C3, C3a, C5, C5a a CD59. Koncentrace proteinů byly statisticky porovnány ve všech skupinách.

Koncentrace C3 byla nejvyšší ve skupině pacientek se zánětem a MIAC. Zároveň byla vyhodnocena zvýšená koncentrace u pacientek se sterilním zánětem. Nejvyšší koncentrace C3a byly nalezeny u pacientek se sterilním zánětem. Komplementové složky C3 a C3a se jeví jako vhodné biomarkery IAI a MIAC, popřípadě sterilního IAI. Naměřené koncentrace CD59 byly nalezeny zvýšené u pacientek s IAI a MIAC. CD59 by taktéž mohl sloužit jako biomarker k detekci probíhajícího IAI s mikrobiální invazí.

Koncentrace C5 a C5a se neprokázaly jako statisticky významné.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

aHUS	Atypický hemolyticko-uremický syndrom
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> ; Antigen prezentující buňky
APLA	Antifosfolipidové protilátky
APS	Antifosfolipidový syndrom
BMI	Body Mass Index
C3	Komplementová složka 3
C3a	Aktivovaná komplementová složka 3
C5	Komplementová složka 5
C5a	Aktivovaná komplementová složka 5
CCP	<i>Complement Control Protein</i> ; Protein regulující komplement
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ; Diferenční skupina
CRP	C-reaktivní protein
CSF2	Granulocyt-makrofág-kolonie stimulující faktor
CVF	<i>Cervicovaginal Fluid</i> ; Cervikovaginální tekutina
DAF	<i>Decay-accelerating Factor</i> ; Rozpad urychlující faktor
DC	<i>Dendritic Cell</i> ; Dendritická buňka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FasL	Fas ligand
fFN	Fibronektin

FIRS	<i>Fetal Inflammatory Response Syndrome;</i> Syndrom fetální zánětlivé odpovědi
GPI	Glykosylfosfatidylinositolová kotva
HLA	<i>Human Leucocyte antigens;</i> Lidské leukocytární antigeny
IAI	<i>Intraamniol inflammation;</i> Intraamniální zánět
IGFBP-1	<i>Insulin-like Growth Factor-binding Protein;</i> Inzulinu podobný růstový faktor vázající protein
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate Lymphoid Cells;</i> Přirozené lymfoidní buňky
IS	Imunitní systém
iTreg	Indukované T regulační lymfocyty
LTA	Solubilní tumor nekrotizující faktor beta
MAC	<i>Membrane Attack Complex;</i> Membránu atakující komplex
MASPs	<i>MBL-associated Serine Proteases</i>
MBL	<i>Mannan-binding lectin;</i> Lektin vázající manosu
MCP	<i>Membrane Cofactor Protein;</i> Membránový proteinový kofaktor
MIAC	<i>Microbial Invasion of the Amniotic Cavity;</i> Mikrobiální invaze do amniální dutiny
MIP-1β	Makrofágový zánětlivý protein 1 β

NF-κB	Nukleární faktor κ B
NK	<i>Natural Killers;</i> Přirození zabíječi
phIGFBP1	<i>Phosphorylated Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1;</i> Fosforylovaný insulinu podobný růstový faktor vázající protein-1
PNH	Paroxysmální noční hemoglobinurie
POCT	<i>Point of Care Testing;</i> Testování v místě péče o pacienta
PP	Předčasný porod
PPROM	<i>Preterm Prelabour Rupture of Membranes;</i> Předčasný odtok plodové vody s rupturou plodových obalů
sIL6R	Solubilní interleukin-6 receptor alpha
SLE	Systémový lupus erythematoses
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta;</i> Transformující růstový faktor beta
Th	<i>Helper T Cell;</i> T pomocný lymfocyt
TLR	Toll-like receptor
Treg	Regulační T lymfocyty
uNK	Uterinní NK buňky
qPCR	<i>Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction;</i> Kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase

9. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Demografická a epidemiologická data charakterizující soubor pacientek s PPRM..... 40

Tab. 2: Statisticky vyhodnocená data parametrů pro danou skupinu pacientek..... 41

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Koncentrace C3 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.	43
Graf 2: Koncentrace C3a v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.	45
Graf 3: Koncentrace C5 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.	46
Graf 4: Koncentrace C5a v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.	47
Graf 5: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC a/nebo IAI.	49

11. POUŽITÁ LEITERATURA

1. Mercer, B.M. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol.* 2003, vol. 101, no. 1, s. 178-93.
2. Romero, R. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015, vol. 28, no. 12, s. 1394-409.
3. Dunkelberger, J.R. - Song, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010, vol. 20, no. 1, s. 34-50.
4. Dunn, A.B. Complement Activation During Early Pregnancy and Clinical Predictors of Preterm Birth in African American Women. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2019, vol. 33, no.4, s. 15-26.
5. Morad, H.O. Time-course analysis of C3a and C5a quantifies the coupling between the upper and terminal Complement pathways in vitro. *J Immunol Methods.* 2015, vol. 427, s. 13-8.
6. Krejsek, J. *Imunologie člověka.* 1. vydání. Garamon s.r.o, 2016. ISBN 80-86472-74-4.
7. Racicot, K. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American journal of reproductive immunology.* 2014, vol. 72, no. 2, s. 107-116.
8. Mor, G. - Cardenas. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology.* 2010, vol. 63, no. 6, s. 425-433.
9. Ng, S.C. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2002, vol. 48, no.2, s. 77-86.

10. Kwak-Kim, J.Y.H. - Gilman-Sachs, A. - Kim, C.E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy*. 2005, vol. 88, s. 64-79.
11. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002, vol. 2, no. 9, s. 656-63.
12. Murphy, S.P. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *The Journal of Immunology*. 2005, vol. 175, no. 6, s. 4084-4090.
13. Chaouat, G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*. 2007, vol. 29, no. 2, s. 95-113.
14. Mor, G. - Koga, K. Macrophages and pregnancy. *Reprod Sci*. 2008, vol. 15, no. 5, s. 435-6.
15. Romero, R. The preterm parturition syndrome. *Bjog*. 2006, vol. 113, no. 3, s. 17-42.
16. Romero, R. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006, vol. 11, no. 5, s. 317-26.
17. Mor, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci*. 2008, vol. 1127, s. 121-8.
18. Triggianese, P. Innate Immune System at the Maternal-Fetal Interface: Mechanisms of Disease and Targets of Therapy in Pregnancy Syndromes. *Am J Reprod Immunol*. 2016, vol. 76, no.4, s. 245-57.
19. Girardi, G. Complement activation, a threat to pregnancy. *Semin Immunopathol*. 2018, vol. 40, no. 1, s. 103-111.

20. Teirilä, L. Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. *Seminars in Immunology*. 2019, vol. 45.
21. Agostinis, C. - Tedesco, F. - Bulla, R. Alternative functions of the complement protein C1q at embryo implantation site. *J Reprod Immunol*. 2017, vol. 119, s. 74-80.
22. Bulla, R. Complement production by trophoblast cells at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*. 2009, vol. 82, no. 2, s. 119-25.
23. Bulla, R. Decidual endothelial cells express surface-bound C1q as a molecular bridge between endovascular trophoblast and decidual endothelium. *Mol Immunol*. 2008, vol. 45, no. 9, s. 2629-40.
24. Regal, J.F. - Gilbert, J.S. - Burwick, R.M. The complement system and adverse pregnancy outcomes. *Mol Immunol*. 2015, vol. 67, no. 1, s. 56-70.
25. Meri, S. - Jarva, H. *Complement Regulatory Proteins and Related Diseases*. 2013.
26. Noris, M. - Remuzzi, R. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*. 2013, vol. 33, no. 6, s. 479-92.
27. Lokki, A.I. Complement activation and regulation in preeclamptic placenta. *Front Immunol*. 2014, vol. 5, s. 312.
28. Buurma, A. Preeclampsia is characterized by placental complement dysregulation. *Hypertension*. 2012, vol. 60, no. 5, s. 1332-7.
29. Kouser, L. Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway "see-saw". *Front Immunol*. 2013, vol. 4, s. 93.
30. Clark, G.F. - Schust, D.J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. *Front Immunol*. 2013, vol. 4, s. 26.

31. Banadakoppa, M. Spontaneous abortion is associated with elevated systemic C5a and reduced mRNA of complement inhibitory proteins in placenta. *Clin Exp Immunol.* 2014, vol. 177, no. 3, s. 743-9.
32. Lynch, A.M. Systematic activation of the complement system in patients with advanced age-related muscular degeneration. *Eur J Ophthalmol.* 2019.
33. He, Y. Expression of the complement system's activation factors in plasma of patients with early/late-onset severe pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2016, vol. 76, no. 3, s. 205-211.
34. Picard, C. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018, vol. 38, no. 1, s. 96-128.
35. Merle, N.S. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015, vol. 6, s. 262.
36. Botto, M. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol.* 2009, vol. 46, no. 14, s. 2774-83.
37. Salmon, J.E. - Girardi, G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *Journal of reproductive immunology.* 2008, vol. 77, no. 1, s. 51-56.
38. Aggarwal, R. Complete complement deficiency in a large cohort of familial systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010, vol. 19, no. 1, s. 52-7.
39. Rai, R. - Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006, vol. 368, no. 9535), s. 601-11.
40. Sugiura-Ogasawara, M. Complement as a predictor of further miscarriage in couples with recurrent miscarriages. *Human Reproduction.* 2006, vol. 21, no. 10, s. 2711-2714.

41. Denny, K.J. Complement in pregnancy: a delicate balance. *Am J Reprod Immunol.* 2013, vol. 69, no. 1, s. 3-11.
42. Ashkar, A.A. - Di Santo, J.P. - Croy, B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000, vol. 192, no. 2, s. 259-70.
43. Richani, K. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2005, vol. 17, no. 4, s. 239-245.
44. Huppertz, B. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol.* 1998, vol. 110, no. 5, s. 495-508.
45. Trouw, L.A. - Blom, A.M. - Gasque, P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Molecular Immunology.* 2008, vol. 45, no. 5, s. 1199-1207.
46. Regal, J.F. - Burwick, R.M. - Fleming, S.D. The Complement System and Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2017, vol. 19, no. 11, s. 87.
47. Duckitt, K. - Harrington, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Bmj.* 2005, vol. 330, no. 7491, s. 565.
48. Derzsy, Z. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol.* 2010, vol. 47, no. 7-8, s. 1500-6.
49. Schlembach, D. Association of maternal and/or fetal factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation with HELLP syndrome and intrauterine growth restriction. *Clinical Science.* 2003, vol. 105, no. 3, s. 279-285.

50. Hayashi, M. Aetiology of pre-eclampsia and thrombophilic genetic mutations. *Clinical Science*. 2003, vol. 105, no. 3, s. 269-271.
51. Madhukaran, S.P. Role of collectins and complement protein C1q in pregnancy and parturition. *Immunobiology*. 2016, vol. 221, no. 11, s. 1273-1288.
52. Lynch, A.M. Complement activation fragment Bb in early pregnancy and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2008, vol. 199, no. 4, s. 354.e1-8.
53. Soto, E. Anaphylatoxins in preterm and term labor. *J Perinat Med*. 2005, vol. 33, no. 4, s. 306-13.
54. Nowicki, S. Preterm Labor: CD55 in Maternal Blood Leukocytes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009, vol. 61, no. 5, s. 360-367.
55. Song, W.C. Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicol Pathol*. 2012, vol. 40, no. 2, s. 174-82.
56. Georgiou, H.M. Predicting Preterm Labour: Current Status and Future Prospects. *Disease Markers*. 2015, vol. 2015, s. 9.
57. Kobilková, J. - Karlova, U. *Základy gynekologie a porodnictví*. Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-315-0.
58. Vavřinková, B. Předčasný porod. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. 2009, vol. 1, s. 46-47.
59. Kramer, M.S. Challenges in defining and classifying the preterm birth syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2012, vol. 206, no. 2, s. 108-12.
60. Chandiramani, M. - Tribe, R.M. - Shennan, A.H. Preterm labour and prematurity. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2007, vol. 17, no. s. 232-237.

61. Johnson, S. Neurodevelopmental disability through 11 years of age in children born before 26 weeks of gestation. *Pediatrics*. 2009, vol. 124, no. 2, s. 249-257.
62. Walani, S.R. - Biermann, J. March of Dimes Foundation: leading the way to birth defects prevention. *Public health reviews*. 2017, vol. 38, s. 12-12.
63. Howson, C.P. Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health*. 2013, vol. 10, no. 1, s. S1.
64. Liu, L. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*. 2012, vol. 379, no. 9832, s. 2151-2161.
65. Robinson, J.N. - Regan, J.A. - Norwitz, E.R. The epidemiology of preterm labor. in *Seminars in perinatology*. Elsevier, 2010.
66. Caughey, A.B. - Robinson, J.N. - Norwitz, E.R. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol*. 2008, vol. 1, no. 1, s. 11-22.
67. Simhan, H.N. - Canavan, T.P. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. *Bjog*. 2005, vol. 112, no. 1, s. 32-7.
68. Musilova, I. Intraamniotic Inflammation in Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *PloS one*. 2015, vol. 10, no. 7.
69. Gomez, R. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1998, vol. 179, no. 1, s. 194-202.
70. Gotsch, F. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007, vol. 50, no.3, s. 652-83.

71. Kačerovský, M. The fetal inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2013, vol. 26, no. 8, s. 795-801.
72. Kačerovský, M. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. *Labor Actuell*. 2018, vol. 22, no. 3, s. 18-23.
73. Ellestad, S.C. Preterm premature rupture of membrane management--inpatient versus outpatient: a retrospective review. *Am J Perinatol*. 2008, vol. 25, no. 1, s. 69-73.
74. Kačerovský, M. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. *Česká gynekologie*. 2013, vol. 82, s. 15-18.
75. Kenyon, S.L. - Taylor, D.J. - Tarnow-Mordi, W. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*. 2001, vol. 357, no. 9261, s. 979-88.
76. Aris, I.M. Preterm prelabour rupture of membranes: a retrospective cohort study of association with adverse outcome in subsequent pregnancy. *Bjog*. 2017, vol. 124, no. 11, s. 1698-1707.
77. Rose, G. Antibiotic resistance potential of the healthy preterm infant gut microbiome. *PeerJ*. 2017, vol. 5, s. 2928-2928.
78. Dodd, J.M. Prenatal administration of progesterone for preventing preterm birth in women considered to be at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013, vol. 7, s. 4947.
79. O'Brien, J.M. Effect of progesterone on cervical shortening in women at risk for preterm birth: secondary analysis from a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009, vol. 34, no. 6, s. 653-9.

80. Sanchez-Ramos, L. - Kaunitz, A.M. - Delke, I. Progestational agents to prevent preterm birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obstet Gynecol.* 2005, vol. 105, no. 2, s. 273-9.
81. Schleußner, E. The Prevention, Diagnosis and Treatment of Premature Labor. *Deutsches Ärzteblatt international.* 2013, vol. 110, s. 227-36.
82. Simhan, H.N. - Caritis, S.N. Prevention of Preterm Delivery. *New England Journal of Medicine.* 2007, vol. 357, no.5, s. 477-487.
83. Kane, S.C. - Costa, F.d.S. - Brennecke, S. First trimester biomarkers in the prediction of later pregnancy complications. *BioMed research international.* 2014, vol. 2014.
84. Dekker, G.A. Risk Factors for Preterm Birth in an International Prospective Cohort of Nulliparous Women. *PLOS ONE.* 2012, vol. 7, no. 7.
85. Greco, E. First-trimester screening for spontaneous preterm delivery with maternal characteristics and cervical length. *Fetal Diagn Ther.* 2012, vol. 31, no. 3, s. 154-61.
86. Koucky, M. Low levels of circulating T-regulatory lymphocytes and short cervical length are associated with preterm labor. *J Reprod Immunol.* 2014, vol. 106, s. 110-7.
87. Berghella, V. - Baxter, J.K. - Hendrix, N.W. Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm delivery. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2013, vol. 1
88. Goldenberg, R.L. The Preterm Prediction Study: Toward a multiple-marker test for spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2001, vol. 185, no. 3, s. 643-651.

89. Goldenberg, R.L. - Goepfert, R.A. - Ramsey, P.S. Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 192, no. 5, s. 36-46.
90. Shankar, R. Molecular Markers of Preterm Labor in the Choriondecidua. *Reproductive Sciences*. 2010, vol. 17, no. 3, s. 297-310.
91. Romero, R. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 1994, vol. 734, s. 414-29.
92. Menon, R. - Richardson, L.S. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol*. 2017, vol. 41, no. 7, s. 409-419.
93. Draper, D. Trichomonas vaginalis Weakens human Amniochorion in an in vitro model of premature membrane rupture. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1995, vol. 2, no. 6, s. 267-74.
94. Romero, R. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol*. 1992, vol. 166, no. 5, s. 1382-8.
95. Theis, K.R. Microbial burden and inflammasome activation in amniotic fluid of patients with preterm prelabor rupture of membranes. *J Perinat Med*. 2020, vol. 48, no. 2, s. 115-131.
96. Swiatkowska-Freund, M. Perinatal outcome in preterm premature rupture of membranes before 37 weeks of gestation. *Ginekol Pol*. 2019, vol. 90, no. 11, s. 645-650.
97. Aguin, E. Amniotic fluid inflammation with negative culture and outcome after cervical cerclage. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012, vol. 25, no. 10, s. 1990-4.

98. Jia, X. Value of amniotic fluid IL-8 and Annexin A2 in prediction of preterm delivery in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Reprod Med.* 2014, vol. 59, no. 3-4, s. 154-60.
99. Lee, S.M. A transcervical amniotic fluid collector: a new medical device for the assessment of amniotic fluid in patients with ruptured membranes. *J Perinat Med.* 2015, vol. 43, no. 4, s. 381-9.
100. Oh, K.J. A new rapid bedside test to diagnose and monitor intra-amniotic inflammation in preterm PROM using transcervically collected fluid. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.*
101. Lachelin, G.C. Low saliva progesterone concentrations are associated with spontaneous early preterm labour (before 34 weeks of gestation) in women at increased risk of preterm delivery. *Bjog.* 2009, vol. 116, no. 11, s. 1515-9.
102. Priya, B. Salivary progesterone as a biochemical marker to predict early preterm birth in asymptomatic high-risk women. *Bjog.* 2013, vol. 120, no. 8, s. 1003-1011.
103. Tsiartas, P. Prediction of spontaneous preterm delivery in women with threatened preterm labour: a prospective cohort study of multiple proteins in maternal serum. *Bjog.* 2012, vol. 119, no. 7, s. 866-873.
104. Malak, T.M. Fetal fibronectin in cervicovaginal secretions as a predictor of preterm birth. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996, vol. 103, no. 7, s. 648-53.
105. Parker, J. - Bell, R. - Brennecke, S. Fetal fibronectin in the cervicovaginal fluid of women with threatened preterm labour as a predictor of delivery before 34 weeks' gestation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1995, vol. 35, no. 3, s. 257-61.
106. Leitich, H. Cervicovaginal fetal fibronectin as a marker for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, vol. 180, no. 5, s. 1169-76.

107. Khambay, H. The Actim Partus test to predict pre-term birth in asymptomatic high-risk women. *J Obstet Gynaecol*. 2012, vol. 32, no. 2, s. 132-4.
108. Paternoster, D.M. Cervical pHIGFBP-1 in the evaluation of the risk of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007, vol 86, no. 2, s. 151-5.
109. Lynch, A.M. The relationship of circulating proteins in early pregnancy with preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2016, vol. 214, no. 4, s. 517.
110. Park, H. The Identification of Immune-Related Plasma Proteins Associated with Spontaneous Preterm Delivery and Intra-Amniotic Infection in Women with Premature Cervical Dilation or an Asymptomatic Short Cervix. *Journal of Korean medical science*. 2020, vol. 35, no. 7, s. 26.
111. Kim, Y.M. Complement C3a, But Not C5a, Levels in Amniotic Fluid Are Associated with Intra-amniotic Infection and/or Inflammation and Preterm Delivery in Women with Cervical Insufficiency or an Asymptomatic Short Cervix (≤ 25 mm). *J Korean Med Sci*. 2018, vol. 33, no. 35.