

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Disertační práce

Praha, 2020

Mgr. Lenka Dvořáková

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Disertační práce

Využití proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací

Heat shock proteins - their role in diagnosis and prognosis of pregnancy-related complications

Školitel: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14. 01. 2020

Lenka Dvořáková

Identifikační záznam:

DVOŘÁKOVÁ, Lenka. *Využití proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací [Heat shock protein – their role in diagnosis and prognosis of pregnancy related complications]*. Praha, 2020. 111, 3. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Oddělení molekulární biologie a patologie buňky. Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Klíčová slova: proteiny tepelného šoku, preeklampsie, fetální růstová restrikce, gestační hypertenze, předčasný porod

Keywords: heat shock proteins, preeclampsia, fetal growth restriction, gestational hypertension, preterm birth

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. a své kolegyni, Mgr. Kateřině Kotlabové, Ph.D., za cenné rady a odborné vedení při zpracování mé disertační práce a v průběhu celého mého studia.

Abstrakt

Proteiny tepelného šoku zajišťují univerzální stresovou odpověď buněk, například při vystavení buněk vysoké teplotě, těžkým kovům, extrémnímu pH, infekci, zánětu, kyslíkovým radikálům nebo nedostatku živin a kyslíku. Předpokládali jsme, že se stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi projeví změnou profilu genové exprese proteinů tepelného šoku, které jsme testovali. Hladiny mRNA proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α a HspBP1) byly testovány v placentární tkáni, plné periferní žilní krvi a mateřské krevní plazmě u žen s následujícími těhotenskými komplikacemi – preeklampsie (PE), fetální růstová restrikce (FGR), gestační hypertenze (GH), spontánní předčasný porod (PTB), předčasný odtok plodové vody (PPROM) a u fyziologických gravidit. Dále jsme zjišťovali, zda má závažnost daného onemocnění vliv na genovou expresi jednotlivých hsp v příslušném biologickém materiálu.

V placentární tkáni byla zjištěna zvýšená genová exprese Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 u pacientek s mírnou preeklampií (stavu, který nevyžaduje okamžité ukončení těhotenství, pokud je řádně léčen) a u žen s pozdní preeklampií s klinickou manifestací až po 34. týdnu těhotenství. Co se týče předčasných porodů, byla pozorována zvýšená exprese Hsp27 a Hsp60 u obou skupin (PTB a PPROM). Navíc byla pozorována downregulace Hsp70 a HspBP1 u pacientek s PPROM ve srovnání s fyziologickými graviditami. Protein HspBP1 navíc vykazoval změnu exprese mezi skupinami PTB a PPROM. U Hsp60 a Hsp70 byla pozorována silná pozitivní korelace mezi genovou expresí v placentární tkáni a koncentracemi CRP v mateřském séru ve skupině žen s PTB. Hladiny některých mRNA hsp se zvyšovaly s narůstajícím gestačním týdnem v době porodu v placentární tkáni u pacientek s PPROM (Hsp27, Hsp70, Hsp90 α) a PTB (Hsp27). Mateřská cirkulace odráží patologické stavy jak u matky, tak v placentě. V plné periferní žilní krvi došlo k upregulaci Hsp70 a downregulaci Hsp90 α u PE, FGR i GH ve srovnání s normálním průběhem těhotenství. Protein Hsp60 zvýšil svou genovou expresi v plné periferní žilní krvi u PE a FGR. Při následné analýze v krevní plazmě matek se rovněž prokázalo zvýšení genové exprese Hsp70 ve skupině pacientek s PE a GH.

Abstract

Heat shock proteins provide a universal stress response to cells, for example, exposed to high temperature, heavy metals, extreme pH, infection, inflammation, oxygen radicals, or in case of lack of nutrients and oxygen. We assumed that stress conditions associated with pregnancy-related complications will result in a change in gene expression profile of heat shock proteins we selected for the study. Heat shock protein mRNA levels (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α and HspBP1) were tested in placental tissue, whole peripheral venous blood and maternal plasma in women with the following pregnancy-related complications - preeclampsia (PE), fetal growth restriction (FGR), gestational hypertension (GH), spontaneous preterm birth (PTB), preterm premature rupture of membranes (PPROM) and normal pregnancies. We also investigated whether the severity of the disease had any impact on hsp gene expression in particular biological samples.

In placental tissue, overexpression of Hsp27, Hsp90 α and HspBP1 was found in patients with mild preeclampsia (that does not require immediate termination of pregnancy if properly treated), and in women with late onset of preeclampsia with clinical manifestation after 34th week of gestation. Concerning preterm birth, overexpression of Hsp27 and Hsp60 was observed in both groups (PTB and PPRM). In addition, downregulation of Hsp70 and HspBP1 was observed in patients with PPRM compared to normal pregnancies. Moreover, HspBP1 showed a change in gene expression between the groups of patients with PTB and PPRM. Strong positive correlation between gene expression of Hsp60 and Hsp70 in placental tissue and CRP levels in maternal sera was observed in the PTB group. Some of the examined hsp mRNA displayed increased levels with advancing gestational age at delivery in placental tissue of patients with PPRM (Hsp27, Hsp70, Hsp90 α) and PTB (Hsp27). Maternal circulation reflects pathological conditions of both mother and placenta. In whole peripheral venous blood, Hsp70 was upregulated and Hsp90 α was downregulated in PE, FGR and GH compared to normal pregnancy. Upregulation of Hsp60 in whole peripheral venous blood was observed in patients with PE and FGR. Subsequent analysis performed on maternal plasma samples confirmed increased Hsp70 gene expression in PE and GH groups.

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
Apaf-1	faktor aktivující apoptotické proteázy-1
Ask1	apoptotická signál regulující kináza 1
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenáza 2
CPR	cerebroplacentární poměr
CRP	C-reaktivní protein
Ct	prahová hodnota
DAXX	protein asociovaný s doménou smrti
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTK	diastolický krevní tlak
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Eng	endoglin
FAM	6-karboxyfluorescein
FGR	fetální růstová restrikce
Flt-1	Fms-podobná tyrozinová kináza 1
GBS	streptokok skupiny B
GH	gestační hypertenze
HELLP	z angl. Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet Count
hsp	protein tepelného šoku

IGFBP-1	inzulinu podobný růstový faktor vázající protein-1
IL	interleukin
IUGR	intrauterinní růstová restrikce
lncRNA	dlouhá nekódující ribonukleová kyselina
MGB	z angl. minor groove binder
MIAC	mikroby indukovaný intraamniální zánět
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NEF	nukleotid výměnný faktor
NO	oxid dusnatý
OTR	oxytocinový receptor
PAMG-1	placentární alfa-mikroglobulin-1
PE	preeklampsie
PGE ₂	prostaglandin E2
PI	index pulsatility
PIGF	placentární růstový faktor
PPROM	předčasný odtok plodové vody
PTB	spontánní předčasný porod
sEng	solubilní endoglin
sFlt-1	solubilní forma Flt-1
SGA	malé plody vzhledem ke gestačnímu stáří
STK	systolický krevní tlak
TAMRA	tetrametylrhodamin
TGF	transformující růstový faktor
TK	krevní tlak

VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor
VIC	4,7,2'-trichloro-7'-fenyl-6-karboxyfluorescein

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Proteiny tepelného šoku.....	2
2.1. Historie proteinů tepelného šoku.....	2
2.2. Nomenklatura.....	3
2.2.1 Rodina malých proteinů tepelného šoku.....	3
2.2.2 Hsp40 rodina (DNAJ).....	5
2.2.3 Hsp60 rodina.....	5
2.2.4 Hsp70 rodina.....	7
2.2.5 Hsp90 rodina.....	9
2.2.6 Hsp110 rodina.....	11
3. Těhotenské komplikace.....	11
3.1 Hypertenze v těhotenství.....	11
3.1.1 Preeklampsie.....	12
3.1.1.1 Klinické příznaky preeklampsie.....	12
3.1.1.2 Rizikové faktory preeklampsie.....	13
3.1.1.3 Patogeneze preeklampsie.....	14
3.1.1.4 Diagnostika a predikce preeklampsie.....	20
3.1.1.5 Léčba preeklampsie.....	25
3.2 Fetální růstová restrikce.....	26
3.2.1 Etiologie fetální růstové restrikce.....	26

3.2.2 Klasifikace FGR.....	27
3.2.3 Dopplerovská ultrasonografie.....	29
3.3 Předčasný porod.....	31
3.3.1 PPRM.....	31
3.3.1.1 Patofyziologie PPRM.....	32
3.3.1.2 Diagnostika PPRM.....	33
3.3.1.3 Management PPRM.....	33
3.3.2 PTB.....	34
3.3.2.1 Patofyziologie PTB.....	34
3.3.2.2 Prevence PTB.....	35
3.3.2.3 Management PTB.....	35
4. Proteiny tepelného šoku v těhotenství.....	36
4.1 Hsp v průběhu fyziologické gravidity.....	36
4.2 Hsp v průběhu preeklampsie.....	37
4.3 Hsp a předčasný porod.....	39
5. Hypotéza a cíle práce.....	40
6. Materiál a metody.....	41
6.1 Placentární tkáň.....	42
6.2 Mateřská plná periferní žilní krev.....	45
6.3 Mateřská krevní plazma.....	47

6.4 Izolace RNA z placentární tkáně.....	48
6.5 Izolace RNA z plné periferní žilní krve matky.....	49
6.6 Izolace RNA z mateřské krevní plazmy.....	50
6.7 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase.....	51
6.8 Statistická analýza.....	55
7. Výsledky.....	57
7.1 Hladiny mRNA hsp v placentární tkáni u pacientek s těhotenskými komplikacemi a předčasným porodem.....	57
7.1.1 Asociace studovaných mRNA hsp v placentární tkáni a závažnost preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografii.....	59
7.1.2 Expresní profil proteinů tepelného šoku v placentární tkáni u těhotenství s PPRM s výskytem HCA a bez přítomnosti HCA.....	63
7.1.3 Vliv způsobu porodu na genovou expresi hsp v placentární tkáni v rámci skupin PPRM, PTB a fyziologických gravidit.....	63
7.1.4 Vliv doby mezi odtokem plodové vody a porodem na genovou expresi hsp v placentární tkáni ve skupině pacientek s PPRM.....	64
7.1.5 Asociace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí hsp v placentární tkáni ve skupinách PPRM a PTB.....	65
7.1.6 Asociace mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a koncentrací CRP v mateřském séru ve skupinách PPRM a PTB s ohledem na antenatální profylaktické podání kortikosteroidů.....	67
7.1.7 Vztah mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a počtem leukocytů v krvi pacientek s PPRM a PTB s ohledem na profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů.....	69

7.2 Genová exprese proteinů tepelného šoku v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s těhotenskými komplikacemi.....	70
7.2.1 Asociace mezi genovou expresí hsp v mateřské plné periferní žilní krvi a závažností preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografií.....	71
7.3 Genová exprese proteinů tepelného šoku v mateřské krevní plazmě u pacientek s těhotenskými komplikacemi.....	75
7.3.1 Asociace mezi genovou expresí hsp v mateřské krevní plazmě a závažností preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografií.....	76
8. Diskuze.....	80
9. Závěr.....	86
10. Souhrn.....	88
10. Summary.....	89
11. Reference.....	90
11.1 Publikace výstupů řešení disertační práce.....	110
11.2 Publikace, které nejsou podkladem disertační práce.....	110
12. Seznam příloh.....	111

1. Úvod

Existuje mnoho faktorů, které mohou ovlivnit a ohrozit těhotenství. Pokud je ženám poskytována prenatální péče, je vyšší pravděpodobnost normálního průběhu těhotenství a porodu zdravého dítěte. V rámci prenatální péče se uplatňuje neinvazivní a invazivní prenatální diagnostika. Prenatální diagnostika má za úkol identifikovat těhotné ženy se zvýšeným rizikem výskytu dané choroby či vady a toto podezření následně potvrdit nebo vyvrátit. Tím je umožněna včasná diagnostika a péče o těhotnou ženu. V současné době se vědecká komunita snaží najít nové prediktivní a diagnostické markery pro široké spektrum těhotenských komplikací. Ve své práci jsem se zaměřila na studium proteinů tepelného šoku. Jedná se fylogeneticky konzervované proteiny, které jsou produkovány jako odpověď na vystavení buněk stresovým podmínkám. Předpokládali jsme, že těhotenské komplikace bez ohledu na asociaci s placentární insuficiencí, budou vyvolávat u matky i v placentě stresovou reakci, která se bude manifestovat změnou profilu genové exprese proteinů tepelného šoku, které jsme studovali v příslušném studovaném biologickém materiálu.

V disertační práci jsem navazovala na svou diplomovou práci s názvem „Význam proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací“ a sledovala jsem genovou expresi proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α a HspBP1) u vybraných těhotenských komplikací (preeklampsie, fetální růstová restrikce, gestační hypertenze, spontánní předčasný porod, předčasný odtok plodové vody) v době klinické manifestace daného onemocnění. Hladiny mRNA sledovaných proteinů tepelného šoku byly testovány v placentární tkáni, plné periferní žilní krvi žen a mateřské plazmě.

2. Proteiny tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku (heat shock proteins, hsp) jsou všudypřítomné, fylogeneticky konzervované molekuly, které se vyskytují u všech živých organismů – jak u prokaryot, tak u eukaryot (včetně člověka). Nacházejí se téměř ve všech vnitrobuněčných strukturách, jako je jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum nebo cytoplazma [Robert, 2003]. Tato proteinová rodina zajišťuje univerzální stresovou odpověď buněk, například při vystavení buněk vysoké teplotě, těžkým kovům, extrémnímu pH, infekci, zánětu, kyslíkovým radikálům nebo nedostatku živin a kyslíku [Wagner et al, 1999; Benjamin & McMillan, 1998]. Hsp mají duální roli v závislosti na tom, zda jsou lokalizovány intracelulárně nebo extracelulárně. Intracelulární proteiny tepelného šoku mají protektivní funkci a napomáhají buněčnému přežití během smrtících podmínek [Bruemmer-Smith et al, 2001; Schmitt et al, 2007; Mehlen et al, 1996]. Naopak extracelulárně lokalizované hsp nebo hsp vázané na buněčnou membránu zprostředkovávají imunologické funkce a účastní se stimulace imunitního systému [Schmitt et al, 2007; Calderwood et al, 2016; Multhoff & Hightower, 2011]. Přítomnost proteinů tepelného šoku v lidském séru je asociována s přítomností stresových faktorů, například zánětu, virové nebo bakteriální infekce [Pittet et al, 2002; Gelain et al, 2011]. Existují jak konstitutivní, tak inducibilní formy proteinů tepelného šoku. Za fyziologických podmínek buňky exprimují konstitutivní formy proteinů tepelného šoku a exprese těchto hsp se několikanásobně zvýší při vystavení buněk náhlým teplotním změnám či jiným stresovým podmínkám. Během nefyziologických podmínek dochází také k zahájení exprese inducibilních forem hsp. S proteiny tepelného šoku je také spojen termín chaperon. Chaperony jsou proteiny, které napomáhají ostatním bílkovinám se správně sbalit (získat správné prostorové uspořádání) nebo se rozbalit, zabraňují jejich předčasnému svinutí a intermolekulárním interakcím ještě nesbalených bílkovin a tím i jejich precipitaci.

2.1 Historie proteinů tepelného šoku

V roce 1962 italský genetik Ferruccio Ritossa a jeho spolupracovníci popsali, že po vystavení larev *Drosophila busckii* a *Drosophila melanogaster* teplotnímu šoku

dochází v určitých lokusech chromozomů slinných žláz k tvorbě charakteristických smyček, které vykazují zvýšenou transkripční aktivitu [Ritossa, 1962]. Nicméně až v roce 1974 byly proteiny, kódované geny v těchto oblastech, pojmenovány jako proteiny tepelného šoku, a to z důvodu zvýšení jejich syntézy při náhlém zvýšení teploty [Tissières et al, 1974]. Na základě dalších studií bylo prokázáno, že ke zvýšení syntézy proteinů tepelného šoku nedochází pouze v případě zvýšení teploty, ale že exprese hsp vyvolává mnoho dalších faktorů v buňce. Další studie také prokázaly, že proteiny tepelného šoku jsou přítomny a mohou být indukovány u všech prokaryotických a eukaryotických organismů, včetně rostlin, a že patří mezi nejvíce fylogeneticky konzervované proteiny.

2.2 Nomenklatura

Lidské proteiny tepelného šoku se obvykle dělí do několika rodin na základě jejich funkce v buňce, homologie v primární struktuře a přibližné molekulové hmotnosti měřené v kDa. Mezi tyto rodiny patří rodina malých proteinů tepelného šoku, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp110. Nomenklaturu lidských hsp rodin navrhl Kampinga se svým týmem [Kampinga et al, 2009].

2.2.1 Rodina malých proteinů tepelného šoku

Proteiny této rodiny mají molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek 12-43 kDa a jsou charakterizované přítomností vysoce konzervovaného úseku 80-100 aminokyselin v jejich C-terminální doméně nazývaného α -krystalinová doména, která je lemována méně konzervovanou N-terminální doménou a C-terminální sekvencí [Kappé et al, 2003; Franck et al, 2004]. Malé proteiny tepelného šoku jsou často nalézány v oligomerních komplexech, které obsahují jednoho či více členů této rodiny, čímž mohou poskytovat buňce velkou rozmanitost v chaperonové specificitě. U lidí bylo identifikováno 11 členů malých proteinů tepelného šoku, přičemž nejlépe prostudovanými členy jsou Hsp27 (HspB1), α A krystalin (HspB4) a α B krystalin (HspB5) [Kampinga et al, 2009].

Hsp27 byl zprvu charakterizován jako ATP-nezávislý chaperon, který usnadňuje správné opětovné sbalení poškozených proteinů v důsledku teplotního šoku [Moran

et al, 1978; Jakob et al, 1993]. Další výzkumy však odhalily, že protein reaguje i na jiné stresové podněty, jako například oxidační nebo chemický stres [Rogalla et al, 1999]. V průběhu oxidačního stresu slouží Hsp27 jako antioxidant, snižující hladiny reaktivních forem kyslíku pomocí zvyšování hladin intracelulárního glutathionu a snižováním hladin intracelulárního železa [Arrigo et al, 2005; Mehlen et al, 1997]. Hsp27 má anti-apoptotické účinky za podmínek chemického stresu pomocí interakce jak s mitochondriálně závislou, tak s mitochondriálně nezávislou cestou apoptózy. Hsp27 váže DAXX během apoptózy zprostředkované Fas-FasL a zabraňuje následné asociaci DAXX s Fas a Ask1 (apoptotická signál-regulující kináza 1) [Charette & Landry, 2000]. Hsp27 také interaguje s Bax a cytochromem c, čímž zabraňuje mitochondriálně závislé apoptóze [Bruey et al, 2000a; Havasi et al, 2008]. Hsp27 se také podílí na ochraně před programovanou buněčnou smrtí inhibicí apoptózy závislé na kaspázách [Calderwood et al, 2006]. Hsp27 má také schopnost regulovat cytoskeletální dynamiku aktinu během tepelného šoku a jiných stresových podmínek [Huot et al, 1996; Guay et al, 1997].

Lidský Hsp27 je konstitutivně exprimovaný protein, nacházející se v mnoha tkáních, který je kódovaný HSPB1 genem a tvoří velké, dynamické oligomery s průměrnou hmotností 500 kDa. Hsp27 oligomery sestávají ze stabilních dimerů, které jsou tvořeny dvěma α -krystalinovými doménami sousedních monomerů [Gusev et al, 2002]. Tyto dimery jsou závislé na jedinečném cysteinovém zbytku přítomném v α -krystalinové doméně lidského (C137) Hsp27 a myšího (C141) Hsp25 [Diaz-Latoud et al, 2005]. Delece těchto jedinečných cysteinových zbytků mění schopnost Hsp27 a Hsp25 multimerizovat a vylučuje jeho chaperonovou aktivitu a schopnost interagovat s polypeptidy. N-terminální domény Hsp27 jsou zodpovědné za vznik velkých oligomerů [Thériault et al, 2004]. N-terminální domény jsou citlivé na fosforylaci – lidský Hsp27 obsahuje tři fosforylovatelná serinová místa (Ser15, Ser78 a Ser82) [Landry et al, 1992]. Tyto fosforylace jsou výsledkem aktivity několika kináz [Kostenko & Moens, 2009], zejména MAPKAP kináz 2 a 3, které jsou samy aktivovány fosforylací proteinovou kinázou MAP p38. Je obecně akceptováno, že intenzivní fosforylace tří serinových míst přítomných v N-terminální doméně indukuje disociaci velkých oligomerů Hsp27. Tento jev byl například pozorován v buňkách tkáňové kultury, kde byla fosforylovatelná serinová místa nahrazena

kyselinou asparagovou [Rogalla et al, 1999; Mehlen et al, 1997]. Nicméně tento závěr neplatí, pokud jsou buňky vyhladovělé [Mehlen & Arrigo, 1994], nebo když je Hsp27 exprimován v tkáních [Bruey et al, 2000b].

2.2.2 Hsp40 rodina (DNAJ)

V této rodině se nachází proteiny o velikosti přibližně 40 kDa. Hsp40 je jedna z největších hsp rodin u lidí a je charakteristická přítomností konzervované J-domény, o které je známo, že interaguje s členy rodiny Hsp70 vazbou k Hsp70 N-terminální ATPázové doméně. Tato interakce reguluje a stimuluje vlastní aktivitu ATPázy Hsp70 a tím i navázání klientských proteinů Hsp70 [Wittung-Stafshede et al, 2003]. Všechna eukaryota mají několik genů kódujících Hsp40, což vede k expresi tkáňových nebo kompartmentově specifických izoform, které plní místně specifické funkce. Proteiny rodiny Hsp40 jsou chaperony, které se vážou na hydrofobní zbytky nesbalených a nově vznikajících polypeptidů a sdílejí společné substráty s Hsp70 [Szabo et al, 1996]. Hsp40 rodinu můžeme rozčlenit do 3 skupin podle homologie s bakteriálním proteinem DnaJ z *E. coli* [Hennessy et al, 2005]. Lidský genom kóduje 4 proteiny typu A, které vykazují homologii s *E. coli* DnaJ a obsahují N-koncovou J-doménu, oblast bohatou na glycin/fenylalanin, cystein bohatou oblast a variabilní C-terminální doménu. Hsp40 typu B mají N-koncovou J-doménu a sousední oblast bohatou na aminokyseliny glycin a fenylalanin. V lidském organismu se nachází 14 proteinů typu B a do této podskupiny patří DNAJB1, který je vysoce exprimovaný a teplotně inducibilní. Poslední podskupinou je typ C. Proteiny tohoto typu obsahují J-doménu, která ale nemusí být umístěna na N-konci proteinu. V lidském organismu se nachází celkem 22 typů C DNAJ proteinů [Hennessy et al, 2005; Kampinga et al, 2009].

2.2.3 Hsp60 rodina

Hsp60 spadá do rodiny tzv. chaperoninů. Chaperoniny jsou proteiny, které poskytují podporu při sbalování ostatních proteinů včetně fágového virionu, dokáží stabilizovat proteiny určené k transportu do mezimembránového prostoru a umí opět rozbalit špatně sbalené proteiny. Lze je rozdělit do dvou skupin podle přítomnosti nebo nepřítomnosti ko-chaperoninu, jejich aminokyselinových sekvencí a oligomerních

struktur. Chaperoniny I. skupiny se nacházejí v bakteriálním cytosolu (GroEL), v eukaryotických organelách, jako jsou mitochondrie (HSPD1) a chloroplasty (Rubisco vazebný protein) a v cytosolu některých archea. Skupina II sestává z chaperoninů archea a eukaryotických cytosolických variant (CCT) [Horwich et al, 2007]. V lidském genomu nacházíme jak mitochondriální chaperoniny – HSPD (HSPD1 gen, známý také jako Hsp60) a HSPE (HSPE1 gen, známý také jako Hsp10), tak cytosolické chaperoniny – CCT [Kampinga et al, 2009].

Lidský Hsp60, který je produktem HSPD1 genu, je mitochondriální chaperonin, zodpovědný za transport a opětovné sbalení přibližně 15-30 % buněčných proteinů transportovaných z cytoplazmy do mitochondriální matrix [Ranford et al, 2000]. Společně s Hsp10 usnadňuje správné sbalení importovaných proteinů. Může také zabránit nesprávnému sbalení a podporuje opětovné složení a správné sestavení rozložených polypeptidů generovaných za stresových podmínek v mitochondriální matrix [Levy-Rimler et al, 2001]. Kromě své role proteinu tepelného šoku hraje Hsp60 důležitou roli v přenosu a replikaci mitochondriální DNA [Kaufman et al, 2003]. Upregulace Hsp60 umožňuje udržování dalších buněčných procesů probíhajících v buňce, zejména během stresových podmínek. Podle některých studií má Hsp60 také imunologickou roli. Hsp60 je uvolňován mononukleárními buňkami periferní krve po expozici lipopolysacharidům nebo bakteriálním homologům Hsp60 (GroEL), což aktivuje určité typy buněk (monocyty, makrofágy a dendritické buňky) a indukuje sekreci širokého spektra cytokinů [Davies et al, 2006].

Nejčastěji studovaný a nejlépe popsáný je bakteriální GroEL/GroES chaperoninový systém (*E. coli*). GroEL je tvořen ze dvou homo-heptamerických kruhů, které mají dohromady kolem 800 kDa, přičemž každý kruh obsahuje sedm 57kDa podjednotek. Každá podjednotka obsahuje tři domény – 1) ekvatoriální doména, která obsahuje vazebná místa pro nukleotidy (ATP) a zprostředkovává kontakt mezi podjednotkami, 2) apikální doména, která se podílí na vazbě polypeptidu a obsahuje vazebná místa pro GroES, 3) intermediální doména, která spojuje ekvatoriální a apikální doménu. GroES je tvořen ze sedmi 10kDa podjednotek a funguje jako tzv. ko-chaperonin [Langer et al, 1992]. Reakční cyklus probíhá tak, že hydrofobní aminokyseliny apikální domény GroEL zachytí nascentní protein. Na ekvatoriální doménu se naváže ATP, což indukuje konformační změnu GroEL. GroES je následně schopen vazby na

apikální doménu GroEL a nesbalený protein je uvolněn do dutiny komplexu, který je nyní ve své cis konformaci. Hydrolyza ATP v cis komplexu vede k vazbě ATP na druhý (neobsazený) trans GroEL kruh. Vazbou druhého ATP dojde k uvolnění GroES z komplexu a uvolnění substrátového proteinu [Horwich et al, 2006; Walter, 2002].

V cytosolu lidských buněk se nachází hetero-oligomerní chaperoninový komplex složený z osmi různých podjednotek (CCT), který hraje nezbytnou roli ve skládání nově syntetizovaných cytosolických proteinů a chrání nově vznikající proteiny před jejich agregací. Jednotlivé podjednotky jsou kódovány samostatnými geny a sdílejí přibližně 30% identitu aminokyselinové sekvence [Kampinga et al, 2009].

2.2.4 Hsp70 rodina

Rodina proteinů tepelného šoku o velikosti 70 kDa představuje jednu z nejvíce rozšířených tříd chaperonů, která je vysoce konzervovaná a vyskytuje se u všech organismů. Členové Hsp70 rodiny kontrolují všechny aspekty buněčné proteostázy, jako je vznik nového proteinového řetězce, import proteinu do organel, transport proteinu přes membránu, sestavování multi-proteinových komplexů nebo proteinová degradace. U eukaryot se vyskytují jak konstitutivní (HspA8), tak stresově indukibilní (HspA1A) izoformy. Vysoké hladiny indukibilních izoform produkují buňky v reakci na vysokou teplotu, oxidační stres nebo změny pH. Hsp70 jsou monomerní proteiny, které se nacházejí v jakémkoliv eukaryotickém intracelulárním kompartmentu, kde se nachází ATP a lze je také najít v buněčných membránách [Gehrmann et al, 2005] i extracelulárně [Pockley et al, 2014], dále se nachází u bakterií a určitých archaea. Hsp70 jsou podporovány velkou škálou ko-chaperonů, které jsou klíčové pro vazbu klientských proteinů.

Různé izoformy Hsp70 jsou selektivně exprimovány na buněčném povrchu buněk napadených viry nebo bakteriemi nebo na nádorových buňkách a lze je nalézt v extracelulárním prostředí zdravých a nemocných jedinců [Hantschel et al, 2000; Multhoff & Hightower, 1996; Pockley et al, 2014]. Extracelulární Hsp70 mohou existovat buď volně v rozpustné formě, vázané na antigenní peptidy nebo asociované s exosomy [Lancaster & Febbraio, 2005].

Hsp70 obsahují tři hlavní funkční domény: 1) N-terminální ATPázová doména, která váže ATP a hydrolyzuje ho na ADP, 2) substrát vázající doména, která obsahuje drážku pro neutrální, hydrofobní aminokyselinové zbytky, 3) C-terminální doména, která je bohatá na α -helixy a funguje jako „víko“ pro substrát vázající doménu. Pokud je na Hsp70 navázán ATP, víko je otevřené a peptidy se vážou a uvolňují relativně rychle, avšak afinita pro substrát je nízká. Jelikož je bazální rychlost ATPázy Hsp70 velmi nízká, tak je stimulována synergickým působením substrátu a ko-chaperonu z rodiny proteinů Hsp40. Homodimerní Hsp40 se váží na nesbalené polypeptidy prostřednictvím své C-terminální domény. Po dodání substrátu vázaného na Hsp40 na Hsp70 dochází k interakci Hsp40 s N-terminální ATPázovou doménou Hsp70, což vyvolá konformační změnu, která stimuluje hydrolýzu ATP a dojde k uzavření drážky pro vazbu substrátu. Když je Hsp70 vázán s ADP, chaperon vykazuje vysokou afinitu a nízkou výměnnou rychlost pro svůj substrát. Uvolnění ADP je zprostředkováno specifickou interakcí NEF (nucleotide exchange factor) s N-terminální ATPázovou doménou Hsp70 a následnou konformační změnou, která vede k nízké afinitě a uvolnění substrátu. Uvolněný substrát může být buď složen do nativního proteinu, znovunavázán k Hsp70 nebo sestaven do oligomerů [Mayer, 2010; Wittung-Stafshede et al, 2003].

Lidská Hsp70 rodina obsahuje 13 genových produktů, které se od sebe liší úrovní exprese, buněčnou lokalizací a aminokyselinovou sekvencí. Hlavními inducibilními členy Hsp70 jsou Hsp70-1 (HspA1A) a Hsp70-2 (HspA1B), souhrnně nazývané Hsp70. Tyto dva proteiny se od sebe liší pouze dvěma aminokyselinami. Bazální mRNA exprese HspA1A/B se ve většině tkání liší a překračuje úroveň exprese jiných izoforem Hsp70 u lidí [Daugaard et al, 2007]. Oba tyto proteiny nalezneme hojně v cytosolu, jádře nebo exosomech. HspA1A se nachází také v buněčné stěně. Geny pro HspA1A a HspA1B se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu v klastru MHC III. třídy v oblasti 6p21.3 a neobsahují žádné introny [Milner & Campbell, 1990].

Funkce různých členů Hsp70 rodiny závisí na jejich buněčné lokalizaci. Za fyziologických podmínek působí členové této rodiny jako molekulární chaperony. Vnitrobuněčné Hsp70 napomáhají skládání nově syntetizovaných a denaturovaných proteinů, transportu proteinů do organel nebo disociaci agregovaných proteinů

[Frydman et al, 1994]. Proteiny Hsp70 chrání buňky před teplotním nebo oxidačním stresem, protože takováto stresová situace způsobuje poškození proteinů (denaturace nebo agregace). Hsp70 rozpozná hydrofobní aminokyseliny částečně denaturovaných proteinů a pomůže jim znovu se složit do správné konformace. Hsp70 ve spojení s dimerními Hsp40 a NEF dokáže rozpoznat také stabilní chybně složené polypeptidy a pomoci jim se správným složením. Proteiny z rodiny Hsp70 mají také anti-apoptické účinky a blokují apoptózu na různých úrovních. Hsp70 dokáže blokovat mitochondriální translokaci a aktivaci Bax, čímž zabraňuje permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolňování pro-apoptických faktorů [Stankiewicz et al, 2005; Yang et al, 2012]. Dále Hsp70 inhibuje sestavení signalizačního komplexu spouštějícího buněčnou smrt (DISC) [Guo et al, 2005]. Jednou z dalších možností je vazba Hsp70 přímo na Apaf-1 a blokace vazby prokaspázy 9 na mitochondriální apoptozóm [Beere et al, 2000].

HspBP1, neboli Hsp70 vazebný protein 1 (Hsp 70 binding protein 1), je členem rodiny eukaryotických proteinů známých jako nukleotidové výměnné faktory pro Hsp70 [Bracher & Verghese, 2015]. Jedná se hlavně o intracelulární protein, nacházející se v jádře a cytoplazmě, nicméně ho lze najít také extracelulárně. HspBP1 se váže na HspA1A, inhibuje jeho chaperonovou aktivitu a podporuje disociaci ATP z N-terminální ATPázové domény Hsp70 [Raynes & Guerriero, 1998]. HspBP1 také hraje roli při nádorové regulaci chaperonových proteinů, kdy HspA1A nemůže uplatňovat svou anti-apoptickou funkci [Tanimura et al, 2007]. Lze očekávat, že molární poměr HspBP1 k Hsp70 v buňkách bude důležitým determinantem interakce mezi těmito dvěma proteiny, jakož i funkce výsledného komplexu.

2.2.5 Hsp90 rodina

Členové patřící do rodiny Hsp90 jsou vysoce konzervované a všudypřítomné molekuly s přibližnou molekulovou hmotností 90 kDa. Jedná se o molekulární chaperony podporující skládání *de novo* syntetizovaných nebo nesprávně složených proteinů, čímž působí proti jejich agregaci. V nestresových podmínkách představují 1-2 % všech buněčných proteinů mnoha buněk [Csermely et al, 1998]. U savců se jednotliví členové této rodiny nacházejí v různých buněčných kompartmentech.

V cytoplazmě můžeme nalézt Hsp90 α a Hsp90 β , v endoplazmatickém retikulu existuje GRP94 a v mitochondriích se vyskytuje TRAP-1. Proteiny rodiny Hsp90 jsou nezbytné během mnoha buněčných procesů a regulačních drah, jako je apoptóza, kontrola buněčného cyklu, životaschopnost buněk, skládání a degradace proteinů nebo buněčná signalizace [García-Cardena et al, 1998; Lewis et al, 2000; Aligue et al, 1994]. Kromě toho také indukují adaptivní imunitu aktivací dendritických a antigen prezentujících buněk [Imai et al, 2011; Rajagopal et al, 2006]. Nadměrná exprese Hsp90 je spojena s mnoha patologickými stavy, jako jsou nádorová onemocnění, virové infekce, zánět nebo neurodegenerativní onemocnění [Pick et al, 2007]. Hsp90 interagují s „klientskými proteiny“, které zahrnují proteinkinázy, transkripční faktory a další proteiny, a buď usnadňují jejich stabilizaci a aktivaci nebo je nasměrují k proteazomální degradaci [Hahn, 2009].

V lidském genomu je kódováno 5 proteinů patřící do Hsp90 rodiny [Kampinga et al, 2009]. V cytoplazmě savčích buněk se nachází dvě hlavní izoformy Hsp90 - Hsp90 α a Hsp90 β . Hsp90 α je inducibilní a zároveň převažující forma a Hsp90 β je konstitutivní a menšinová forma [Sreedhar et al, 2004]. Tyto cytosolické izoformy Hsp90 jsou vysoce homologní a vykazují 85% sekvenční identitu [Johnson, 2012]. Ačkoliv obě izoformy tvoří velmi často dimery, Hsp90 α má tendenci dimerizovat častěji ve srovnání s Hsp90 β [Sreedhar et al, 2004]. Každý monomer je složen z několika domén. N-terminální doména obsahuje ATP vazebný motiv, což znamená, že je zodpovědná za vazbu a hydrolýzu ATP. U eukaryot se na rozdíl od prokaryot vyskytuje krátká dynamická oblast, která spojuje N-terminální doménu s centrální doménou. Tato oblast je vysoce nabitá a má variabilní délku a složení aminokyselin [Tsutsumi et al, 2009]. Centrální doména obsahuje vazebné místo pro γ fosfát z ATP a moduluje funkci Hsp90. Některé studie navíc prokázaly, že se tato doména účastní vazby ko-chaperonů a interakce s klientskými proteiny [Meyer et al, 2003]. C-terminální doména slouží k dimerizaci Hsp90, obsahuje vazebné místo pro kalmodulin, a také obsahuje další vazebné místo pro ATP, které se otevře po obsazení N-terminálního místa a slouží jako alosterický regulátor aktivity N-terminální ATPázy [Soti et al, 2002; Soti et al, 2003].

2.2.6 Hsp110 rodina

Hsp110 je rodina velkých stresových proteinů, která je pojmenována po savčím Hsp110 a je evolučně spjata s rodinou Hsp70. Bylo zjištěno, že sekvence Hsp110 sdílí přibližně 30-33% aminokyselinovou identitu s členy rodiny Hsp70. Nejvyšší shoda byla nalezena v konzervované N-terminální ATPázové doméně [Lee Yoon et al, 1995]. Proteiny rodiny Hsp110 byly nalezeny u všech studovaných obratlovců, ale nejlépe byly popsány u savců (myš, křeček, člověk). Členové této rodiny jsou schopni vázat se na špatně sbalené proteiny, čímž zabraňují jejich agregaci, ale nemohou je rozvinout a opět sbalit [Oh et al, 1997]. Lidský Hsp110 funguje také jako nukleotidový výměnný faktor pro chaperonové proteiny HspA1A a HspA1B, kde podporuje uvolnění ADP, čímž se spustí uvolňování klientského proteinu [Dragovic et al, 2006; Rauch & Gestwicki, 2014]. V lidském genomu se nacházejí 4 geny kódující proteiny rodiny Hsp110, přičemž 3 tyto proteiny se nacházejí v cytosolu (HspH1, HspH2 a HspH3) a jeden v endoplazmatickém retikulu (HspH4) [Kampinga et al, 2009].

3. Těhotenské komplikace

3.1 Hypertenze v těhotenství

Hypertenzi v těhotenství definujeme pomocí naměřených hodnot krevního tlaku – systolický TK ≥ 140 mmHg a/nebo diastolický TK ≥ 90 mmHg. Během těhotenství rozlišujeme několik typů hypertenze [Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000].

1. Chronická hypertenze – jedná se o hypertenzi diagnostikovanou před těhotenstvím nebo do 20. týdne gestace. Vysoký krevní tlak, který se vyskytne během těhotenství, ale po porodu nevyimzí, je také označován jako chronická hypertenze.
2. Gestační hypertenze – hypertenze vyskytující se po 20. týdnu těhotenství, která není doprovázena proteinurií. Finální určení této diagnózy je možné až po skončení těhotenství. Pokud nedošlo k rozvoji preeklampsie a krevní tlak se vrátil k normálním hodnotám do 12 týdnů po porodu, jednalo se o gestační hypertenzi.

3. Preeklampsie/eklampsie – obvykle se vyskytuje po 20. týdnu těhotenství (nebo i dříve v případě trofoblastické nemoci). Je charakterizovaná elevací krevního tlaku a proteinurií, dále se mohou vyskytovat i další klinické příznaky jako bolest hlavy, poruchy vizu, bolest břicha nebo abnormální výsledky laboratorních testů, konkrétně nízký počet krevních destiček a abnormální hodnoty jaterních enzymů.

4. Preeklampsie superponovaná na chronickou hypertenzi – jedná se o případ, kdy se preeklampsie vyskytne u žen, které byly hypertenzní již před graviditou. V tomto případě jsou prognózy pro matku i plod horší než u samotné preeklampsie nebo chronické hypertenze.

3.1.1 Preeklampsie

Preeklampsie je potenciálně nebezpečná komplikace druhé poloviny těhotenství, porodu nebo raného období po porodu, charakterizovaná hypertenzí, abnormálním množstvím bílkovin v moči a dalšími systémovými poruchami. Pro vznik preeklampsie je nutná přítomnost placenty. Preeklampsie se podílí na mateřské a novorozenecké morbiditě a mortalitě. Incidence tohoto onemocnění je ve střední Evropě 4-8 % [Bisták, 2017].

3.1.1.1 Klinické příznaky preeklampsie

Preeklampsie je onemocnění definované jako těhotenstvím podmíněná hypertenze s proteinurií a případně edémy vyskytující se po 20. týdnu těhotenství. Podle závažnosti příznaků lze preeklampsii rozdělit na mírnou a závažnou formu – hodnoceno podle kritérií ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology) [ACOG Practice Bulletins, 2002].

Mírná preeklampsie se vyznačuje hypertenzí (systolický TK ≥ 140 mmHg a/nebo diastolický TK ≥ 90 mmHg) a proteinurií (přítomnost ≥ 300 mg proteinů v moči za 24 hodin).

Závažná preeklampsie je diagnostikována tehdy, kdy je přítomno jedno nebo více z následujících kritérií:

- Systolický krevní tlak ≥ 160 mmHg a/nebo diastolický krevní tlak ≥ 110 mmHg během 2 měření v rozestupu alespoň 6 hodin, kdy je pacientka v klidovém režimu
- Proteinurie ≥ 5 g za 24 hodin
- Objem vyloučené moči za 24 hodin je menší než 500 ml (oligourie)
- Bolest hlavy, poruchy vízu
- Epigastrická bolest či bolest v pravém hypochondriu
- Plicní edém nebo cyanóza
- Abnormální hodnoty jaterních enzymů
- Trombocytopenie
- Fetální růstová restrikce

Nejzávažnější formou preeklampsie je eklampsie. Jedná se o záchvat tonicko-klonických křečí těhotné ženy navazujících na těžkou nebo superponovanou preeklampsii.

HELLP syndrom (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count) je závažnou komplikací preeklampsie se značnou mateřskou a perinatální morbiditou a mortalitou [Baxter & Weinstein, 2004]. Jedná se o stav závažné preeklampsie, který je komplikovaný hemolýzou, trombocytopenií a patologickými jaterními testy. Avšak HELLP syndrom se nemusí vyskytovat pouze v souvislosti s preeklampsií, ale také jako samostatné onemocnění, protože 15-20 % pacientek s HELLP syndromem nemá předchozí hypertenzi nebo proteinurii [Reubinoff & Schenker, 1991].

Preeklampsie může být dále rozdělena na základě manifestace klinických příznaků na časnou preeklampsii (výskyt před 34. týdnem gestace), a pozdní preeklampsii (výskyt po 34. týdnu gestace) [Poon et al, 2010; Akolekar et al, 2011].

3.1.1.2 Rizikové faktory preeklampsie

Preeklampsie se častěji vyskytuje u prvorodiček a mladých matek, u nichž se předpokládá, že se jedná o prvotní konflikt s paternálními antigeny. Stejně tak dochází ke zvýšenému výskytu tohoto onemocnění u žen, které jsou gravidní na základě darovaných pohlavních buněk nebo embryí, nebo jsou opakovaně těhotné, ovšem s jiným partnerem. Delší interval mezi porody také zvyšuje riziko

preeklampsie [Duckitt & Harrington, 2005; Tuffnell et al, 2005]. Dalšími rizikovými faktory jsou vícečetná těhotenství, preeklampsie v předchozí graviditě, chronická hypertenze, diabetes mellitus, chronické onemocnění ledvin, antifosfolipidový syndrom, obezita nebo věk nad 35 let [Musa et al, 2018]. Naopak kouření cigaret snižuje riziko vzniku preeklampsie. Podle studie Sibai a spol. měly matky, které nekouřily více jak rok před graviditou, vyšší výskyt preeklampsie (5,9 %) než ženy, které přestaly kouřit na začátku těhotenství (2,7 %) [Sibai et al, 1995].

3.1.1.3 Patogeneze preeklampsie

Preeklampsie je onemocnění, které se vyskytuje u těhotných žen. Je známo, že placenta hraje klíčovou roli v rozvoji preeklampsie. Proto také příznaky preeklampsie obvykle vymizí po porodu (odstranění placenty z těla ženy). Toto onemocnění se může vyskytnout i v případě hydatidózní moly, kdy dochází k minimálnímu nebo žádnému vývoji plodu [Zhao et al, 2016]. Ovšem může se vyskytnout i situace, kdy odstranění placenty nebylo provedeno správně a fragmenty placenty zůstaly v děloze, poté příznaky preeklampsie přetrvávají i nadále.

Preeklampsie progreduje ve 2 stádiích: (1) abnormální placentace na začátku prvního trimestru následovaná (2) mateřským syndromem na konci druhého a ve třetím trimestru charakterizovaným nadbytkem anti-angiogenních faktorů [Redman & Sargent, 2005; Romero & Chaiworapongsa, 2013].

Placentace a trofoblastická invaze do mateřské tkáně zahrnuje dva procesy. Nejprve dochází k vaskularizaci a vytvoření fetoplacentální cévní sítě. Poté dochází k migraci buněk cytotrofoblastu nebo endovaskulárního trofoblastu do mateřských spirálních artérií [Zhou et al, 2002]. Během normálního průběhu placentace vytváří buňky cytotrofoblastu extravilózní trofoblast, který migruje do děložní sliznice a napadá první třetinu myometria a spirální artérie. Extravilózní trofoblast indukuje remodelaci mateřských spirálních artérií, pravděpodobně tím, že způsobí ztrátu elastické laminy a většiny buněk hladkého svalstva a dočasně nahradí endotel těchto cév. Tím se cévy stávají nízkoodporové, vysokokapacitní a nereagují vasokonstrikčně, to umožňuje zvýšení průtoku krve, což je nezbytné pro správný růst a vývoj plodu [Zhou et al, 2002; Valenzuela et al, 2012; Bisták, 2017]. Proces, při

kterém dochází k přeměně cytotrofoblastů na buňky s endoteliálním fenotypem se nazývá pseudovaskulogeneze. Během tohoto procesu dochází ke snížení exprese adhezivních receptorů, které jsou charakteristické pro epitelové buňky a naopak se zvýší exprese adhezivních receptorů typických pro vaskulární buňky [Zhou et al, 1997]. V případě preeklampsie dochází v rané fázi těhotenství ke špatné trofoblastické invazi, která se omezuje pouze na spirální artérie přítomné v povrchové části decidua, nedostatečné remodelaci mateřských spirálních artérií, kdy cytotrofoblasty nepřijmou fenotyp vaskulární adheze [Zhou et al, 1997], a tím i k nedostatečnému zásobování placenty mateřskou krví. Nedostatek krve následně způsobuje placentární ischemii a hypoxii s lokální oxidační stresovou reakcí a omezení růstu plodu.

Správné placentární vaskularizace se účastní angiogenní faktory a jejich receptory. Mezi tyto faktory patří vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a placentární růstový faktor (PlGF). VEGF je pro-angiogenní faktor produkovaný makrofágy, T-lymfocyty, nádorovými buňkami a cytotrofoblastem, podílí se na angiogenezi a vaskulogenezi a je nezbytný pro integritu mateřských endoteliálních buněk [Alon et al, 1995]. PlGF je také produkován buňkami trofoblastu, během prvních 30 týdnů gravidity dochází u normotenzních žen ke zvyšování hladin tohoto faktoru, následně pak dochází k jeho snižování [Romero et al, 2008]. Receptory angiogenních faktorů jsou VEGFR1 a VEGFR2. VEGFR1 je znám také jako Flt-1 (Fms-podobná tyrozinová kináza 1), váže jak VEGF, tak PlGF a nachází se vázaný na buněčných membránách. Rozpustná forma Flt-1, sFlt-1, se nachází v krevní cirkulaci [Neufeld et al, 1999].

sFlt-1 je produkován syncytiotrofoblastem v důsledku alternativního sestřihu mRNA Flt-1, což vede ke zkrácení proteinu bez schopnosti vázat se na VEGF nebo PlGF uvnitř buněk. V krevním řečišti ovšem působí jako antagonist VEGF a PlGF a zabraňuje těmto růstovým faktorům navázat se na jejich membránové receptory, čímž znemožní aktivaci příslušných signálních drah [Maynard et al, 2003; Romero et al, 2008].

Dále se vaskularizace účastní endoglin. Endoglin je transmembránový glykoprotein, který je součástí komplexu TGF- β . Má pro-angiogenní aktivitu a zabraňuje apoptóze

v hypoxických endoteliálních buňkách. Jedná se o koreceptor TGF- β 1 a β 3 a je exprimovaný na buněčné membráně vaskulárního endotelu a syncytiotrofoblastu. TGF- β 1 indukuje vazbou na endoglin migraci a proliferaci endoteliálních buněk [Romero et al, 2008]. Na druhou stranu rozpustný endoglin (sEng) má anti-angiogenní účinky, protože brání vazbě TGF- β 1 na receptor na endoteliálních buňkách. sEng je indukován hypoxií a je to antagonist Eng. Vzhledem ke svým účinkům je považován za jeden z markerů preeklampsie [Venkatesha et al, 2006]. U žen s preeklampsií se vyskytují zvýšené hladiny sEng, přičemž vyšší hladiny vykazují pacientky se závažnou preeklampsií v porovnání s preeklampsií mírnou [Perucci et al, 2014].

U preeklampsie dochází ke špatné trofoblastické invazi, která má za následek nedostatek kyslíku, což způsobuje placentární produkci anti-angiogenních faktorů, jako jsou sFlt-1 nebo sEng. Tyto faktory přechází do mateřské cirkulace, což vede k endoteliální dysfunkci, hypertenzi a proteinurii. U normotenzních gravidních žen jsou hladiny sFlt-1 stabilní kolem 33. a 36. týdne a po tomto období dojde ke zvýšení sFlt-1 a snížení hladin PlGF a VEGF. U preeklampsie je pozorováno časnější a mnohem výraznější zvýšení sFlt-1 a snížení PlGF a VEGF [Lam et al, 2005]. Zvýšená hladina sFlt-1 u žen s preeklampsií byla pozorována i v dalších studiích a ke zvýšení hladin došlo několik týdnů před nástupem klinických projevů [Maynard et al, 2003; Levine et al, 2004]. Zvýšené hladiny sFlt-1 také korelují se stupněm závažnosti preeklampsie. V současné době je dostupný automatizovaný imunochemický test Elecsys® pro predikci preeklampsie, který využívá poměru sFlt-1/PlGF [Verlohren et al, 2010].

Existují důkazy o tom, že vrozená i adaptivní imunita jsou zahrnuty v patogenezi preeklampsie [Saito et al, 2007]. V průběhu normálního těhotenství nastává přechod imunitní reakce od Th-1 typu k typu Th-2, čímž dojde k upřednostnění humorální imunity a buněčná imunitní odpověď je potlačena. V případě preeklampsie se však předpokládá převaha imunitní reakce typu Th-1. Predominance Th-1 imunity nesouvisí pouze se špatnou placentací, ale také s nadměrnou zánětlivou odpovědí a endoteliální dysfunkcí pozorovanou u preeklampsie [Saito & Sakai, 2003]. Nicméně v hladinách některých cytokinů byly pozorovány kontroverzní nálezy. Kumar prokázal, že mezi 14. a 18. gestačním týdnem byly sérové hladiny TNF- α , IL-10 a

INF- γ signifikantně nižší u žen, u kterých se rozvinula preeklampsie v porovnání s ženami s normálním průběhem gravidity [Kumar et al, 2013]. V jiné studii bylo naopak prokázáno zvýšení sérových hladin IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, INF- γ a TNF- α u žen s preeklampsií ve srovnání s ženami s fyziologickou graviditou, přičemž krev byla těmto ženám nabírána mezi 36. - 37. týdnem gravidity [Szarka et al, 2010]. V další studii byly pozorovány zvýšené plazmatické hladiny TNF- α , TNFR1, IL-1 β , IL-12 a Hsp70 u žen s časným onsetem preeklampsie ve srovnání s onsetem pozdním. Naopak koncentrace IL-10 byla vyšší u pozdního onsetu preeklampsie ve srovnání s časným onsetem [Peraçoli et al, 2013].

Systém renin-angiotenzin-aldosteron také hraje roli při vzniku preeklampsie. Tento systém primárně reguluje krevní tlak, koncentraci solí a množství extracelulární tekutiny a tím zajišťuje homeostázu organismu. Renin je enzym tvořený převážně v juxtaglomerulárním aparátu v ledvinách a částečně v děloze. Renin působí jako peptidáza, která štěpí angiotenzinogen za vzniku decapeptidu angiotenzinu I. Angiotenzin I je následně konvertován na angiotenzin II pomocí angiotenzin konvertujícího enzymu. Angiotenzin II má silné vazokonstrikční účinky, čímž zvedá krevní tlak a stimuluje produkci aldosteronu v kůře nadledvin [Sparks et al, 2014]. Za signální transdukcí zodpovídají převážně receptory AT-1 a AT-2 (angiotensin II receptor 1 a 2). V průběhu normální gravidity jsou hladiny reninu a angiotenzinu několikanásobně zvýšeny, ale vazokonstrikce u těchto žen nenastává, naopak, fyziologické těhotenství je charakterizováno zvýšeným objemem plazmy a výraznou vazodilatací. Nedávné studie ukázaly, že dalším štěpením angiotenzinu II vznikne heptapeptid zvaný angiotenzin 1-7, který má svůj vlastní Mas-receptor a jehož hlavní funkcí je vazodilatace a má protizánětlivé, antiproliferační a antiangiogenní účinky. U těhotných žen byly pozorovány zvýšené hladiny angiotenzinu 1-7 v séru a v moči v porovnání s netěhotnými ženami [Merrill et al, 2002]. Naopak preeklampsie je charakterizována vazokonstrikcí a sníženým objemem plazmy v porovnání s normálním těhotenstvím [Salas et al, 2005]. V klinické fázi preeklampsie dochází ke snížení koncentrace aktivního reninu, angiotenzinu II a aldosteronu. Hladina angiotenzinu 1-7 v moči a plazmě je také snížena u žen s preeklampsií, což naznačuje, že může být narušena rovnováha mezi angiotenzinem II a angiotenzinem 1-7 a tím pádem dochází k vazokonstrikci a hypertenzi [Merrill et al, 2002]. U

preeklampsie se navíc zvyšuje vaskulární citlivost na angiotenzin II. Během normálního těhotenství je AT-1 receptor v monomerní formě, zatímco během preeklampsie se nachází v heteromerní formě spolu s receptorem pro bradykinin. Heteromerní forma AT-1 receptoru je necitlivá k inaktivaci a vysoce citlivá na vazbu angiotenzinu II [AbdAlla et al, 2001]. Proto se předpokládá, že relativně nízké hladiny angiotenzinu 1-7 v kombinaci se změnou konformace AT-1 receptoru a zvýšenou citlivostí na angiotenzin II zvýhodňují vazokonstrikci v průběhu preeklampsie. Výsledky studie Siddigui ukazují, že až u 95 % žen s preeklampsií byly detekovány autoprotilátky proti AT-1 receptoru a tyto protilátky korelují se závažností onemocnění [Siddigui et al, 2010]. Autoprotilátky proti AT-1 receptoru jsou schopné aktivovat AT-1 receptor obdobně jako angiotenzin II a tím zvyšují jeho funkci. Autoprotilátky proti AT-1 receptoru také zvyšují syntézu a sekreci inhibitoru plazminogenu (PAI-1) v buňkách trofoblastu, což vede ke snížení invazivnosti trofoblastu [Xia et al, 2003]. Tyto autoprotilátky také stimulují placentární produkci anti-angiogenních faktorů sFlt-1 a sEng [Parrish et al, 2010].

V průběhu těhotenství dochází k oxidačnímu stresu, kdy se předpokládá zvýšená placentární mitochondriální aktivita a produkce reaktivních kyslíkových radikálů, zejména superoxidového radikálu [Myatt & Cui, 2004]. Během preeklampsie pak dochází ke zvýšení úrovně oxidačního stresu [Myatt & Cui, 2004]. Preeklamptické placenty vykazují nerovnováhu mezi enzymy produkujícími reaktivní kyslíkové radikály a antioxidanty [Many et al, 2000]. Oxidační stres může také podporovat transkripci anti-angiogenních faktorů, jako například sFlt-1 [Huang et al, 2013]. Bylo také prokázáno poškození placentárních antioxidantních mechanismů během preeklampsie. U preeklamptických pacientek byla zjištěna snížená aktivita placentární superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy v porovnání s ženami s normálním průběhem těhotenství [Vaughan & Walsh, 2002]. Nicméně podle studie Postona a jeho týmu podávání antioxidantů (vitamínů E a C) nezabránilo vzniku preeklampsie u rizikových pacientek a navíc došlo v této skupině žen k nárůstu počtu dětí, které se narodily s nízkou porodní hmotností [Poston et al, 2006].

V patogenezi preeklampsie se může uplatňovat i hemoxygenáza. Jedná se o enzym, který katalyzuje oxidaci porfyrinového kruhu vázaného na protein (v rámci tvorby bilirubinu). Dochází přitom k uvolnění železa z hemu a vzniku oxidu

uhelnatého. Hemoxygenáza je upregulována ve stavech hypoxie a ischemie, přičemž její produkt (CO) působí jako vazodilatátor a snižuje tlak v placentě [Bainbridge et al, 2002; Lyall et al, 2000]. Hemoxygenáza je exprimována trofoblasty a ukázalo se, že její inhibice vede ke špatné invazi trofoblastů *in vitro* [McCaig & Lyall, 2009]. To potvrzují i snížené hladiny hemoxygenázy, které byly nalezeny u pacientek s preeklampií [Barber et al, 2001; Dulak et al, 2008; Zhao et al, 2009]. Naopak zvýšená genová exprese hemoxygenázy snižuje hladiny sFlt-1 a sEng [Cudmore et al, 2007]. U kuřáček cigaret byly zjištěny zvýšené hladiny CO, což může vysvětlit, že kouření cigaret poskytuje určitou ochranu před preeklampií [Cudmore et al, 2007; Sidle et al, 2007; Conde-Agudelo et al, 1999].

Předpokládá se, že v průběhu preeklampsie dochází také k narušení systému oxid dusnatý/syntáza oxidu dusnatého. NO je silný vazodilatátor a v průběhu preeklampsie byly pozorovány snížené hladiny tohoto plynu a zvýšené hladiny arginázy, která degraduje prekurzorovou molekulu v dráze syntézy NO [Lowe, 2000; Dai et al, 2013; Sankaralingam et al, 2010]. Nedostatek NO koreluje s metabolickými poruchami pozorovanými u preeklampsie, jako je hypertenze, proteinurie, snížená rychlost glomerulární filtrace a agregace destiček [Lowe, 2000].

Systém generující sulfan (H_2S) je také zapojen do patogeneze preeklampsie. H_2S je plynná signální molekula, která má vazodilatační, cytoprotektivní a angiogenní vlastnosti. Sulfan je tvořen třemi enzymy - cystathionin γ -lyázou, cystathionin β -syntázou a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou [Zhao et al, 2001]. U žen s preeklampií byly zjištěny snížené hladiny plazmatického H_2S , což mělo souvislost se sníženou expresí cystathionin γ -lyázy v placentě. Wang se svým týmem předpokládá, že snížení aktivity cystathionin γ -lyázy může změnit angiogenní rovnováhu v těhotenství a vyvolat abnormální placentaci a mateřskou hypertenzi [Wang et al, 2013]. U pacientek s časným onsetem preeklampsie byla zase pozorována downregulace genové exprese cystathionin β -syntázy [Holwerda et al, 2012]. Zdá se, že H_2S také moduluje hladiny sFlt-1 a sEng. Byl proveden experiment, kde byl potkanům injikován adenovirus nadměrně exprimující sFlt-1. Tito potkani pak byli ošetřeni NaHS (donor H_2S) a vykazovali snížené hladiny sFlt-1 v séru a zvýšené sérové hladiny VEGF. Klinicky tyto potkani vykazovali sníženou proteinurii, hypertenzi a menší glomerulární poškození [Holwerda et al, 2014].

3.1.1.4 Diagnostika a predikce preeklampsie

V dnešní době se využívá k diagnostice preeklampsie měření krevního tlaku a proteinurie. Stanovení závažnosti preeklampsie zahrnuje posouzení i dalších nespecifických symptomů, jako je bolest hlavy, poruchy vize, epigastrická bolest a zvracení nebo snížené pohyby plodu a výskyt fetální růstové restrikce. Dále se doporučují další vyšetření, jako je např. Dopplerovská ultrasonografie. Nicméně diagnostika je možná až po propuknutí onemocnění. Proto je snaha o nalezení prediktivních markerů, které by byly schopny predikovat preeklampsii několik týdnů před jejím nástupem, optimálně v prvním trimestru gravidity. Ženám se zvýšeným rizikem pozdějšího výskytu preeklampsie by tak mohla být preventivně podávána nízká dávka kyseliny acetylsalicylové (Aspirin), která rizika preeklampsie, fetální růstové restrikce a předčasného porodu snižuje.

Aby určitý analyt mohl sloužit jako prediktivní marker, měl by splňovat několik kritérií. Detekce markeru musí být možná pomocí neinvazivních diagnostických metod, které mají vysokou specificitu a dostatečnou senzitivitu pro studované onemocnění. Detekce markeru musí být možná ještě před nástupem klinických projevů onemocnění. Hodnoty daného markeru musí odrážet progresi onemocnění nebo se v průběhu terapie měnit. Vhodná je také snadná měřitelnost markeru a finanční nenáročnost používané metody.

V dnešní době již existuje několik biochemických markerů, které by mohly sloužit nebo již slouží jako rutinní prediktivní markery pozdějšího rozvoje onemocnění, a to již v prvním trimestru těhotenství.

PAPP-A (Pregnancy-associated protein A)

PAPP-A je glykoprotein syntetizovaný v placentě buňkami trofoblastu, který je testován jako biochemický marker už řadu let [Westergaard et al, 1983]. PAPP-A funguje jako proteáza IGFBP-4, čímž zvyšuje mitogenní funkci IGF, a tím podporuje růst [Oxvig, 2015]. Během těhotenství se plazmatická koncentrace PAPP-A zvyšuje. V současné době se tento glykoprotein používá v kombinaci s lidským choriongonadotropinem (β -hCG) a měřením nuchální translucence jako skriningový test pro trisomii 21. 18. a 13. chromozomu v gestačních týdnech 11+0 – 13+6

[Kagan et al, 2008]. U plodů s normálním karyotypem byly snížené hladiny PAPP-A (pod 5. percentil) v prvním trimestru spojeny se zvýšeným rizikem preeklampsie, fetální růstové restrikce, SGA nebo předčasného porodu [Ranta et al, 2011; Smith et al, 2002]. PAPP-A lze využít jako prediktivní marker pro preeklampsii, ale jeho prediktivní schopnost je velmi nízká, zhruba 10-20 %, pokud je použit jako samostatný marker [Odibo et al, 2011; Poon et al, 2009]. V kombinaci s Dopplerovskou ultrasonografií je PAPP-A biochemickým markerem preeklampsie s mírou predikce až 70 % a falešnou pozitivitou 5 % [Odibo et al, 2011; Poon et al, 2009].

Fetální hemoglobin a α 1-mikroglobulin

Současné studie naznačují, že volný, extracelulární fetální hemoglobin (HbF) je zapojen do patogeneze preeklampsie. Kromě toho α 1-mikroglobulin se podílí na fyziologické obraně proti extracelulárnímu fetálnímu hemoglobinu. Jejich koncentrace v mateřském séru nebo plazmě lze použít jako časný prediktivní biochemický marker preeklampsie, který má slibné výsledky [Anderson et al, 2011]. Anderson se svým týmem provedl studii, ve které sledoval sérové koncentrace extracelulárního fetálního hemoglobinu a α 1-mikroglobulinu u 96 pacientek v 10. - 16. týdnu gestace, z nichž 60 následně rozvinulo preeklampsii. Sérové koncentrace extracelulárního fetálního hemoglobinu a α 1-mikroglobulinu byly významně zvýšeny u žen, které následně rozvinuly preeklampsii. Při kombinaci těchto dvou markerů byla získána 69% sensitivita při 5% falešné pozitivitě [Anderson et al, 2011].

PP13 (Placentární protein 13)

PP13 je produkován buňkami trofoblastu a podílí se na implantaci a remodelaci mateřských spirálních artérií. Při normálním průběhu těhotenství se sérové hladiny PP13 pomalu zvyšují s progresí gravidity. Několik studií prokázalo sníženou hladinu PP13 v séru v prvním trimestru u žen, u kterých se následně rozvinula preeklampsie. PP13 je markerem především závažné preeklampsie a HELLP syndromu a skrínigový potenciál lze výrazně zvýšit jeho kombinací s jinými biomarkery [De Villiers et al, 2017]. Při kombinaci sérového PP13 a Dopplerovské ultrasonografie

v prvním trimestru těhotenství lze získat až 90% sensitivitu při 6% falešné pozitivitě pro predikci časného onsetu preeklampsie [Nicolaidis et al, 2006]. Nicméně různé studie uvádí různé predikční schopnosti PP13 v prvním trimestru gravidity.

sFlt-1 (solubilní Fms-podobná tyrozinová kináza 1) a sEng (solubilní endoglin)

sFlt-1 a sEng jsou faktory související s angiogenezí. Oba tyto plazmatické faktory jsou zvýšené u žen s preeklampsií ve srovnání se zdravými kontrolami. Zvýšenou hladinu sFlt-1 lze pozorovat už před nástupem klinických příznaků preeklampsie a hladina koreluje s časem onsetu preeklampsie a částečně se závažností onemocnění. Časný nástup preeklampsie vykazuje vyšší hladiny sFlt-1 [Wikströmet al, 2007; Cui et al, 2018]. V současné době se sFlt-1 využívá k predikci preeklampsie v kombinaci s placentárním růstovým faktorem. Nízký poměr sFlt-1/PIGF (< 38) předpovídá absenci preeklampsie v následujícím týdnu s negativní prediktivní hodnotou 99,3 % [Zeisler et al, 2016]. Solubilní endoglin je také studován jako marker preeklampsie [Cui et al, 2018]. Při použití sEng v kombinaci s Dopplerovskou ultrasonografií a PIGF byla míra predikce pro časný onset preeklampsie 77,8 % při 5% falešné pozitivitě [Foidart et al, 2010].

PIGF (placentární růstový faktor)

PIGF je pro-angiogenní faktor, jehož sérové hladiny narůstají v průběhu prvních dvou trimestrů, a pak postupně klesají s blížícím se koncem těhotenství. U žen s preeklampsií byl zjištěn pokles hladiny PIGF ve srovnání s ženami s fyziologickým průběhem gestace, a to už na konci prvního trimestru [Akolekar et al, 2008]. Nejlepších prediktivních výsledků má kombinace poměru pro-angiogenního PIGF a anti-angiogenního sFlt-1. Poměr sFlt-1/PIGF je možné využít k odlišení preeklampsie nebo HELLP syndromu od jiných hypertenzních poruch (GH, chronická hypertenze) nebo od normotenzních žen. Poměr sFlt-1/PIGF také roste se závažností preeklampsie, proto ho lze použít pro zhodnocení závažnosti tohoto onemocnění [Verlohren et al, 2012; Zeisler et al, 2016]. V současné době je dostupný automatizovaný imunochemický test Elecsys® k detekci poměru sFlt-1/PIGF [Verlohren et al, 2010]. Prospektivní studie PROGNOSIS zjišťovala hraniční hodnoty poměru sFlt-1/PIGF pro predikci rozvoje preeklampsie u jednočetných

gravidit. Tato studie si dala za cíl prokázat, že nízký poměr sFlt-1/PIGF predikuje absenci preeklampsie do 1 týdne a naopak vysoký poměr sFlt-1/PIGF predikuje rozvoj preeklampsie do 4 týdnů. Tato studie probíhala na 30 studijních místech a účastnilo se jí 1050 žen. PROGNOSIS validovala použití Elecsys® testů, které jsou dostupné v rutinních laboratořích. Z výsledků této studie vyplývá klinicky použitelná cut-off hodnota 38 a výsledky dále poukazují na to, že při sFlt-1/PIGF < 38 je negativní prediktivní hodnota 99,3 %, se senzitivitou 80 % a specificitou 78,3 %. Pozitivní prediktivní hodnota při sFlt-1/PIGF > 38 činí 36,7 %, se senzitivitou 66,2 % a specificitou 83,1 % [Zeisler et al, 2016].

Cystatin C

Cystatin C patří do rodiny inhibitorů cysteinových proteáz a je široce používaný klinickými lékaři jako citlivý marker funkce ledvin a pro odhad glomerulární filtrace. Hladina cystatinu C v plazmě těhotných žen se u preeklampsie zvyšuje a studie ukazují, že by hladina cystatinu C mohla být spolehlivým diagnostickým markerem preeklampsie [Bellos et al, 2019; Strevens et al, 2007]. Podle studie Wattanavaekina může sérová hladina cystatinu C předpovídat předčasný porod u závažné formy preeklampsie [Wattanavaekin et al, 2018]. Předpokládá se, že zvýšené hladiny cystatinu C jsou způsobeny narušenou funkcí ledvin a/nebo zvýšenou syntézou v placentě [Kristensen et al, 2007]. Při predikci preeklampsie může být cystatin C užitečný v kombinaci s jinými markery a Dopplerovskou ultrasonografií [Thilaganathan et al, 2010].

Extracelulární nukleové kyseliny

Cirkulující extracelulární nukleové kyseliny (DNA, mRNA, mikroRNA, lncRNA) v plazmě a séru představují potenciální biomarkery se slibnými klinickými aplikacemi v různých lékařských odvětvích, včetně prenatalní diagnostiky. Objev fetálních buněk a později extracelulární fetální DNA v mateřské krvi [Lo et al, 1997] otevřel novou perspektivu na poli neinvazivní prenatalní diagnostiky [Maron & Bianchi, 2007]. Nejvýznamnějším zdrojem fetálních nukleových kyselin jsou apoptotická tělíska placentárního trofoblastu, která se uvolňují do mateřské cirkulace při remodelaci placenty v důsledku apoptózy a během normálního průběhu

těhotenství dochází k narůstání hladin volné fetální DNA s gestačním věkem [Alberry et al, 2009]. Vzhledem k tomu, že při placentární insuficienci dochází k nadměrnému uvolňování apoptotických tělísek trofoblastu, tak dochází i ke zvýšenému výskytu fetálních nukleových kyselin v krvi matky [Sifakis et al, 2009]. Dalším zdrojem cirkulujících nukleových kyselin jsou exozomy. Exozomy jsou bioaktivní váčky o průměru 30-100 nm, které se vyskytují v téměř všech tělních tekutinách (včetně krevní plazmy). Během těhotenství placentární buňky (cytotrofoblasty a syncytiotrofoblasty) uvolňují již od 6. týdne exozomy, které se následně dostávají do mateřské cirkulace. Placentou produkované exozomy obsahují specifické proteiny a nukleové kyseliny, na základě kterých je lze odlišit od exozomů produkovaných jinými buňkami. Exozomy placentárního původu obsahují mikroRNA, které se nacházejí v mateřské cirkulaci, jsou také studovány jako možné prediktivní markery preeklampsie. Byla pozorována vyšší koncentrace celkových a placentárních exozomů u presymptomatických žen, které následně vyvinuly preeklampsii ve srovnání se zdravými těhotnými kontrolami [Salomon et al, 2017]. První studii o kvantitativních změnách extracelulární fetální DNA v mateřské plazmě u žen s preeklampsií provedl Lo se svým týmem [Lo et al, 1999]. Následné studie také prokázaly zvýšené hladiny extracelulární fetální DNA u žen s preeklampsií ve srovnání s normálním průběhem těhotenství. Leung se svým týmem pozorovaly zvýšené hladiny fetální DNA v mateřské plazmě u žen (11-22. týden gestace), které následně rozvinuly preeklampsii [Leung et al, 2001]. Vyšší hladiny fetální DNA byly také zaznamenány u pacientek se závažnou preeklampsií ve srovnání s pacientkami s preeklampsií mírnou [Alberry et al, 2009]. Obdobně jako extracelulární fetální DNA, tak i fetální mRNA se nachází v mateřské cirkulaci, a může být použita při neinvazivní prenatalní diagnostice. Ng se svým týmem prokázal, že se hladiny placentárně specifické mRNA, kódující kortikoliberin, zvyšují u pacientek s preeklampsií [Ng et al, 2003]. V současnosti se studium predikce preeklampsie soustřeďuje také na mikroRNA biomarkery. MikroRNA jsou krátké (22-24 nukleotidů dlouhé) nekódující RNA, které se podílejí na regulaci genové exprese. Ukazuje se, že už na konci prvního trimestru dochází k upregulaci některých mikroRNA v mateřské cirkulaci žen, které v průběhu těhotenství vyvinou preeklampsii [Hromadnikova et al, 2017; Winger et al, 2018]. Také byla pozorována downregulace placentárně specifických C19MC mikroRNA (miR-517-5p, miR-

520a-5p, miR-525-5p) nacházejících se v plazmatických exozomech u žen na konci prvního trimestru, které následně vyvinuly preeklampsii ve srovnání s ženami s fyziologickým průběhem těhotenství [Hromadnikova et al, 2019]. V průběhu preeklampsie dochází také k dysregulaci dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). LncRNA jsou dlouhé (více jak 200 nukleotidů) nekódující RNA, které hrají důležitou roli v patogenezi různých onemocnění. V poslední době několik studií prokázalo abnormální expresi lncRNA v preeklamptických placentách, což naznačuje, že lncRNA mohou hrát roli v patogenezi preeklampsie. Současné studie ukazují jak upregulaci (MIR503HG, NR_002794) [Ma et al, 2019; Cheng et al, 2019], tak downregulaci (PVT1) [Wang et al, 2019] dlouhých nekódujících RNA v buňkách trofoblastu u pacientek s preeklampií.

3.1.1.5 Léčba preeklampsie

Postup při léčbě preeklampsie se liší podle závažnosti onemocnění [Měchurová & Andělová, 2013]. Při potvrzení diagnózy mírné preeklampsie je indikováno nasazení antihypertenzní terapie, a to již při zvýšení hodnot krevního tlaku nad 140/90 mmHg. Používají se perorální antihypertenziva, která jsou bezpečná pro gravidní ženy. Lékem první volby je methyldopa, ale lze využít i další léčiva, např. metoprolol, pindolol, acebutolol, labetalol, isradipin nebo amlodipin. Na základě klinických symptomů a laboratorních výsledků je možné i ambulantní sledování pacientek s mírnou preeklampií. Při progresi preeklampsie je doporučováno časně ukončení gravidity [Měchurová & Andělová, 2013].

Pacientky se závažnou formou preeklampsie jsou vždy indikovány k hospitalizaci a léčbě. Cílem léčby je postupné snížení krevního tlaku do pásma bezpečného pro matku i plod (systolický tlak krve je držen v rozmezí hodnot 140-160 mmHg a diastolický krevní tlak v rozmezí 90-105 mmHg). Při léčbě závažné preeklampsie se většinou využívají intravenózní aplikace léků. Lékem první volby je labetalol nebo hydralazin. Při hypertenzní krizi lze použít urapidil, nikardipin nebo nitroprusid sodný. Důležitou součástí léčby závažné preeklampsie je podání antikonvulziva (např. intravenózní podání MgSO₄). Ženám se závažnou formou preeklampsie, které se nachází mezi 24. a 34. týdnem těhotenství je podávána antenatální kortikosteroidní léčba. Vzhledem k tomu, že plod bývá ohrožen nedostatečnou funkcí placenty, je

důležité sledování stavu plodu pomocí ultrazvuku a kardiokografu. Při zjištění těžké poruchy průtoku krve placentou nebo z vitální indikace matky je nutné předčasné ukončení těhotenství [Měchurová & Andělová, 2013].

3.2 Fetální růstová restrikce

Fetální růstová restrikce je častou těhotenskou komplikací, která souvisí s řadou nepříznivých perinatálních a postnatálních komplikací, mezi které patří například narušení neurologického a kognitivního vývoje nebo kardiovaskulární a endokrinní poruchy. K omezení růstu plodu dochází, když plod nedosáhne svého nitroděložního růstového potenciálu. Tato komplikace postihuje zhruba 5-10 % těhotenství a je to druhá nejčastější příčina novorozenecké úmrtnosti. Termín fetální růstová restrikce je používán k popisu plodů s odhadovanou hmotností menší než 10. percentil pro daný gestační věk, která je často spojena s placentární insuficiencí. [ACOG Practice Bulletin No. 204: Fetal Growth Restriction, 2019]. Nevýhodou této definice je, že nezohledňuje růstový potenciál plodu. U konstitučně malých plodů může vést k nesprávné diagnóze fetální růstové restrikce a naopak použití této definice selhává u větších plodů, které ale nedosáhly svého růstového potenciálu. V literatuře se také často setkáváme s pojmem SGA (small for gestational age), tedy plody malými vzhledem ke svému gestačnímu stáří. Skupina SGA zahrnuje plody, které mají hmotnost pod 10. percentilem pro daný gestační věk, ale jedná se o zdravé, konstitučně malé plody, které mají nižší riziko postnatálních komplikací. Pro odlišení FGR od SGA plodů se využívá Dopplerovské ultrasonografie, vyšetření průtoků v *arteria cerebri media*, *arteria umbilicalis*, *arteria uterina* a *ductus venosus*. U plodů s fetální růstovou restrikcí jsou zaznamenány abnormální průtoky ve výše zmíněných tepnách nebo v *ductus venosus*.

3.2.1 Etiologie fetální růstové restrikce

Fyziologický růst plodu závisí na mnoha faktorech. Vyžaduje adekvátní přísun kyslíku, živin a dalších potřebných látek z krve matky přes placentu do krevního oběhu plodu. Neméně důležitým předpokladem je normální endokrinní signalizace řídící růst plodu a placenty. Velkou roli také hrají faktory vnějšího prostředí. Z tohoto důvodu existuje také velká škála faktorů, které se mohou podílet na vzniku

fetální růstové restrikce plodu. Základními příčinami vzniku fetální růstové restrikce jsou mateřské, fetální a uteroplacentární faktory [Hendrix & Berghella, 2008].

Nejobsáhlejší skupinou faktorů jsou mateřské faktory. Zdravotní stav matky zásadně ovlivňuje růst a vývoj plodu, proto jakékoliv chronické onemocnění matky může zapříčinit FGR nebo SGA. Příkladem mohou být hypertenzní onemocnění v graviditě (např. preeklampsie), antifosfolipidový syndrom, diabetes mellitus, onemocnění ledvin, kardiovaskulární choroby, autoimunitní onemocnění (např. systémový lupus erythematosus) [Xiong et al, 1999; Cunningham et al, 1990]. Růst plodu dále ovlivňuje užívání návykových látek (tabák, alkohol, drogy) [Shu et al, 1995], špatná výživa gravidních žen nebo nízké BMI před otěhotněním. Negativní vliv na růst plodu mají také některé léky užívané během gravidity (např. warfarin, cyklofosfamid) nebo infekční choroby matky (např. malárie, cytomegalovirus, toxoplazmóza, zarděnky, syfilis) [Pereira et al, 2014].

Fetální faktory způsobující růstovou restrikci zahrnují určité chromozomální abnormality (např. trisomie 13., 18. a 21. chromozomu, Turnerův syndrom), strukturální malformace (vrozené srdeční vady plodu, gastroschíza, defekty neurální trubice), genetické abnormality a syndromy (Bloomův syndrom, Silverův-Russellův syndrom). Dalším rizikovým faktorem nízké porodní váhy jsou vícečetná těhotenství, přičemž se zvyšujícím se počtem plodů v děloze stoupá riziko FGR. Monochoriální dvojčata jsou navíc ohrožena růstovou restrikcí kvůli nerovnoměrnému sdílení placenty a fetó-fetální transfuzi [Denbow et al, 2000].

Mezi uteroplacentární faktory patří abnormální placentace, která způsobuje zhoršený průtok krve placentou. Abnormální placentace je nejčastější patologie způsobující fetální růstovou restrikci. Dalšími faktory jsou poruchy placenty (abrupce, infarkty, hemangiom, chorioangiom) a pupečníku (jediná *arteria umbilicalis*, velamentózní úpon pupečníku).

3.2.2 Klasifikace FGR

Normální růst plodu zajišťují 2 procesy – hyperplázie a hypertrofie. V prvních 16 týdnech je růst plodu zajištěn hyperplázií, tedy zmnožením počtu buněk. V období

mezi 16. - 32. týdnem těhotenství existuje souběžná fáze hyperplázie a hypertrofie (zvětšení velikosti buněk) a od 32. týdne se na růstu novorozence podílí buněčná hypertrofie s rychlým nárůstem velikosti buněk. Tento model normálního růstu plodu je základem pro klinickou klasifikaci FGR.

Na základě poměru obvodu hlavy/obvodu břicha lze rozlišit plody symetrické neboli proporcionálně malé plody a plody asymetrické, tzn. plody s neúměrně pomalejším růstem obvodu břicha [Boito et al, 2002]. Z tohoto hlediska lze fetální růstovou restrikcí rozdělit na 3 typy. Typ I zahrnuje plody symetrické, tyto plody vykazují proporcionální zmenšení velikosti hlavy a břicha. Z hlediska rozvoje CNS je symetrická forma FGR horší než asymetrická. Etiologické faktory ovlivňují průběh růstu těchto plodů v rané fázi, během fáze buněčné hyperplázie. Typ II je charakterizován pozdním nástupem změn v růstu, obvykle po 30. nebo 32. týdnu těhotenství, ve fázi buněčné hypertrofie. Obvod hlavy a délka stehenní kosti jsou obvykle méně ovlivněny a odpovídají gestačnímu věku. Nicméně obvod břicha je vážně ovlivněn a snižuje odhadovanou hmotnost plodu. Tyto plody jsou asymetrické a výrazně dystrofické, hlavním etiologickým faktorem je placentární insuficience. Typ III zahrnuje plody, u kterých ke změně růstu dochází ve druhém trimestru, kdy nastává fáze hyperplázie i hypertrofie. Jedná se o typ, který zahrnuje spojení předchozích mechanismů (typ I a typ II) a plody vykazují hypotrofický vzhled. Etiologie je asociovaná s fetálními infekcemi, jako je cytomegalovirus, toxoplazmóza nebo zarděnky, užíváním drog nebo některých léčiv.

Další možností klasifikace FGR je dělení na základě onsetu růstové restrikce. V roce 2016 byla stanovena hranice mezi časnou a pozdní formou FGR na 32. týden [Gordijn et al, 2016]. Časná fetální růstová restrikce postihuje plody před dokončeným 32. týdnem. U plodů s časnou formou FGR dochází ke změně v placentární implantaci (primární placentární insuficience), která často vede ke zvýšené rezistenci v *arteria uterina* a ke zvýšenému riziku rozvoje preeklampsie. Výsledná fetální hypoxie vyžaduje kardiovaskulární adaptaci plodu. Jako obranný mechanismus vykazuje plod vysokou toleranci k nízkým hladinám kyslíku a hypoxémii. Časná FGR musí být řešena ve většině případů předčasným ukončením těhotenství, což je spojeno s vysokou mortalitou i morbiditou. Pozdní forma fetální růstové restrikce se objevuje po 32. týdnu těhotenství a je zpravidla asociovaná se

sekundární placentární insuficienci. Vzhledem k tomu, že hypoxie plodu není tak vysoká jako u časně formy FGR, vyžaduje pozdní FGR menší kardiovaskulární adaptaci plodu. Na druhou stranu je míra tolerance k hypoxii nižší než u časně FGR [Figueras & Gratacos, 2014].

Podle konsenzu klasifikace a diagnostiky z roku 2016 je časný onset FGR diagnostikován u těhotenství před dokončeným 32. týdnem, pokud: odhadovaná hmotnost plodu a/nebo abdominální obvod je menší než 3. percentil nebo je zaznamenán nulový a/nebo reverzní tok v *arteria umbilicalis*. Další možnost pro klasifikaci a diagnostiku časně formy FGR je přítomnost dvou z následujících 3 parametrů: 1) odhadovaná hmotnost plodu a/nebo abdominální obvod je menší než 10. percentil, 2) abnormální index pulsatility v *arteria umbilicalis* ($> 95.$ percentil pro daný gestační věk), 3) abnormální index pulsatility v *arteria uterina* ($>95.$ percentil pro daný gestační věk). Pozdní onset FGR je diagnostikován u těhotenství po 32. týdnu, pokud: odhadovaná hmotnost plodu a/nebo abdominální obvod je menší než 3. percentil. FGR s pozdním nástupem lze také klasifikovat a diagnostikovat, pokud jsou přítomny dva z následujících tří parametrů: 1) odhadovaná hmotnost plodu a/nebo abdominální obvod je menší než 10. percentil, 2) růst plodu je menší o 2 kvartily v průběhu monitorování plodu, 3) známky centralizace krevního oběhu plodu (CPR $< 5.$ percentil pro daný gestační věk) [Gordijn et al, 2016]. U pozdní FGR se často vyskytuje i abnormální index pulsatility v *arteria cerebri media* ($< 5.$ percentil pro daný gestační věk).

3.2.3 Dopplerovská ultrasonografie

Pro správné zhodnocení růstu plodu je nutné znát přesné gestační stáří. Odhad gestačního stáří na základě posledního menstruačního cyklu je značně nespolehlivý, a proto se pro přesnější určení stáří plodu využívá ultrazvuk – měření zárodečného terčíku, temenokostrční délky, temenopatní délky. Pro váhový odhad plodu pomocí ultrazvuku se využívá měření obvodu hlavičky a břicha, biparietálního průměru a délky stehenní kosti. Průtokové parametry v *arteria umbilicalis*, *arteria uterina* a *arteria cerebri media* se měří pomocí Dopplerovské ultrasonografie. Dopplerovská ultrasonografie umožňuje neinvazivní detekci příznaků placentární insuficience a fetálních hemodynamických změn, ke kterým dochází během hypoxie. Pomocí této

metody lze odlišit plody s fetální růstovou restrikcí od plodů malých vzhledem ke svému gestačnímu stáří.

Index pulsatility v *arteria uterina* hraje klíčovou roli v diagnostice abnormální placentace. Nedávný konsenzus potvrdil význam hodnocení indexu pulsatility (PI) v *arteria uterina*, zejména v případech časně fetální růstové restrikce. Abnormální hodnoty indexu pulsatility v *arteria uterina* se nacházejí nad 95. percentilem pro dané gestační stáří [Gordijn et al, 2016].

Index pulsatility v *arteria umbilicalis* odráží placentární vaskulární rezistenci, která silně koreluje s placentární insuficiencí. Během normálního těhotenství dochází s rostoucí délkou gestace k narůstání diastolického průtoku v *arteria umbilicalis*, a tím postupně klesá rezistence. V případě placentární nedostatečnosti dochází ke zvýšení vaskulární rezistence, což se projeví poklesem diastolického průtoku krve a dojde ke zvýšení PI. Abnormální hodnoty PI se nachází nad 95. percentilem pro dané gestační stáří. Nulový nebo reverzní diastolický tok v *arteria umbilicalis* znamená těžkou placentární insuficiencí spojenou s vyšší perinatální morbiditou a mortalitou.

V případě mozkové cévy *arteria cerebri media* dochází v případě redistribuce krevního oběhu ke snížení vaskulární rezistence, zvýšení diastolického toku krve a snížení indexu pulsatility. Abnormální hodnoty PI v *arteria cerebri media* se nachází pod 5. percentilem pro dané gestační stáří.

CPR, neboli cerebroplacentární poměr, je udáván jako poměr indexu pulsatility v *arteria cerebri media* a *arteria umbilicalis*. Jedná se o matematické vyjádření míry centralizace oběhu plodu. Centralizace krevního oběhu plodu znamená, že jsou krví přednostně zásobeny životně důležité orgány, jako mozek, srdce a nadledviny na úkor ostatních orgánů. Tento poměr má lepší prediktivní hodnotu pro hypoxii plodu než samostatné průtoky v obou tepnách [DeVore, 2015]. Abnormální hodnoty CPR se nachází pod 5. percentilem pro daný gestační věk.

Abnormální průtoky v *ductus venosus* jsou přítomny v závažných případech FGR a jsou důkazem hrozícího srdečního selhání a antenatálního úmrtí plodu. Snížená nebo reverzní vlna „a“ v *ductus venosus* je důkazem sníženého nebo protisměrného toku

při systole síní, zatímco pulzace v umbilikální véně jsou obrazem zvýšeného centrálního žilního tlaku [Seravalli, 2016].

3.3 Předčasný porod

Předčasný porod představuje jeden z hlavních důvodů novorozenecké mortality a nejčastějším důvodem pro prenatální hospitalizaci. Postihuje okolo 6-12 % těhotných žen, v závislosti na geografických a demografických aspektech. V rozvojových zemích je vyšší procento výskytu předčasných porodů než v zemích rozvinutých. V České republice se incidence předčasných porodů pohybuje dlouhodobě kolem 8 % [Kacerovský et al, 2017a]. Jedná se o jakékoliv ukončení těhotenství před dokončeným 37. týdnem těhotenství. K předčasnému porodu dochází nástupem děložní činnosti (40-45 % všech předčasných porodů), předčasným odtokem plodové vody (25-30 % všech předčasných porodů) nebo iatrogenně z důvodů závažné zdravotní komplikace u matky nebo plodu (30-35 % všech předčasných porodů). Předčasné porody můžeme rozdělit z hlediska týdnu porodu na 3 podkategorie: extrémně předčasný porod – porod před nebo v průběhu 27. týdne, velmi předčasný porod – porod mezi 28-31. týdnem těhotenství a mírně předčasný porod – porod mezi 32-36. týdnem gestace. Práh viability z hlediska možnosti narodit se živě a přežít leží v současnosti mezi 22–23. týdnem. Období 22–25. týdne těhotenství je neonatologie označováno jako „šedá zóna“ s nejistou prognózou mortality či morbidity [Göthová, 2013].

3.3.1 PPRM

Předčasný odtok plodové vody (PROM, Premature Rupture of Membranes) je charakterizován jako porušení plodových obalů s odtokem plodové vody alespoň 1 hodinu před nástupem pravidelné děložní činnosti. Pokud k odtoku plodové vody dojde před dokončeným 37. týdnem gestace, jedná se o předčasný odtok plodové vody před termínem (PPROM) [ACOG Practice Bulletins, 2018]. S předčasným odtokem plodové vody se pojí termín „latence“, což je doba od ruptury plodových obalů do porodu. Podle gestačního věku se PPRM dělí na časný PPRM (24-34. týden gestace) a pozdní PPRM (34-37. týden gestace).

3.3.1.1 Patofyziologie PPRM

Předčasný odtok plodové vody má multifaktoriální patofyziologii. Důležitou roli v etiologii PPRM hraje infekce v choriodeciduálním prostoru nebo mikroby indukovaný intraamniální zánět. Mikroby indukovaný intraamniální zánět (MIAC, Microbial Invasion of the Amniotic Cavity) způsobují převážně genitální mykoplazmata, zejména *Ureaplasma parvum* a *Ureaplasma urealyticum*. Tato komplikace postihuje přibližně 30 % těhotenství s PPRM [Yoon et al, 1998a; Yoon et al, 1998b]. Výskyt MIAC je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím lokální zánětlivou odpověď, která se vyznačuje zvýšenou hladinou IL-6 a IL-8 v plodové vodě [Kacerovsky et al, 2015]. V klinické praxi se k diagnostice intraamniálního zánětu používá vyšetření vzorku plodové vody, který se odebírá transabdominálně nebo vaginálně.

Dalším mechanismem spjatým s rozvojem PPRM je snížení obsahu kolagenu v plodových obalech. Kolagen v plodových obalech klesá se vzrůstajícím gestačním věkem jak u fyziologických gravidit, tak u PPRM, nicméně u pacientek s předčasným odtokem plodové vody byl zjištěn menší obsah kolagenu než u žen s normálním průběhem těhotenství [Skinner et al, 1981]. Tuto teorii podporuje i fakt, že v plodové vodě byly nalezeny zvýšené hladiny matrixových metaloproteináz (1, 8 a 9) a snížené hladiny tkáňového inhibitoru metaloproteináz (1 a 2). Nerovnováha mezi matrixovými metaloproteinázami a tkáňovým inhibitorem metaloproteináz v plodové vodě může odrážet poruchu, která podporuje předčasné porušení membrán [Vadillo-Ortega et al, 1996].

Dále se na rozvoji PPRM může podílet defekt plodových obalů, nadměrné rozpětí plodových obalů nebo senescence a apoptóza buněk plodových obalů.

Také existuje mnoho rizikových faktorů, které zvyšují pravděpodobnost výskytu předčasného odtoku plodové vody. Jedná se o rizikové faktory mateřské, uteroplacentární a fetální. Mateřské faktory zahrnují: výskyt PPRM nebo předčasného porodu v minulé graviditě, kouření cigaret, abusus kokainu, sexuálně přenosné infekce, krvácení v průběhu těhotenství, chronická terapie kortikosteroidy, onemocnění pojivové tkáně, nízký socioekonomický status rodičky nebo nízký body

mass index. Mezi uteroplacentární rizikové faktory se řadí: abrubce placenty, konizace, cervikální insuficience, nadměrná distenze dělohy, anomálie dělohy, mikroby indukovaný intraamniální zánět nebo fetální růstová restrikce. Fetální rizikové faktory zahrnují vícečetná těhotenství nebo abnormální množství plodové vody. Jak je vidět, příčin vzniku PPROM je mnoho a některým z nich lze předejít. Důležité je včasné odhalení rizikových faktorů a intenzivní péče o vysoce riziková těhotenství.

3.3.1.2 Diagnostika PPROM

Důležitým krokem v diagnostice předčasného odtoku plodové vody je získání anamnestického údaje o odtoku plodové vody. Tento údaj je následně potvrzen přítomností plodové vody v zadní klenbě poševní při vyšetření v zrcadlech [Kacerovský et al, 2017b]. Dále je možno použít Temešváryho zkoušku (založenou na změně pH v pochvě) či specifické testy na průkaz plodové vody ve vaginální tekutině (např. detekce přítomnosti PAMG-1 (placentární alfa-mikroglobulin-1) nebo IGFBP-1 (inzulinu podobný růstový faktor vázající protein-1). Potvrdit diagnózu může také průkaz oligohydramnionu nebo anhydramnionu pomocí ultrazvuku [Kacerovský et al, 2017b].

3.3.1.3 Management PPROM

U pacientek s předčasným odtokem plodové vody je nejprve nutné vyloučit přítomnost klinické chorioamnionitidy (teplota matky nad 37,5°C a přítomnost nejméně dvou z následujících příznaků: tachykardie matky > 100 tepů za minutu, tachykardie plodu > 160 tepů za minutu, hnisavý vaginální výtok, citlivost dělohy, bolest břicha a leukocytóza > 15 000/mm³), závažné krvácení a známky hypoxie plodu. Pokud je PPROM komplikován některou z uvedených situací, mělo by být těhotenství neprodleně ukončeno [Kacerovský et al, 2017b]. Pokud pacientka s PPROM nevykazuje výše zmíněné komplikace, rozhoduje o dalším postupu gestační stáří, ve kterém k ruptuře obalu došlo. U těhotenství před dokončeným 34. týdnem je zpravidla preferovaným postupem expektace. Všechny pacientky s PPROM by při příjmu měly dostat antibiotickou profylaxi. Kortikosteroidy se obvykle podávají pacientkám do 34. týdne těhotenství. Antenatální podání

kortikosteroidů snižuje riziko neonatálního úmrtí, respirační dechové tísně novorozence a riziko intraventrikulárního krvácení plodu/novorozence. Tokolýza se u pacientek s předčasným odtokem plodové vody nedoporučuje, protože nevede k signifikantnímu prodloužení těhotenství a nesnižuje neonatální mortalitu a morbiditu [Kacerovský et al, 2017b].

3.3.2 PTB

Spontánní předčasný porod (PTB, spontaneous preterm birth) je definován jako výskyt pravidelných děložních kontrakcí při minimální frekvenci dvou stahů za 10 min, spolu se změnami na děložním hrdle, což vede k porodu před dokončeným 37. týdnem [ACOG Practice Bulletins, 2016; Kacerovský et al, 2017a]. Změny děložního hrdla souvisí s insuficiencí, což je nebolestivá dilatace děložního hrdla, která může vést k pozdnímu potratu nebo předčasnému porodu, a zkrácením děložního hrdla mezi 20. - 30. týdnem těhotenství pod 25 mm [Kacerovský et al, 2017a].

3.3.2.1 Patofyziologie PTB

Spontánní předčasný porod má obdobně jako PPRM velké množství rizikových faktorů, a to jak endogenních, tak exogenních. Mezi ně patří například předchozí předčasný porod, opakované potraty ve druhém trimestru, anomálie dělohy a děložního čípku, *in vitro fertilizace*, vícečetná gravidita, zdravotní komplikace matky, krvácení v průběhu těhotenství, abnormální placentace, urogenitální infekce, etnický původ, nízký socioekonomický status, kouření cigaret, užívání alkoholu a drog, psychosociální stres nebo stresové životní události, namáhavá fyzická zátěž či nedostatečná prenatální péče.

Jednou z příčin vedoucích ke spontánnímu předčasnému porodu je zánět, který přestoupí z pochvy do dělohy a na plodové obaly a poté do plodové vody. Zvýšené riziko infekce je spojeno s dilatací děložního hrdla. Porody v časnějších gestačních týdnech jsou spojeny s infekcí častěji, než porody pozdnější. Histologická chorioamnionitida byla hlášena u téměř 70 % předčasných porodů do 24. týdne

gestace ve srovnání s 16 % pacientek ve 34. týdnu těhotenství [Lahra & Jeffery, 2004; Shennan & Jones, 2004].

Vzhledem k tomu, že ženy s vícečetným těhotenstvím, polyhydramniem a anomáliemi dělohy mají vyšší riziko předčasného porodu, uvažuje se o vlivu nadměrné distenze dělohy a následném předčasném nástupu kontrakcí. Studie *in vitro* potvrzují zvýšenou expresi genů COX-2 (cyklooxygenáza 2), PGE₂ (prostaglandin E2), OTR (oxytocinový receptor), při distenzi dělohy, která vede k předčasnému porodu [Mohan et al, 2007; Terzidou et al, 2005].

3.3.2.2 Prevence PTB

U těhotných žen s krátkým děložním hrdlem nebo s anamnézou předčasného porodu, či pozdního potratu, je možné podat progesteron [Kacerovský et al, 2017a]. Progesteron stabilizuje myometrium (inhibuje jeho kontraktilitu) a působí protizánětlivě [Sykes & Bennett, 2018]. Progesteron může být podán formou intramuskulární injekce nebo vaginálně, přičemž vaginální podání progesteronu má vyšší biologickou dostupnost a nižší frekvenci nežádoucích účinků [Kacerovský et al, 2017a]. Další možností je cerkláž děložního hrdla, což je operace děložního hrdla, která řeší jeho insuficienci ve druhém a na počátku třetího trimestru gravidity. Cerkláž může být indikována preventivně, na základě anamnézy, dále pak při zjištění zkráceného děložního hrdla nebo při dilataci hrdla dělohy s prolabujícím vakem blan do pochvy [Alfirevic et al, 2017].

3.3.2.3 Management PTB

Pro krátkodobé zastavení nebo zmírnění kontrakcí lze použít tokolytickou léčbu. Tokolyza dokáže oddálit předčasný porod o dva až sedm dní, nicméně většina používaných tokolytik má také nežádoucí účinky na matku nebo plod. Kortikosteroidy se obvykle podávají pacientkám do 34. týdne gravidity, pokud se očekává předčasný porod v nejbližších sedmi dnech. Pokud je předčasný porod neodvratitelný nebo je pacientka GBS pozitivní, je vhodné zahájit antibiotikovou profylaxi [Kacerovský et al, 2017a].

4. Proteiny tepelného šoku v těhotenství

Jedna z prvních studií, zabývající se lokalizací proteinů tepelného šoku v placentě, pochází z roku 1998. Pomocí imunohistochemie, s využitím vysoce specifických antisér, byla zkoumána lokalizace hsp v placentární tkáni a tkáni decidua normotenzních žen během prvního, druhého a třetího trimestru těhotenství [Shah et al, 1998]. Proteiny Hsp27, Hsp60, Hsp70 a Hsp90 byly detekovány v deciduálních stromálních buňkách během každého trimestru, přičemž intenzita barvení se u Hsp27 a Hsp60 v průběhu těhotenství neměnila. Hsp70 a Hsp90 vykazovaly pokles hladin s rostoucí délkou gestace. Hsp60 a Hsp90 se nacházely primárně v jádře, Hsp70 byl detekován jak v jádře, tak v cytoplazmě a Hsp27 byl přítomen primárně v cytoplazmě. Co se týče placenty, Hsp60, Hsp70 a Hsp90 byly lokalizovány v cytotrofoblastu, syncytiotrofoblastu, intermediárním trofoblastu, Hofbauerových a endoteliálních buňkách. Obdobně jako v tkáni decidua, tak i v placentě se Hsp60 a Hsp90 nacházely primárně v buněčném jádře a Hsp70 byl nalezen jak v jádře, tak v cytoplazmě. V placentě byl Hsp27 nalezen pouze v intermediárním trofoblastu syncytiotrofoblastu, a to jen v prvních dvou trimestrech [Shah et al, 1998]. Expres proteinů Hsp60, Hsp70 a Hsp90 v placentě byla také studována v souvislosti s předčasným porodem a fetální růstovou restrikcí. V placentární tkáni byla zaznamenána exprese všech tří studovaných proteinů tepelného šoku, ale nebyly nalezeny žádné rozdíly v intenzitě hsp exprese mezi skupinami FGR, předčasným porodem a porodem v termínu. Nicméně v některých placentách žen s předčasným porodem byly detekovány komplexy Hsp60-protilátka a Hsp70-protilátka. Tyto imunokomplexy mohou podle autora přispět k předčasnému porodu. Anti-Hsp60 a anti-Hsp70 protilátky byly rovněž u žen, které předčasně porodily, detekovány i v mateřské cirkulaci [Ziegert et al, 1999].

4.1 Hsp v průběhu fyziologické gravidity

Vzhledem k tomu, že Hsp70 je nejvíce studovaným proteinem tepelného šoku, tak bylo publikováno poměrně hodně studií, které se zabývají jeho expresí u různých těhotenských patologií i v průběhu fyziologické gestace. Hsp70 je detekován v periferní cirkulaci jak u těhotných, tak u netěhotných žen. Během normálního

průběhu těhotenství byly pozorovány nižší hladiny Hsp70 v mateřské cirkulaci ve srovnání s netěhotnými ženami [Molvarec et al, 2007]. Podle této studie se také hladiny Hsp70 mění v průběhu těhotenství a v závislosti na věku těhotné ženy – sérová koncentrace Hsp70 se zvyšuje s postupujícím gestačním stářím a zároveň klesá se vzrůstajícím věkem matky [Molvarec et al, 2007]. Nicméně existují také studie, ve kterých nebyl nalezen statistický rozdíl v koncentracích sérového Hsp70 v průběhu normálního těhotenství [Fukushima et al, 2005]. I když má Hsp70 lokalizovaný v buňkách protizánětlivé účinky, Hsp70 nacházející se extracelulárně může fungovat jako stres signalizující molekula, která signalizuje nefyziologický stav, jako je buněčný stres nebo poškození, a vede k indukci vrozené a adaptivní imunitní odpovědi [Pockley, 2003]. Extracelulární Hsp70 se účastní přeměny dendritických buněk z tolerogenních na imunogenní a stimuluje cytolytickou aktivitu NK buněk a γ/δ T lymfocytů, což může způsobit netolerování plodu imunitním systémem matky. Z toho důvodu se předpokládá snížení hladin cirkulujícího Hsp70 během těhotenství.

Zvýšení hladin Hsp70 v mateřské cirkulaci se vzrůstajícím gestačním věkem může být způsobeno nárůstem množství apoptotických tělísek placentárního trofoblastu, která se uvolňují do mateřské cirkulace při remodelaci placenty v důsledku apoptózy [Redman & Sargent, 2000].

Snížování hladin cirkulujícího Hsp70 v souvislosti s rostoucím věkem rodičky odpovídá obdobným studiím u netěhotných žen a mohlo by souviset se sníženou schopností buněk reagovat na stresové situace a syntetizovat hsp s rostoucím věkem [Jin et al, 2004].

4.2 Hsp v průběhu preeklampsie

Vzhledem k tomu, že preeklampsie souvisí s oxidačním a hemodynamickým stresem, placentární ischemií a zánětlivými cytokiny, tak existují studie zkoumající proteiny tepelného šoku v souvislosti s tímto onemocněním. Nejvíce studovaným proteinem tepelného šoku v souvislosti s těhotenskými komplikacemi je opět Hsp70. Molvarec a jeho tým sledovali hladiny Hsp70 v mateřském séru u 142 hypertenzních těhotných žen a u 127 normotenzních těhotenství. Zjistili zvýšené sérové hladiny

Hsp70 u hypertenzních žen ve srovnání se zdravými kontrolami [Molvarec et al, 2006]. Obdobné výsledky ukazují i další studie. Zvýšené hladiny Hsp70 v mateřském séru byly pozorovány u žen s časným onsetem závažné preeklampsie ve srovnání s normálním průběhem těhotenství, a zároveň také u žen s časným onsetem závažné preeklampsie ve srovnání s ženami s pozdním nástupem závažné preeklampsie [Jirecek et al, 2002; Fukushima et al, 2005]. Liu pozoroval zvýšenou genovou i proteinovou expresi Hsp70 v placentě a purifikovaných mikrovaskulárních endoteliálních buňkách u 28 pacientek s placentární insuficiencí (preeklampsie a IUGR) [Liu et al, 2008]. Další studie sledovala sérové hladiny Hsp70 a Hsp60 u preeklampsie s časným a pozdním onsetem, a dále, zda plazmatické hladiny Hsp70 a Hsp60 souvisejí s hladinami cirkulujících cytokinů, a také funkcemi ledvin a jater u preeklampsie [Peraçoli et al, 2013]. U Hsp60 nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny, ale Hsp70 vykazoval vyšší sérové hladiny u pacientek s časným onsetem preeklampsie ve srovnání s onsetem pozdním. Dále byla ve skupině pacientek s časným nástupem preeklampsie pozorována pozitivní korelace mezi hladinami Hsp70 a koncentracemi TNF- α , TNF- α -receptoru I, IL-1 β , IL-12, laktátdehydrogenázy, aspartátaminotransferázy a kyseliny močové [Peraçoli et al, 2013]. Zvýšené hladiny cirkulujícího Hsp70 nemusí být jen markerem preeklampsie, ale mohou hrát roli také v její patogenezi. Stresované a poškozené nekrotické buňky uvolňují Hsp70 do extracelulárního prostoru, což může vyvolat prozánětlivou (Th-1) imunitní odpověď [Pockley, 2003]. Systémová zánětlivá reakce matky, která je zodpovědná za příznaky a symptomy preeklampsie, zahrnuje zvýšení počtu a aktivaci leukocytů s produkcí prozánětlivých cytokinů, které ovlivňují Th-1 odpověď a aktivaci komplementu, a produkci proteinů akutní fáze [Redman et al, 1999].

U preeklamptických žen vykazují sérové hladiny Hsp70 významné korelace s hladinami CRP v séru, sérovou aktivitou aspartátaminotransferázy a laktátdehydrogenázy a plazmatickými hladinami malondialdehydu [Molvarec et al, 2009]. Tyto výsledky naznačují, že zvýšené hladiny Hsp70 v séru odrážejí systémový zánět, oxidační stres a hepatocelulární poškození během preeklampsie.

4.3 Hsp a předčasný porod

V případě předčasného porodu byla pozorována zvýšená exprese jak intracelulárního, tak extracelulárního Hsp70. Bylo zjištěno, že přítomnost indukibilní formy Hsp70 ve vaginálních vzorcích těhotných žen je spojena s bakteriální vaginózou, přičemž se předpokládá, že exprese tohoto proteinu je spojena se sníženou prozánětlivou imunitní odpovědí na abnormální vaginální flóru těhotných žen [Genç et al, 2005]. Uvolňování vaginálního Hsp70 v reakci na abnormální vaginální mikroflóru může vyvolat produkci NO ve snaze minimalizovat patologické důsledky tohoto pozměněného prostředí [Genç et al, 2006]. Bakteriální vaginóza je jedním z rizikových faktorů předčasného porodu [Subtil et al, 2002; Tabatabaei et al, 2019]. Kromě toho bylo zjištěno, že lidské plodové obaly konstitutivně exprimují Hsp70 a expozice bakteriálnímu lipopolysacharidu výrazně stimuluje expresi Hsp70 ve fetálních obalech, což naznačuje roli tohoto proteinu v cytoprotekci před stresovými faktory během těhotenství [Menon et al, 2001]. Také bylo prokázáno, že intraamniální infekce, histologická chorioamnionitida a termín porodu jsou spojeny se zvýšenými koncentracemi Hsp70 v plodové vodě. Autoři předpokládají, že Hsp70 hraje roli v obranném mechanismu hostitele tím, že aktivuje vrozenou imunitní odpověď u žen s intrauterinní infekcí [Chaiworapongsa et al, 2008]. Ziegert sledoval proteinovou expresi Hsp60, Hsp70 a Hsp90 v placentách žen s předčasným porodem, porodem v termínu a u žen s IUGR [Ziegert et al, 1999]. Ve všech placentárních tkáních zaznamenal expresi těchto proteinů, ale nenašel žádný rozdíl v intenzitě hsp exprese u jednotlivých diagnóz. Nicméně u některých žen s předčasným porodem zaznamenal tvorbu komplexů Hsp60-protilátka a Hsp70-protilátka, přičemž u těchto pacientek našel také cirkulující protilátky proti Hsp60 a Hsp70 v mateřském séru. Proto se domnívá, že tvorba patologických imunokomplexů Hsp60-protilátka a Hsp70-protilátka může přispět k vyvolání předčasného porodu [Ziegert et al, 1999]. V další studii Fukushima pozoroval významně vyšší sérové hladiny Hsp70 u žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu oproti zdravým těhotným ženám bez jakýchkoliv komplikací [Fukushima et al, 2005]. Kromě toho byly koncentrace Hsp70 v séru významně vyšší u vysoce rizikových pacientek, které porodily předčasně ve srovnání s těmi, které byly vysoce rizikové, ale rodily v termínu.

5. Hypotéza a cíle práce

Hypotéza mé disertační práce předpokládá, že se stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi projeví signifikantní změnou profilu genové exprese vybraných proteinů tepelného šoku. Další předpoklad je, že závažnost konkrétní patologie bude mít vliv na expresi těchto hsp.

Hlavním cílem mé disertační práce bylo zjistit vztah mezi genovou expresí proteinů tepelného šoku a vybranými těhotenskými komplikacemi (preeklampsie, fetální růstová restrikce, gestační hypertenze, spontánní předčasný porod, předčasný odtok plodové vody).

Dílčí cíle byly následující:

- Kvantifikace vybraných proteinů tepelného šoku [konstitutivní Hsp27 (gen HSPB1), konstitutivní mitochondriální Hsp60 (gen HSPD1), inducibilní Hsp70 (gen HSPA1A), inducibilní Hsp90 α (gen HSP90AA1) a Hsp70 ko-chaperon HspBP1 (gen HSPBP1)] v placentární tkáni, plné periferní žilní krvi a mateřské plazmě u žen s těhotenskými komplikacemi (PE, FGR, GH, PTB, PPRM) a u fyziologických gravidit.
- Porovnání genové exprese vybraných proteinů tepelného šoku u pacientek s těhotenskými komplikacemi a u žen s normálním průběhem těhotenství.
- Posouzení vlivu závažnosti onemocnění na genovou expresi hsp.
- Posouzení mateřské a fetální odpovědi na stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi.

6. Materiál a metody

Ve své práci jsem pracovala se vzorky placentární tkáně, mateřské plné periferní žilní krve a krevní plazmy žen s těhotenskými komplikacemi a s normálním průběhem těhotenství. Vzorky byly sbírány v letech 2011-2016 v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze-Podolí. Část krevních vzorků od žen s normálním průběhem těhotenství byla též získána z Gynekologicko-porodnické kliniky, Fakultní nemocnice v Motole. Vzorky nesrážlivé periferní žilní krve byly nabírány do zkumavek s chelatačním činidlem EDTA. Z takto získaného vzorku bylo odebráno 200 μ l pro izolaci RNA a ze zbytku krve byla získána plazma. Vzorky placentární tkáně ve stabilizačním roztoku (RNAlater), vzorky plazmy a vzorky RNA z plné periferní žilní krve byly skladovány při -80°C než došlo k jejich finálnímu zpracování. Všechny pacientky, které se účastnily studie, podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie. Studie byla schválena Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Ženy s normálním průběhem těhotenství byly definovány jako ženy bez lékařských, porodnických nebo chirurgických komplikací během gravidity, které měly jednočetné těhotenství, rodily po ukončeném 37. týdnu těhotenství a narodily se jim zdravé děti s porodní váhou vyšší než 2500 g.

Preeklampsie byla diagnostikována, pokud se u pacientky vyskytla hypertenze (STK ≥ 140 mmHg a/nebo DTK ≥ 90 mmHg) ve dvou měřeních v rozmezí čtyř hodin a byla doprovázena proteinurií > 300 mg/24 h po 20. týdnu gestace [ACOG Practice Bulletins, 2002]. Závažná preeklampsie byla diagnostikována, pokud byl přítomen jeden nebo více z následujících symptomů: 1) systolický tlak krve ≥ 160 mmHg nebo diastolický tlak krve ≥ 110 mmHg, 2) proteinurie ≥ 5 g za 24 hodin, 3) nízký objem vyloučené moči (oligourie, méně než 500 ml za 24 hodin), 4) respirační problémy (plicní edém nebo cyanóza), 5) špatná funkce jater, 6) bolesti hlavy nebo poruchy vizu, 7) bolest v oblasti epigastria 8) trombocytopenie, 9) přítomnost fetální růstové restrikce.

Fetální růstová restrikce byla diagnostikována, pokud byla odhadovaná hmotnost plodu pod 10. percentilem pro daný gestační věk a na základě adjustace pro

populační standardy České republiky. Skupina SGA (plody malé vzhledem ke svému gestačnímu stáří) zahrnovala plody s hmotností nebo délkou pod referenční hranicí pro daný gestační věk. Skupina intrauterinní růstové restrikce (IUGR) zahrnovala plody, které měly odhadovanou hmotnost pod 10. percentilem pro dané gestační stáří a zároveň alespoň jeden z následujících patologických nálezů zjištěných pomocí Dopplerovské ultrasonografie: abnormální index pulsatility v *arteria umbilicalis* (abnormální hodnoty nad 95. percentilem pro daný gestační věk), nulový a/nebo reverzní tok v *arteria umbilicalis*, abnormální index pulsatility v *arteria cerebri media* (abnormální hodnoty pod 5. percentilem pro daný gestační věk), známky centralizace krevního oběhu plodu (CPR pod 5. percentilem pro daný gestační věk) a nedostatek plodové vody (anhydramnion nebo oligohydramnion).

PPROM byl definován jako předčasný odtok plodové vody před termínem porodu, porušení plodových obalů s odtokem plodové vody před nástupem pravidelné děložní činnosti před týdnem těhotenství 37+0.

Spontánní předčasný porod (PTB) byl definován jako výskyt pravidelných děložních kontrakcí při minimální frekvenci dvou stahů za 10 min, spolu se změnami na děložním hrdle, které vedly k porodu před ukončeným 37. gestačním týdnem.

Ženy s PPROM a PTB před 34. týdnem gestace, které neměly známky klinické infekce, byly léčeny kortikosteroidy pro urychlení procesu dozrání plic u plodu. Tokolyza byla aplikována pouze u těch pacientek před 34. týdnem těhotenství, které nevykazovaly známky fetální nebo maternální infekce, fetálního distresu (nedostatečný přísun kyslíku pro plod) a měly GBS-negativní kultivační vyšetření. Většině pacientek byla podána profylaktická antibiotika.

6.1 Placentární tkáň

Placentární tkáň (oblast centrálního kotyledonu) byla po dodání do laboratoře promyta a následně zamrazena v RNAlater (Ambion, Austin, USA) na teplotu -80°C než došlo k jejímu dalšímu zpracování. Do analýzy bylo zahrnuto 95 pacientek s preeklampsií (s a/nebo bez FGR), 39 žen s fetální růstovou restrikcí plodu, 31 pacientek s gestační hypertenzí a 42 žen s normálním průběhem těhotenství. V další

části studie, která se zabývala předčasnými porody, bylo analyzováno 80 vzorků placent žen s PPRM, 30 placent od žen se spontánním předčasným porodem (PTB) a 50 placent od žen s normálním průběhem těhotenství.

Z 95 pacientek, u kterých se vyskytla preeklampsie, mělo 40 žen příznaky mírné preeklampsie a u 55 žen se vyskytovala závažná forma preeklampsie. S ohledem na gestační stáří došlo u 38 pacientek s preeklampsií k porodu před 34. týdnem těhotenství a 57 žen rodilo po 34. týdnu gestace. 70 žen s preeklampsií mělo před těhotenstvím normální krevní tlak a u 25 žen se vyskytovala preeklampsie superponovaná na předchozí chronickou hypertenzi. Čtyři ženy s růstovou restrikcí plodu rodily před 32. týdnem těhotenství a 35 pacientek s FGR po 32. týdnu gestace. Oligohydramnion nebo anhydramnion byl přítomen ve 14 případech FGR. Pomocí Dopplerovské ultrasonografie byl zjištěn abnormální index pulsatility (PI) v *arteria umbilicalis* (14 žen s preeklampsií a 14 žen s FGR) a/nebo v *arteria cerebri media* (9 žen s preeklampsií a 6 těhotenství s FGR). Cerebroplacentární poměr (CPR, poměr PI v *arteria cerebri media* a PI *arteria umbilicalis*) byl pod 5. percentilem v 18 případech (9 žen s preeklampsií a 9 těhotenství s FGR). Nulový a/nebo reverzní tok v *arteria umbilicalis* se vyskytl v 9 případech (7 žen s preeklampsií a 2 těhotenství s FGR). U 43 žen s PPRM byla diagnostikována histologická chorioamnionitida (HCA).

V tabulkách 1a a 1b jsou uvedena klinická data žen zahrnutých do studie.

Tabulka 1a: Klinická data pacientek s normálním a patologickým průběhem těhotenství

	Zdravé kontroly (n= 42)	Preeklampsie (n= 95)	FGR (n= 39)	GH (n= 31)
Věk (roky)	31 (28-33)	32 (29-35)	29 (27-34)	30 (28-31)
Tlak krve (mmHg)				
Systolický	120 (112-128)	155 (149-160)	120 (120-125)	150 (144-160)
Diastolický	76 (70-80)	100 (90-103)	80 (75-80)	95 (92-100)

Proteinurie (g/24h)	-	1,46 (0,53-3,5)	-	-
Gestační věk v době náběru krve (týdny)	36 (35-37)	35 (31-38)	36 (30-37)	37 (36-39)
Gestační věk v době porodu (týdny)	39 (38-40)	36 (31-38)	37 (35-38)	39 (38-40)
Způsob porodu				
Vaginální	35 (83,3 %)	15 (15,8 %)	9 (23,1 %)	24 (77,4 %)
Císařský řez	7 (16,7 %)	80 (84,2 %)	30 (76,9 %)	7 (22,6 %)
Hmotnost novorozence (gramy)	3345 (3232-3548)	2425 (1590-2925)	2350 (1875-2568)	3110 (3020-3210)

Data jsou uváděna jako medián (25. - 75. percentil) pro kontinuální proměnné a jako číslo (procento) pro kategorické proměnné

Tabulka 1b: Klinická data pacientek s předčasným porodem a porodem v termínu

	Zdravé kontroly	PTB	PPROM
	(n= 50)	(n= 30)	(n= 80)
Věk (roky)	33 (30-35,75)	30 (28-35)	31,5 (28-36)
Gestační věk v době porodu (týdny)	39 (38-40)	33 (29-35)	34 (31-36)
Způsob porodu			
Vaginální	41 (82 %)	22 (73,3 %)	52 (65 %)
Císařský řez	9 (18 %)	8 (26,7 %)	28 (35 %)
Hmotnost novorozence (gramy)	3435 (3252,5-3687,5)	2110 (1620-2570)	2205 (1528-2693)
BMI matky	25,00 (23,00-28,00)	25,2 (21,80-29,00)	25,00 (22,40-28,00)
Pohlaví dítěte			
Muž	28 (56 %)	20 (66,7 %)	49 (61,3 %)
Žena	22 (44 %)	10 (33,3 %)	31 (38,7 %)

Prvorodička

Ano	-	11 (36,7 %)	37 (46,3 %)
Ne	-	19 (63,3 %)	43 (53,7 %)

Podání kortikosteroidů

Ano	-	19 (63,3 %)	57 (71,3 %)
Ne	-	11 (36,7 %)	23 (28,7 %)

Podání antibiotik

Ano	-	25 (83,3 %)	74 (92,5 %)
Ne	-	5 (16,7 %)	6 (7,5 %)

Tokolýza

Ano	-	12 (40 %)	19 (23,8 %)
Ne	-	18 (60 %)	61 (76,2 %)

CRP (mg/l) - 5,9 (3,9-23,0) 6,7 (3,6-13,0)

Leukocyty (x10⁹/l) - 11,4 (10,1-15,0) 12,7 (10,6-16,3)

Apgar skóre < 7 (5 min) - 2 (6,7 %) 4 (5 %)

Apgar skóre < 7 (10 min) - 1 (3,3 %) 2 (2,5 %)

pH pupečnickové krve - 7,32 (7,30-7,36) 7,32 (7,29-7,36)

Data jsou uváděna jako medián (25. - 75. percentil) pro kontinuální proměnné a jako číslo (procento) pro kategorické proměnné

6.2 Mateřská plná periferní žilní krev

Vzorky mateřské plné periferní žilní krve byly nabírány do zkumavek s chelatačním činidlem EDTA. Krve od žen s fyziologickým průběhem těhotenství byly nabírány ve 36. týdnu gestace při preventivní prohlídce. Krve od žen s patologickým průběhem těhotenství byly nabírány v době manifestace klinických příznaků onemocnění.

Do studie bylo zahrnuto celkem 129 žen (32 žen s normálním průběhem těhotenství, 56 žen s preeklampsií s výskytem a/nebo bez výskytu fetální růstové restrikce, 22 žen s fetální růstovou restrikcí a 19 žen s gestační hypertenzí).

U 19 žen byla diagnostikována mírná preeklampsie a 37 žen mělo příznaky závažné preeklampsie. S ohledem na gestační stáří 24 pacientek s PE rodilo před 34. týdnem gestace a 32 žen s PE rodilo po 34. týdnu těhotenství. U 13 žen se jednalo o preeklampsii superponovanou na předchozí chronickou hypertenzi. U 7 žen s výskytem FGR u plodu bylo těhotenství ukončeno před 32. týdnem a 15 žen s diagnózou FGR u plodu rodilo po 32. týdnu gestace. U 8 růstově retardovaných plodů se vyskytl oligohydramnion nebo anhydramnion. Abnormální index pulsatility v *arteria umbilicalis* byl zjištěn u 12 žen s preeklampsií a u 15 těhotenství s FGR. Abnormální index pulsatility v *arteria cerebri media* se vyskytl u 8 žen s preeklampsií a 9 těhotenství s FGR. Patologický cerebroplacentární poměr byl detekován u 7 žen preeklampsií a 9 těhotenství s FGR. Klinická data pacientek zahrnutých do studie jsou uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Klinická data pacientek s normálním a patologickým průběhem těhotenství (vzorky mateřské plné periferní krve)

	Zdravé kontroly (n= 32)	Preeklampsie (n= 56)	FGR (n= 22)	GH (n= 19)
Věk (roky)	32 (29-35)	33 (29-36)	30 (28-34)	31 (29-33)
Tlak krve (mmHg)				
Systolický	120 (110-125)	155 (150-161)	128 (118-139)	157 (151-163)
Diastolický	75 (71-79)	100 (92-104)	80 (73-85)	100 (93-102)
Proteinurie (g/24h)	-	1,36 (0,54-3,5)	-	-
Gestační věk v době porodu (týdny)	40 (39-40)	36 (32-39)	37 (33-38)	39 (37-39)
Způsob porodu				
Vaginální	24 (75 %)	8 (14,3 %)	9 (40,9 %)	10 (52,6 %)

Císařský řez	8 (25 %)	48 (85,7 %)	13 (59,1 %)	9 (47,4 %)
Hmotnost novorozence (gramy)	3400 (3150-3700)	2400 (1430-3240)	2100 (1920-2600)	3300 (2900-3650)

Data jsou uváděna jako medián (25. - 75. percentil) pro kontinuální proměnné a jako číslo (procento) pro kategorické proměnné.

6.3 Mateřská krevní plazma

Vzorky mateřské periferní žilní krve byly nabírány do 9ml zkumavek s chelatačním činidlem EDTA. Krve od žen s fyziologickým průběhem těhotenství byly nabírány ve 36. týdnu gestace při preventivní prohlídce. Krve od žen s patologickým průběhem gestace byly nabírány v době manifestace klinických příznaků onemocnění. Periferní krev byla centrifugována při pokojové teplotě při 4 600 rpm po dobu 10 minut, poté byla provedena re-centrifugace plazmy za stejných podmínek.

Celkem bylo vyšetřeno 39 krevních plazem žen s normálním průběhem těhotenství, 78 vzorků žen s preeklampsií (s a/nebo bez FGR), 25 vzorků plazem žen s fetální růstovou restrikcí plodu a 33 vzorků bylo od žen s gestační hypertenzí.

Ze 78 preeklamptických žen mělo 27 žen mírnou preeklampsii a 51 žen mělo závažnou formu preeklampsie. Těhotenství bylo nutno ukončit před 34. týdnem u 30 žen s preeklampsií a 48 žen s PE rodilo po 34. týdnu gestace. Preeklampsie se objevila u 56 pacientek, které byly dříve normotenzní, a u 22 žen se vyskytla preeklampsie superponovaná na předchozí chronickou hypertenzi. 5 těhotenství s růstově retardovanými plody muselo být ukončeno před 32. gestačním týdnem a 20 žen s diagnózou FGR u plodu rodilo až po 32. týdnu gestace. U 9 růstově retardovaných plodů se vyskytl oligohydramnion nebo anhydramnion. Abnormální index pulsatility v *arteria umbilicalis* byl zjištěn u 12 žen s preeklampsií a u 14 těhotenství s FGR. Abnormální index pulsatility v *arteria cerebri media* se vyskytl u 9 těhotenství s preeklampsií a u 5 těhotenství s FGR. Patologický cerebroplacentární poměr byl identifikován u 8 těhotenství s preeklampsií a 9 těhotenství s FGR. Nulový a/nebo reverzní tok v *arteria umbilicalis* se vyskytl ve 4 případech (2 PE a 2 FGR). Klinická data pacientek zahrnutých do studie jsou uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3: Klinická data pacientek s normálním a patologickým průběhem těhotenství (vzorky krevních plazem)

	Zdravé kontroly (n= 39)	Preeklampsie (n= 78)	FGR (n= 25)	GH (n= 33)
Věk (roky)	33 (30-35)	34 (29-37)	32 (28-36)	30 (29-33)
Tlak krve (mmHg)				
Systolický	120 (112-128)	156 (150-163)	127 (115-139)	155 (150-165)
Diastolický	76 (70-80)	100 (90-103)	80 (75-86)	100 (93-100)
Proteinurie (g/24h)	-	1,23 (0,55-3,4)	-	-
Gestační věk v době porodu (týdny)	40 (39-40)	36 (31-38)	36 (34-38)	39 (37-39)
Způsob porodu				
Vaginální	28 (71,8 %)	13 (16,7 %)	9 (36 %)	19 (57,6 %)
Císařský řez	11 (28,2 %)	65 (83,3 %)	16 (64 %)	14 (42,4 %)
Hmotnost novorozence (gramy)	3380 (3142-3645)	2450 (1442-3220)	2160 (1925-2610)	3210 (2880-3620)

Data jsou uváděna jako medián (25. - 75. percentil) pro kontinuální proměnné a jako číslo (procento) pro kategorické proměnné.

6.4 Izolace RNA z placentární tkáně

Celková RNA byla izolována z 30-35 mg placentární tkáně za využití komerčně dostupného kitu QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo), podle protokolu od výrobce.

Placentární tkáň byla nejprve homogenizována v 600 µl ředěného pufru RLT (99 % pufru RLT + 1 % β-merkaptoethanolu). Homogenní lyzát byl následně centrifugován 3 minuty při maximální rychlosti centrifugy (14 500 rpm) a dále byl použit jen čistý supernatant. K supernatantu bylo přidáno 600 µl 70% etanolu a celý vzorek byl řádně

protřepán. Vzniklá směs byla přenesena na kolonku s filtrem (QIAamp spin) a stočena na centrifuze 30 s při 14 500 rpm. Následně byl vzorek zachycený na kolonce s filtrem postupně promýván nejprve 700 µl pufru RW1 a poté dvakrát 500 µl pufru RPE. Po přidání každého pufru byl vzorek centrifugován 30 s při 14 500 rpm. Po druhém přidání promývacího pufru RPE byl vzorek centrifugován 4 minuty při 11 000 rpm. Pro dosušení vzorku byla ještě provedena centrifugace při 11 000 rpm po dobu 2 minut. Eluce proběhla s 50 µl vody (RNase-Free Water). Pro minimalizaci DNA kontaminace byla eluovaná RNA ošetřena 5 µl Deoxyribonukleázy I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Kanada) v přítomnosti 5 µl 10x koncentrovaného reakčního pufru s MgCl₂ (Fermentas International, Ontario, Kanada) po dobu 30 min při teplotě 37°C. Nakonec bylo přidáno 5 µl 50mM EDTA (Fermentas International, Ontario, Kanada) a následovala 10 minutová inkubace při 65°C. Koncentrace RNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000, Witec AG, Littau, Švýcarsko). Všechny vzorky měly poměr absorbcí 260/280 nm > 1,9, což indikuje vysokou kvalitu a čistotu izolace.

6.5 Izolace RNA z plné periferní žilní krve matky

Celková RNA byla izolována z 200 µl periferní žilní krve (zkumavky pro náběr krve obsahovaly chelatační činidlo EDTA) za využití komerčně dostupného kitu QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo), podle protokolu od výrobce.

Ke 200 µl periferní krve bylo přidáno 1000 µl EL pufru. Poté došlo k desetiminutové inkubaci na ledu a desetiminutové centrifugaci (200 rpm, 4°C). Vzniklý supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 400 µl EL pufru a vzorek byl protřepán. Opět došlo k desetiminutové centrifugaci (200 rpm, 4°C). Po odstranění supernatantu se k peletě přidalo 350 µl ředěného pufru RLT (99% pufru RLT + 1% β-merkaptioetanolu). Následně byl vzorek přepipetován na kolonku (QIAshredder spin column) a centrifugován při 14 500 rpm po dobu 3 minut. K lyzátu bylo přidáno 350 µl 70% etanolu a směs byla promíchána. Poté došlo k přepipetování vzorku do kolonky s filtrem a k centrifugaci při 14 500 rpm po dobu 30 s. Kolonka byla postupně promyta 700 µl pufru RW1 a 2 x 500 µl pufru RPE. Po přidání každého pufru byl vzorek centrifugován 30 s při 14 500 rpm. Po druhém přidání promývacího

pufu RPE byl vzorek centrifugován 4 minuty při 11 000 rpm. Pro dosušení vzorku byla ještě provedena centrifugace při 11 000 rpm po dobu 2 minut. Eluce proběhla s 50 µl vody (RNase-Free Water). Pro minimalizaci DNA kontaminace byla eluovaná RNA ošetřena 5 µl Deoxyribonukleázy I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Kanada) v přítomnosti 5 µl 10x koncentrovaného reakčního pufu s MgCl₂ (Fermentas International, Ontario, Kanada) po dobu 30 min a při teplotě 37°C. Nakonec bylo přidáno 5 µl 50mM EDTA (Fermentas International, Ontario, Kanada) a následovala 10 minutová inkubace při 65°C. Koncentrace RNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000, Witec AG, Littau, Švýcarsko).

6.6 Izolace RNA z mateřské krevní plazmy

Periferní krev (9 ml) byla nabírána do zkumavek s EDTA a centrifugována při pokojové teplotě dvakrát při 4 600 rpm po dobu 10 minut. Vyizolovaná plazma byla uchována při -80°C. Celková RNA byla izolována z 1 ml plazmy za použití RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle protokolu od výrobce.

K 1 ml plazmy byly přidány 3 ml Trizol LS Reagent a vzorek byl promíchán pipetou. Homogenizovaná směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě a následně bylo ke směsi přidáno 800 µl chloroformu. Vzorek byl opět promíchán a nechal se inkubovat 15 min při pokojové teplotě. Poté proběhla centrifugace při 6 500 rpm po dobu 15 min a teplotě 4°C. Do čisté zkumavky se odebrala vodná fáze, ke které se přidalo 1,143 ml 100% etanolu a vše se důkladně promíchalo. Celý vzorek byl postupně aplikován na RNeasy kolonku s filtrem a centrifugován při 14 500 rpm 30 s. Po aplikaci celého vzorku na kolonku proběhla ještě centrifugace při 14 500 rpm po dobu 1 min pro odstranění nadbytečného etanolu. Vzorek byl promyt 700 µl pufu RW1 a dvakrát 500 µl pufu RPE. Po přidání každého pufu byl vzorek centrifugován 30 s při 14 500 rpm. Po druhém přidání promývacího pufu RPE byl vzorek centrifugován 2 minuty při 14 500 rpm. Pro dosušení vzorku byla ještě provedena centrifugace při 14 500 rpm po dobu 90 s. Eluce proběhla s 50 µl vody (RNase-Free Water). Pro minimalizaci DNA kontaminace byla eluovaná RNA ošetřena 5 µl Deoxyribonukleázy I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Kanada) za přítomnosti 5 µl 10x koncentrovaného reakčního pufu s MgCl₂ (Fermentas International, Ontario, Kanada) po dobu 30 min a při teplotě 37°C.

Nakonec bylo přidáno 5 μ l 50mM EDTA (Fermentas International, Ontario, Kanada) a následovala 10 minutová inkubace při 65°C. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000, Witec AG, Littau, Švýcarsko).

6.7 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase

Analýza hladin mRNA proteinů tepelného šoku byla provedena pomocí kvantitativní reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Analýza byla provedena na sekvenčním detekčním systému ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Primery pro lidské hsp a β -aktin a sondy byly navrženy pomocí programu Primer Express verze 2.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Sekvence jednotlivých primerů (přímý a zpětný) a sond jsou uvedeny v tabulce 4. Celkem bylo detekováno 5 hsp systémů – Hsp27 (HSPB1, délka amplikonu 67 bp), Hsp60 (HSPD1, délka amplikonu 69 bp), Hsp70 (HSPA1A, délka amplikonu 87 bp), Hsp90 α (HSP90AA1, délka amplikonu 85 bp), HspBP1 (HSPBP1, délka amplikonu 66 bp) a β -aktin (ACTB, housekeeping gen, délka amplikonu 70 bp). Byla provedena jednokroková kvantitativní RT-PCR v reálném čase, což znamená, že reverzní transkripce i polymerázová řetězová reakce probíhaly v jedné zkumavce. Každý vzorek byl analyzován v duplexu. Jako endogenní kontrola byl použit gen pro β -aktin. Jako referenční vzorek byla použita placenta z fyziologického průběhu těhotenství. Celkový reakční objem činil 25 μ l a reakční směs obsahovala TaqMan One-Step PCR Master Mix Reagents ve složení 2x Master Mix a 40x MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), přímý a zpětný primer (pro hsp a β -aktin), TaqMan sodu (pro hsp a β -aktin), vodu a izolovanou celkovou RNA z placentární tkáně, plné periferní žilní krve nebo mateřské krevní plazmy. Koncentrace jednotlivých primerů a sond jsou uvedeny v tabulce 5. Reakční směsi pro jednotlivé hsp systémy a jednotlivé typy vzorků (placenta x plná periferní žilní krev x mateřská krevní plazma) jsou uvedeny v tabulkách 6a-6c. Jednotlivé RNA vzorky byly ředěny ve vodě (DEPC-Treated Water, Ambion, Foster City, CA, USA) v závislosti na typu analyzovaného vzorku (placenta x plná periferní žilní krev x mateřská krevní plazma) a hsp systému. Vzorky placentární tkáně byly naředěny na finální koncentraci 2 ng/ μ l pro systémy Hsp27, Hsp70 a Hsp90 α , pro zbylé 2 systémy (Hsp60 a HspBP1) proběhlo ředění na

100-200 ng/μl, v závislosti na počáteční koncentraci vzorku. Vzorky plné periferní žilní krve byly ředěny také na 2 ng/μl pro systémy Hsp27, Hsp70 a Hsp90α a pro zbylé dva systémy proběhlo ředění 1:1. Vzorky mateřských krevních plazem byly ředěny na 2 ng/μl.

Teplotní profil použitý pro jednokrokovou RT-PCR v reálném čase zahrnoval reverzní transkripci při teplotě 48°C po dobu 30 minut, preinkubaci při 95°C po dobu 10 minut, která sloužila k aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymerázy, a 50 cyklů PCR. Každý cyklus zahrnoval dva kroky - denaturaci DNA při teplotě 95°C po dobu 15 s a nasedání + extenzi primerů při teplotě 60°C po dobu 1 min.

Pro vyhodnocení relativních změn genové exprese byl použit $2^{-\Delta\Delta C_t}$ algoritmus, který je známý jako komparativní C_t metoda [Livak & Schmittgen, 2001]. Prahový cyklus (C_t , cycle threshold) je cyklus, ve kterém hladina fluorescence dosáhne stanovené prahové hodnoty. Tato metoda používá hodnoty C_t generované ze systému qPCR pro výpočet relativních změn genové exprese v cílových a referenčních vzorcích, za použití referenčního genu jako normalizátoru.

$\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ hsp}} - C_{t \text{ beta-aktin}}) \text{ testovaného vzorku} - (C_{t \text{ hsp}} - C_{t \text{ beta-aktin}}) \text{ referenčního vzorku}$

Tabulka 4: Primery a sondy použité pro RT-PCR v reálném čase

Gen	Gen info-NCBI (lokalizace)	Sekvence primerů
β-aktin	ACTB, GeneID 60 (jádro, cytoskelet, všechny buňky a tkáně)	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
Hsp27	HSPB1, GeneID 3315	5'-TCCCTGGATGTCAACCACTTC-3'
konstitutivní	(jádro, cytoplazma, všechny buňky a tkáně, fyziologicky nízká hladina exprese)	5'-TCTCCACCACGCCATCCT-3'

Hsp60 konstitutivní	HSPD1, GeneID 3329 (mitochondrie, všechny buňky a tkáně)	5'-GATGTTGATGGAGAAGCTCTAAGTACA-3' 5'-TGCCACAACCTGAAGACCAA-3'
Hsp70 inducibilní (odpověď na stresové podmínky)	HSPA1A, GeneID 3303 (cytoplazma, jádro, vezikuly, buněčné membrány, všechny buňky a tkáně)	5'-ACCAAGCAGACGCAGATCTTC-3' 5'-GCCCTCGTACACCTGGATCA-3'
Hsp90α inducibilní (odpověď na stresové podmínky)	HSP90AA1, GeneID 3320 (cytoplazma, všechny buňky a tkáně)	5'-TGCGGTCAGTCTAGCCAAGATG-3' 5'-GAAAGGCGAACGTCTCAACCT-3'
HspBP1 ko-chaperon Hsp70	HSPBP1, GeneID 23640 (cytoplazma, jádro, centrozom, vezikuly, všechny buňky a tkáně)	5'-TGGCCGACCTGTGTGAGA-3' 5'-GCAGGTGCATGCCAGACA-3'

Gen	Sekvence sondy
β-aktin	5'-(VIC) ATCAAGATCAATGCTCCTCCTGAGCGC (TAMRA)-3'
Hsp27	5'-(FAM) CCCC GGACGAGCTGACGGTC (TAMRA)-3'
Hsp60	5'-(FAM) TCGTCTTGAATAGGCTAAAG (MGB)-3'
Hsp70	5'-(FAM) CCTACTCCGACAACCAACCCGGG (TAMRA)-3'
Hsp90α	5'-(FAM) CCCAGACCCAAGACCAACCGATGG (TAMRA)-3'
HspBP1	5'-(FAM) CATGGACAATGCCG (MGB)-3'

Tabulka 5: Koncentrace použitých primerů a sond

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90α	HspBP1
hsp	900/300	900/200	300/200	300/200	700/200
β-aktin	300/200	300/200	300/200	300/200	200/100

Koncentrace primerů a sond (nmol/l) jsou uvedeny jako stejná koncentrace přímého a zpětného primeru / koncentrace sondy.

Tabulka 6a: Příprava reakční směsi pro detekci hsp systémů v placentární tkáni, rozpis na 1 jamku, veškeré objemy jsou uváděny v μ l.

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90α	HspBP1
2xMM	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
voda	0,25	0,375	3,375	3,375	2
40xRT	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
hsp primery	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
hsp sonda	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
β-aktin primery	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
β-aktin sonda	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
RNA	5	5	5	5	5

2xMM= 2x koncentrovaný master mix; 40xRT= 40x koncentrovaná MultiScribe reverzní transkriptáza + RNase Inhibitor Mix

Tabulka 6b: Příprava reakční směsi pro detekci hsp systémů v plné periferní žilní krvi, rozpis na 1 jamku, veškeré objemy jsou uváděny v μ l.

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90α	HspBP1
2xMM	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
voda	0,25	0	3,375	3,375	0
40xRT	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625

hsp primery	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
hsp sonda	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
β-aktin primery	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
β-aktin sonda	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
RNA	5	5,375	5	5	7

2xMM= 2x koncentrovaný master mix; 40xRT= 40x koncentrovaná MultiScribe reverzní transkriptáza + RNase Inhibitor Mix

Tabulka 6c: Příprava reakční směsi pro detekci hsp systémů v mateřské krevní plazmě, rozpis na 1 jamku, veškeré objemy jsou uváděny v µl.

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90α	HspBP1
2xMM	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
voda	0,25	0,375	3,375	3,375	2
40xRT	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
hsp primery	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
hsp sonda	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
β-aktin primery	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
β-aktin sonda	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
RNA	5	5	5	5	5

2xMM= 2x koncentrovaný master mix; 40xRT= 40x koncentrovaná MultiScribe reverzní transkriptáza + RNase Inhibitor Mix

6.8 Statistická analýza

Pro určení normality dat byl použit Shapiro-Wilk test, který ukázal, že data nemají normální rozložení. Proto byly hladiny hsp mRNA mezi skupinami porovnávány neparametrickými testy (Mann-Whitney U-test pro srovnávání mezi dvěma skupinami a Kruskal-Wallis test pro srovnání mezi více skupinami) pomocí softwaru

Statistica (verze 9.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Hladina signifikance byla ustanovena na hodnotě $p < 0,05$. Grafy byly vytvořeny také v softwaru Statistica. Krabicové grafy obsahují medián hodnot genové exprese hsp (vodorovná čára uvnitř boxu), horní a dolní ohraničení boxu značí 75. a 25. percentil, horní a dolní interval boxu představují maximální a minimální hodnoty, které nejsou více jak 1,5 násobkem kvartilového rozpětí. Kolečka značí odlehlé hodnoty a hvězdičky extrémní hodnoty.

Korelace mezi proměnnými byly spočítány pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (ρ). Pokud je hodnota korelačního koeficientu -1 nebo 1, jedná se o perfektní negativní nebo pozitivní korelaci. Pokud se hodnota korelačního koeficientu pohybuje v intervalu $<-1; -0,5>$ nebo $<0,5; 1>$, jedná se o silnou negativní nebo pozitivní korelaci. Pokud je korelační koeficient v rozmezí od -0,5 do 0 a od 0 do 0,5, jedná se o slabou negativní nebo pozitivní korelaci. Hladina signifikance byla opět stanovena na hodnotě $p < 0,05$.

7. Výsledky

7.1 Hladiny mRNA hsp v placentární tkáni u pacientek s těhotenskými komplikacemi a předčasným porodem

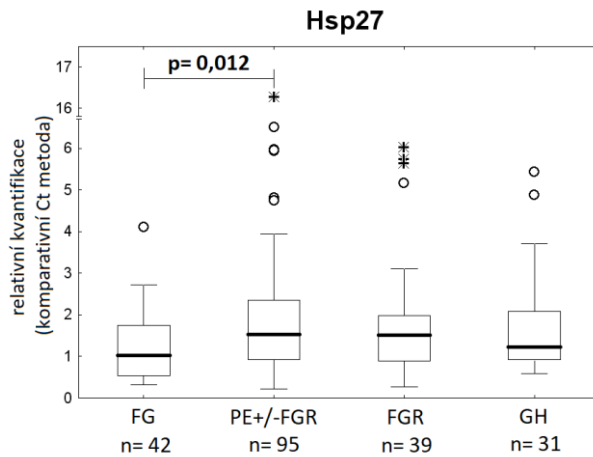
Vzorky placentární tkáně byly rozděleny do jednotlivých skupin – fyziologická gravidita (FG), preeklampsie s nebo bez fetální růstové restrikce (PE+/-FGR), fetální růstová restrikce (FGR), gestační hypertenze (GH), předčasný odtok plodové vody (PPROM) a spontánní předčasný porod (PTB). Počty jednotlivých vzorků ve skupinách byly uvedeny v kapitole materiál a metody.

Signifikantní zvýšení exprese mRNA bylo pozorováno pouze u **Hsp27 (p= 0,021)** u žen s těhotenskými komplikacemi (PE+/-FGR, FGR, GH) ve srovnání s ženami s normálním průběhem těhotenství. Následná Kruskal-Wallis analýza prokázala zvýšení exprese Hsp27 pouze u skupiny pacientek s PE+/-FGR ve srovnání s FG graviditou (**Hsp27: p= 0,012**). Grafické znázornění viz graf 1. U ostatních hsp systémů nebyla pozorována změna v genové expresi ani u jedné skupiny těhotenských komplikací ve srovnání s fyziologickou graviditou. Preeklampsie s nebo bez fetální růstové restrikce: Hsp60: p= 0,433; Hsp70: p= 1,0; Hsp90α: p= 0,150; HspBP1: p= 0,532. Fetální růstová restrikce: Hsp27: p= 0,221; Hsp60: p= 1,0; Hsp70: p= 1,0; Hsp90α: p= 1,0; HspBP1: p= 0,270. Gestační hypertenze: Hsp27: p= 0,571; Hsp60: p= 0,853; Hsp70: p= 1,0; Hsp90α: 1,0; HspBP1: p= 1,0.

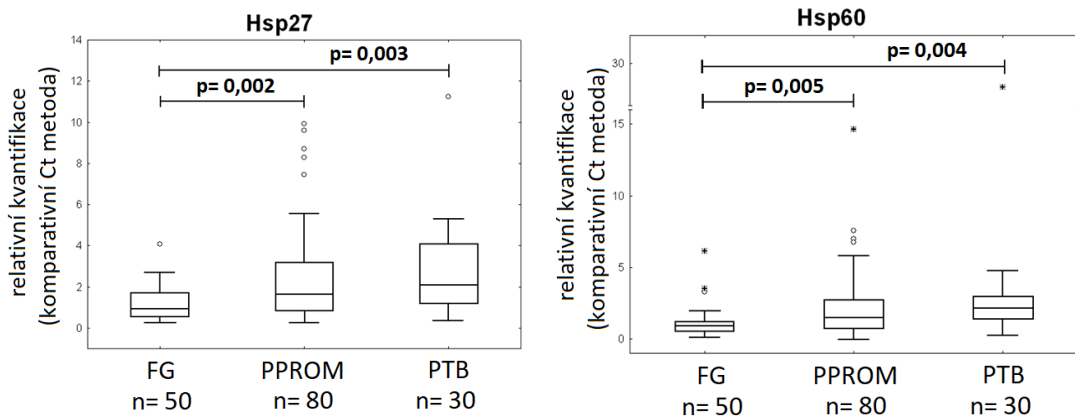
Co se týče předčasných porodů, došlo k signifikantnímu zvýšení exprese mRNA oproti fyziologické skupině u Hsp27 a Hsp60, a to jak u skupiny PPROM (**Hsp27: p= 0,002; Hsp60: p= 0,005**), tak u PTB (**Hsp27: p= 0,003; Hsp60: p= 0,004**). U předčasného odtoku plodové vody došlo navíc ke statisticky signifikantnímu snížení exprese u **Hsp70 (p= 0,021)** a **HspBP1 (p= 0,034)**. Hsp90α nevykazoval žádné změny exprese (p= 0,415). Stejně tak bez změny exprese byly systémy Hsp70 (p= 1,0), Hsp90α (p= 1,0) a HspBP1 (1,0) u kategorie spontánní předčasný porod. U ko-chaperonu HspBP1 byl navíc pozorován signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinami PPROM a PTB (**p= 0,009**), kdy u PPROM došlo ke snížení exprese HspBP1 oproti PTB. Ostatní proteiny tepelného šoku nevykazovaly žádný významný

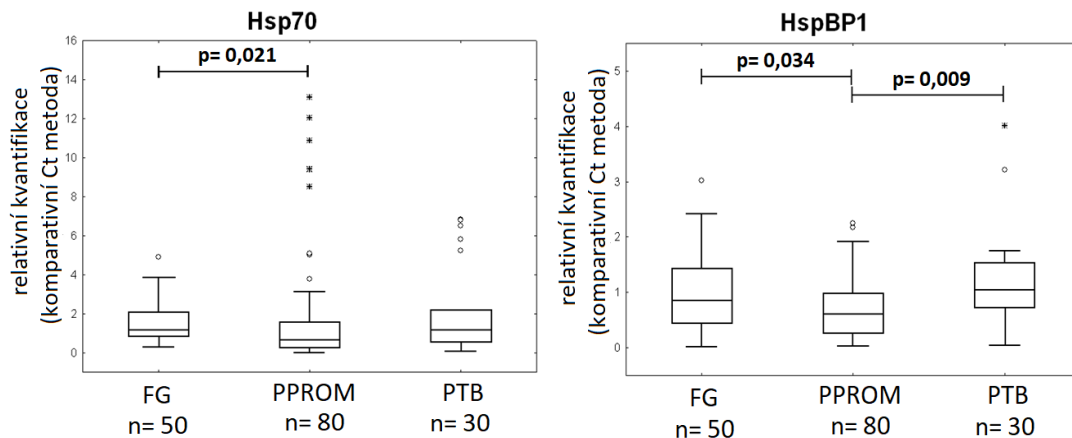
rozdíl mezi skupinou spontánního předčasného porodu a skupinou pacientek s předčasným odtokem plodové vody (Hsp27: $p=1,0$; Hsp60: $p=1,0$; Hsp70: $p=0,266$; Hsp90 α : $p=0,986$). Grafické znázornění statisticky významných výsledků ukazuje graf 2.

Graf 1: Genová exprese Hsp27 v placentární tkáni u preeklampsie s nebo bez fetální růstové restrikce



Graf 2: Genová exprese Hsp27, Hsp60, Hsp70 a HspBP1 u předčasných porodů a fyziologické gravidity





7.1.1 Asociace studovaných mRNA hsp v placentární tkáni a závažnost preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografií

Expresí mRNA jednotlivých hsp byla hodnocena ve vztahu k závažnosti onemocnění na základě klinických příznaků (mírná a závažná preeklampsie) a termínu porodu (porod před/po 34. týdnu těhotenství). Jednotlivé skupiny byly mezi sebou porovnávány neparametrickým Kruskal-Wallis testem.

Při porovnávání pacientek s mírnou nebo závažnou preeklampií s pacientkami s normálním průběhem těhotenství bylo pozorováno statisticky signifikantní zvýšení exprese mRNA hsp pouze u žen s mírnou preeklampií, a to konkrétně u **Hsp27** ($p < 0,001$), **Hsp90 α** ($p = 0,008$) a **HspBP1** ($p = 0,012$). Výsledky jsou znázorněny v grafu 3. Hsp60 ($p = 0,328$) a Hsp70 ($p = 0,498$) nevykazovaly změnu exprese. Stejně tak nedošlo k žádné statisticky významné změně exprese u pacientek se závažnou formou preeklampsie ve srovnání s fyziologickými graviditami (Hsp27: $p = 0,249$; Hsp60: $p = 0,267$; Hsp70: $p = 1,0$; Hsp90 α : $p = 0,706$; HspBP1: $p = 1,0$).

Dále jsme se zaměřili na expresi mRNA proteinů tepelného šoku v souvislosti s nutností předčasného ukončení těhotenství u žen s PE+/-FGR – porod před nebo po 34. týdnu gestace vs. fyziologická gravidita. U pacientek s preeklampií s nebo bez FGR, které rodily po 34. týdnu gestace, došlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení exprese **Hsp27** ($p = 0,001$), **Hsp90 α** ($p = 0,05$) a **HspBP1** ($p = 0,05$), viz graf 4. Zbylé dva systémy (Hsp60: $p = 0,552$ a Hsp70: $p = 0,172$) nevykazovaly změnu exprese.

Stejně jako u závažné preeklampsie ani ženy s preeklampií s nebo bez FGR, u kterých muselo být těhotenství ukončeno před 34. týdnem gestace, nevykazovaly rozdíl v expresi mRNA hsp ve srovnání s fyziologickými graviditami (Hsp27: $p=0,428$; Hsp60: $p=0,854$; Hsp70: $p=1,0$; Hsp90 α : $p=0,405$; HspBP1: $p=1,0$).

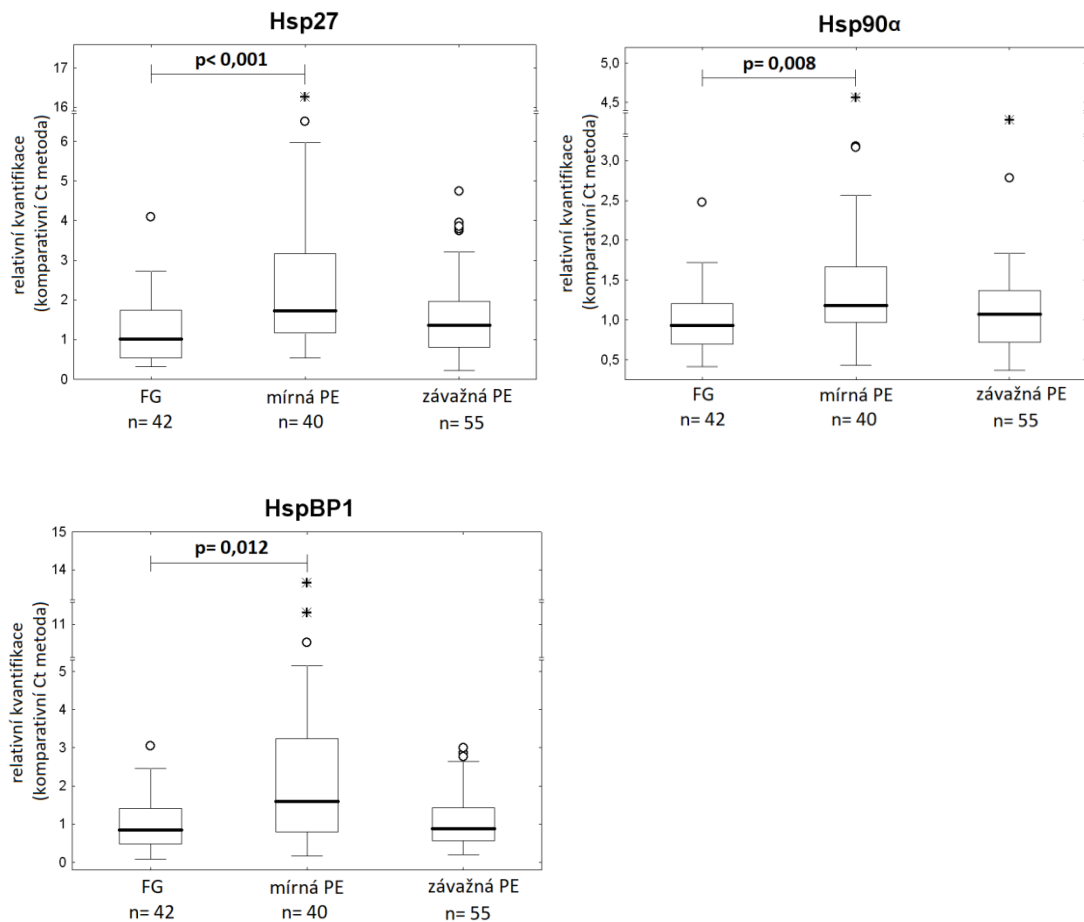
Dále jsme ženy s preeklampií +/- FGR rozdělili do skupin 4 skupin, které jsme mezi sebou porovnávali: mírná PE s porodem před 34. týdnem vs. mírná PE s porodem po 34. týdnu vs. závažná PE s porodem před 34. týdnem vs. závažná PE s porodem po 34. týdnu. V této analýze vyšlo statisticky signifikantní zvýšení exprese mRNA **Hsp27 ($p=0,046$)** a **HspBP1 ($p=0,024$)** u pacientek s mírnou preeklampií, které rodily po 34. týdnu těhotenství ve srovnání s ženami se závažnou preeklampií, u nichž bylo ukončeno těhotenství před 34. týdnem gestace (viz graf 5).

Dále jsme zjišťovali, zda existuje rozdíl v expresi mRNA hsp mezi skupinou pacientek s preeklampií +/- FGR, u kterých preeklampsie nasedala na předchozí hypertenzi a mezi pacientkami s preeklampií +/- FGR, u kterých došlo k náhlému rozvoji preeklampsie až během těhotenství. Statistická analýza (Mann-Whitney U-test) neodhalila žádné změny mezi skupinou pacientek s preeklampií superponovanou na chronickou hypertenzi a skupinou žen s náhlým rozvojem preeklampsie bez předchozí hypertenze (Hsp27: $p=0,259$; Hsp60: $p=0,439$; Hsp70: $p=0,889$; Hsp90 α : $p=0,396$; HspBP1: $p=0,561$).

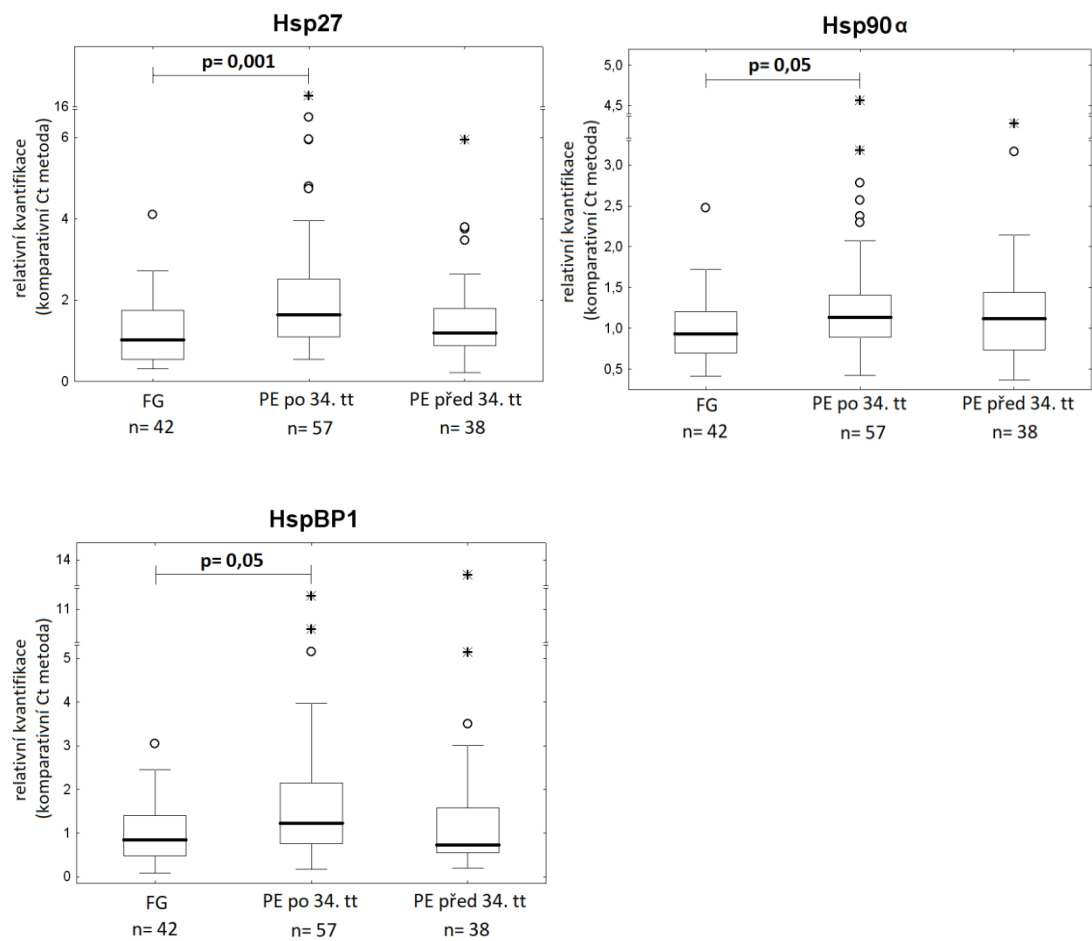
Nakonec jsme se zaměřili na zhodnocení vztahu mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a prenatálními parametry Dopplerovské ultrasonografie. Zjišťovali jsme, zda existuje rozdíl mezi skupinami pacientek s patologickým průběhem těhotenství (preeklampsie a/nebo fetální růstová restrikce), které mají normální a abnormální hodnoty průtoků v *arteria umbilicalis*, *arteria cerebri media* a normální či abnormální hodnoty cerebroplacentárního poměru (CPR). Pro statistické vyhodnocení byl použit Mann-Whitney U-test. Statistická analýza neprokázala vliv indexu pulsatility v *arteria umbilicalis* na expresi mRNA proteinů tepelného šoku v placentární tkáni – Hsp27: $p=0,418$; Hsp60: $p=0,862$; Hsp70: $p=0,264$; Hsp90 α : $p=0,695$; HspBP1: $p=0,184$. Index pulsatility v *arteria cerebri media* také neukázal žádný statisticky signifikantní rozdíl mezi uvedenými skupinami – Hsp27: $p=0,685$; Hsp60: $p=0,784$; Hsp70: $p=0,813$; Hsp90 α : $p=0,977$; HspBP1:

$p = 0,462$. Ani cerebroplacentární poměr neměl vliv na genovou expresi hsp v placentární tkáni – Hsp27: $p = 0,964$; Hsp60: $p = 0,468$; Hsp70: $p = 0,404$; Hsp90 α : $p = 0,907$; HspBP1: $p = 0,317$.

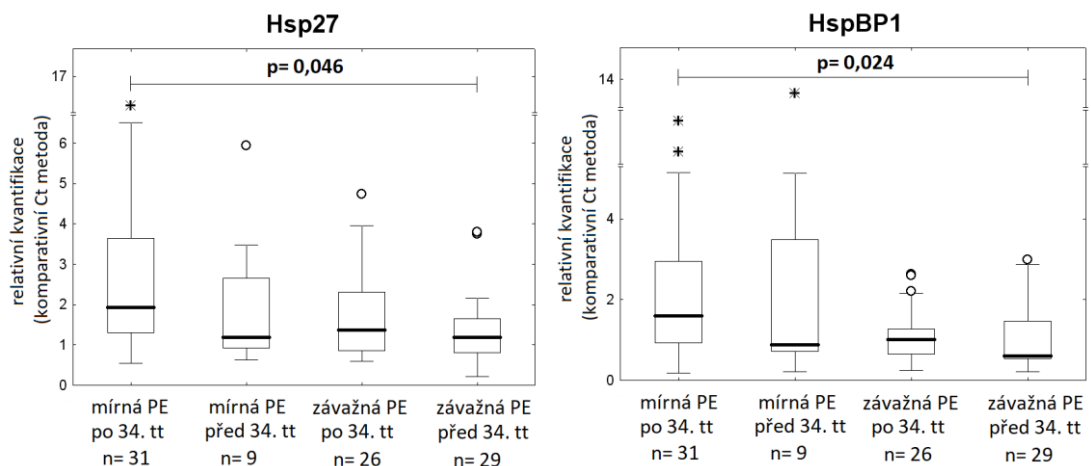
Graf 3: Upregulace Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 v placentární tkáni u pacientek s mírnou preeklampsii



Graf 4: Upregulace Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 v placentární tkáni u pacientek s PE+/- FGR s onsetem onemocnění po 34. týdnu gestace



Graf 5: Upregulace Hsp27 a HspBP1 v placentární tkáni u pacientek s mírnou PE, které rodily po 34. týdnu gestace ve srovnání s pacientkami se závažnou formou preeklampsie, u kterých bylo ukončeno těhotenství před 34. týdnem gestace



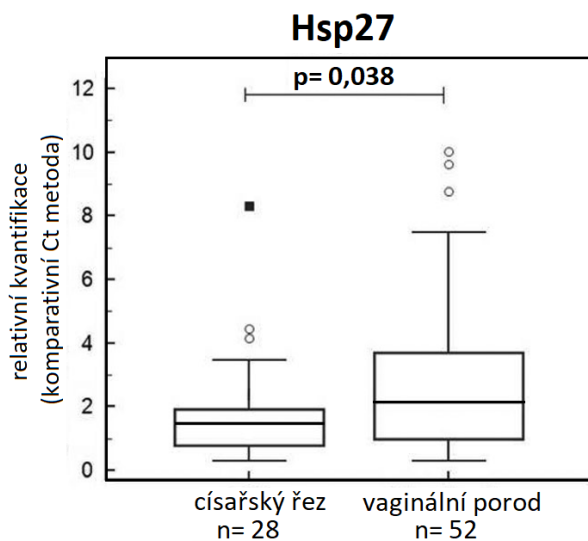
7.1.2 Expresní profil proteinů tepelného šoku v placentární tkáni u těhotenství s PPROM s výskytem HCA a bez přítomnosti HCA

Pacientky s předčasným odtokem plodové vody byly rozděleny do dvou skupin v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti histologické chorioamnionitidy. Ke statistické analýze byl použit Mann-Whitney U-test, který neprokázal žádný statisticky významný rozdíl v expresi hsp mezi skupinami HCA-pozitivních a HCA-negativních pacientek (Hsp27: $p=0,804$; Hsp60: $p=0,427$; Hsp70: $p=0,504$; Hsp90 α : $p=0,679$; HspBP1: $p=0,775$).

7.1.3 Vliv způsobu porodu na genovou expresi hsp v placentární tkáni v rámci skupin PPROM, PTB a fyziologických gravidit

V rámci každé skupiny byly ženy rozděleny podle způsobu porodu – vaginální porod vs. císařský řez. Data byla hodnocena pomocí Mann-Whitney-U testu. V rámci skupiny spontánní předčasný porod nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v genové expresi hsp mezi skupinami žen, které rodily vaginálně a císařským řezem (Hsp27: $p=1,0$; Hsp60: $p=0,227$; Hsp70: $p=0,812$; Hsp90 α : $p=0,516$; HspBP1: $p=0,201$). Ve skupině pacientek s PPROM bylo zjištěno statisticky signifikantní zvýšení exprese **Hsp27 ($p=0,038$)** u žen, které rodily vaginálně ve srovnání se skupinou žen, které rodily císařským řezem (viz graf 6). Zbylé hsp systémy nevykazovaly žádné změny v genové expresi mezi uvedenými skupinami (Hsp60: $p=0,498$; Hsp70: $p=0,219$; Hsp90 α : $p=0,604$; HspBP1: $p=0,791$). Ani ve skupině žen s fyziologickou graviditou, které rodily v termínu, nebyly zaznamenány žádné změny v expresi proteinů tepelného šoku (Hsp27: $p=0,382$; Hsp60: $p=0,417$; Hsp70: $p=0,613$; Hsp90 α : $p=0,510$; HspBP1: $p=0,305$).

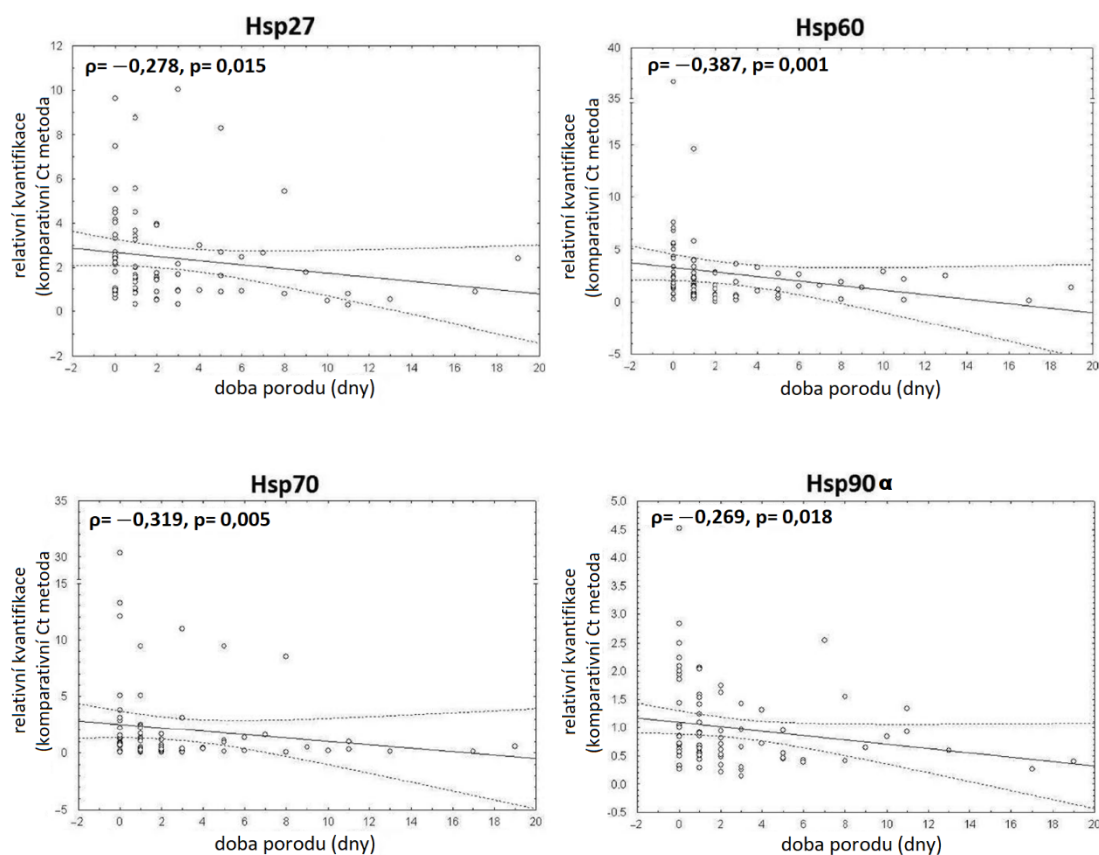
Graf 6: Signifikantně zvýšená genová exprese Hsp27 u žen s PPRM, které rodily vaginálně ve srovnání s ženami, které rodily císařským řezem



7.1.4 Vliv doby mezi odtokem plodové vody a porodem na genovou expresi hsp v placentární tkáni ve skupině pacientek s PPRM

Dále jsme studovali, zda má na expresi proteinů tepelného šoku vliv doba mezi odtokem plodové vody a porodem u pacientek s PPRM. Rozhodnutí o tom, zda má být těhotenství již ukončeno, záleželo na gestačním věku a stavu plodu. Pokud měly pacientky intrauterinní infekci, abrupci placenty nebo plod vykazoval známky distresu, porod byl indukován okamžitě, bez ohledu na gestační věk. Pro statistickou analýzu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Výsledky analýzy ukázaly slabou negativní korelaci mezi dobou mezi odtokem plodové vody a porodem a genovou expresí hsp v placentární tkáni u pacientek s PPRM (**Hsp27: $\rho = -0,278$, $p = 0,015$; Hsp60: $\rho = -0,387$, $p = 0,001$; Hsp70: $\rho = -0,319$, $p = 0,005$; Hsp90 α : $\rho = -0,269$, $p = 0,018$; HspBP1: $\rho = -0,153$, $p = 0,183$), což znamená, že exprese většiny hsp klesá s narůstající dobou mezi odtokem plodové vody a porodem (graf 7).**

Graf 7: Vliv doby mezi odtokem plodové vody a porodem na genovou expresi hsp v placentární tkáni u skupiny žen s PPROM



7.1.5 Asociace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí hsp v placentární tkáni ve skupinách PPROM a PTB

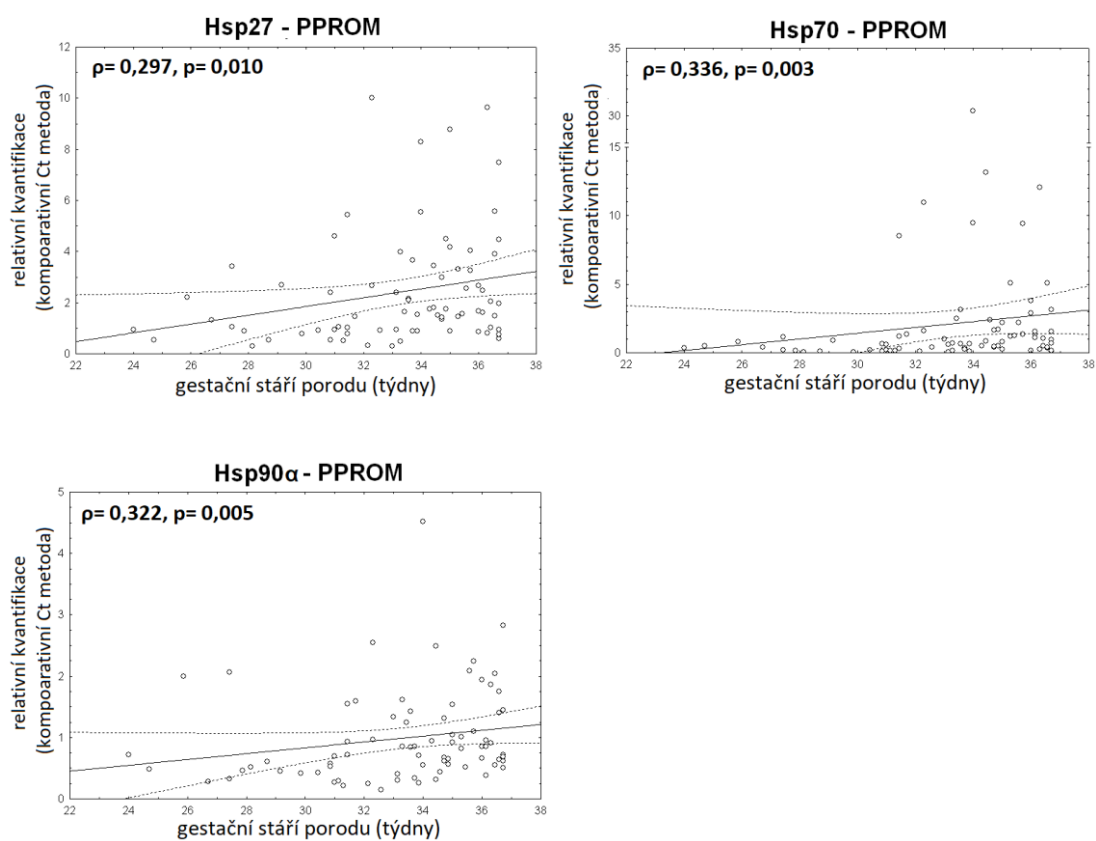
Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byl zjišťován vztah mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí jednotlivých hsp ve skupině pacientek s PPROM a dále pak u pacientek se spontánním předčasným porodem. Byla zjištěna slabá pozitivní korelace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí **Hsp27** ($\rho = 0,297$, $p = 0,010$), **Hsp70** ($\rho = 0,336$, $p = 0,003$) a **Hsp90 α** ($\rho = 0,322$, $p = 0,005$) u žen s PPROM (graf 8). Hsp60 ($\rho = 0,216$, $p = 0,060$) a HspBP1 ($\rho = 0,006$, $p = 0,959$) nevykazovaly žádnou statisticky významnou korelaci ve skupině PPROM.

Ve skupině žen se spontánním předčasným porodem byla nalezena silná pozitivní korelace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí **Hsp27** ($\rho = 0,668$,

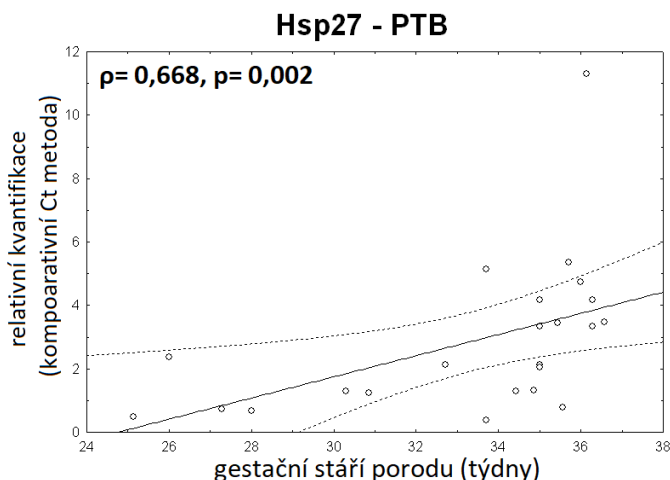
$p= 0,002$), viz graf 9. Expresí ostatních hsp v placentách žen se spontánním předčasným porodem se nelišila s ohledem na gestační stáří v době porodu (Hsp60: $\rho= -0,035$, $p= 0,871$; Hsp70: $\rho= 0,393$, $p= 0,065$; Hsp90 α : $\rho= 0,340$, $p= 0,110$; HspBP1: $\rho= 0,261$, $p= 0,221$).

Tyto výsledky naznačují, že těhotenství s PPRM a PTB vykazují zvýšenou expresi některých hsp v placentární tkáni s narůstajícím gestačním stářím v době porodu.

Graf 8: Slabá pozitivní korelace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí Hsp27, Hsp70 a Hsp90 α v placentární tkáni u žen s PPRM



Graf 9: Silná pozitivní korelace mezi gestačním stářím v době porodu a genovou expresí Hsp27 v placentární tkáni u žen se spontánním předčasným porodem



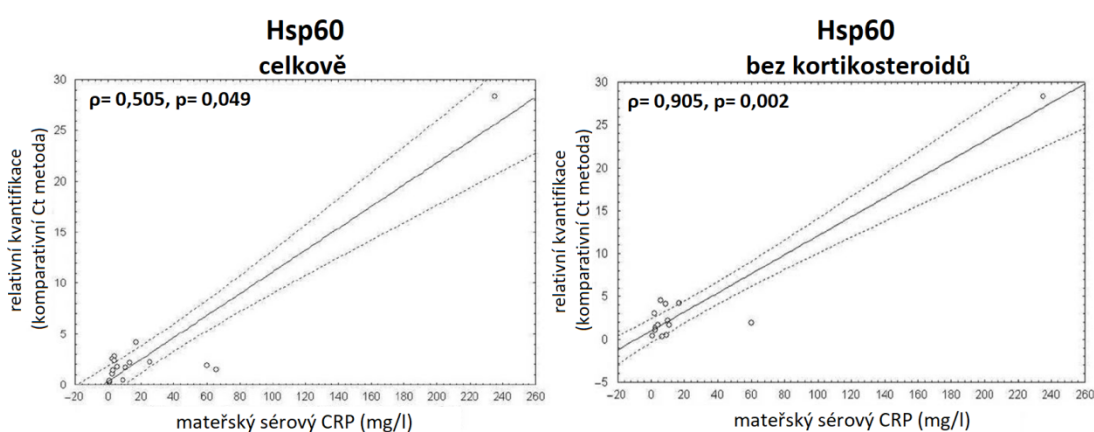
7.1.6 Asociace mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a koncentrací CRP v mateřském séru ve skupinách PPROM a PTB s ohledem na antenatální profylaktické podání kortikosteroidů

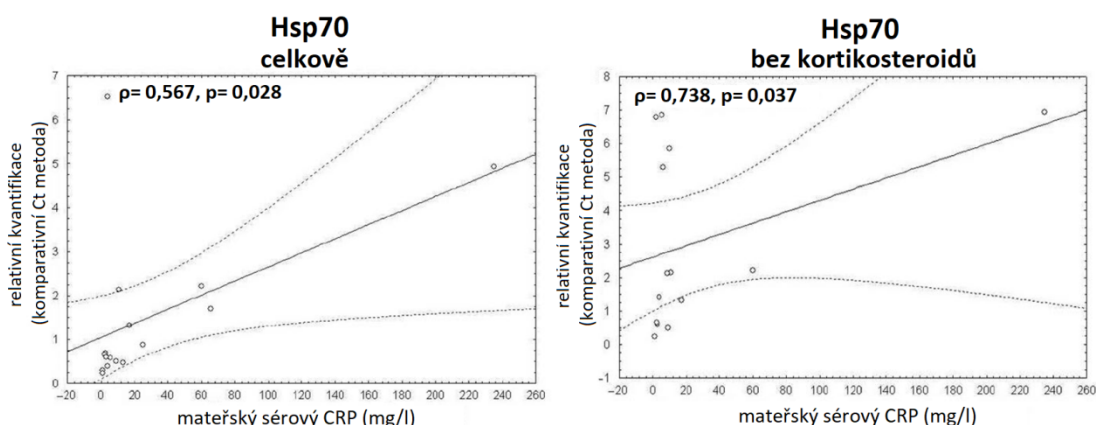
U pacientek s předčasným porodem (PPROM i PTB) jsme sledovali, zda existuje vztah mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a koncentracemi CRP v mateřském séru, a to s ohledem na antenatální podání kortikosteroidů. Korelace byla provedena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Ve skupině žen s PPROM byly podány profylaktické antenatální kortikosteroidy u 57 případů, a 23 ženám kortikosteroidy podány nebyly. Ve skupině spontánních předčasných porodů bylo nutné podání profylaktických antenatálních kortikosteroidů u 19 žen a 11 žen bylo bez léčby. U žen s PPROM nebyla nalezena žádná asociace mezi hladinami sérového CRP a genovou expresí hsp v placentární tkáni (Hsp27: $\rho = -0,157$, $p = 0,189$; Hsp60: $\rho = -0,144$, $p = 0,228$; Hsp70: $\rho = -0,124$, $p = 0,300$; Hsp90 α : $\rho = -0,203$, $p = 0,090$; HspBP1: $\rho = 0,053$, $p = 0,658$). Ani profylaktické antenatální podání kortikosteroidů nemělo vliv na asociaci mezi expresí hsp v placentě a koncentracemi CRP v mateřském séru. Ženy s PPROM po 34. týdnu, které nepotřebovaly profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů, vykazovaly podobné výsledky (Hsp27: $\rho = 0,140$, $p = 0,437$; Hsp60: $\rho = 0,145$, $p = 0,419$; Hsp70: $\rho = 0,243$, $p = 0,175$; Hsp90 α : $\rho = -0,031$, $p = 0,864$; HspBP1: $\rho = 0,242$, $p = 0,175$) jako ženy s PPROM, kterým byly podány profylaktické antenatální kortikosteroidy (Hsp27: $\rho = -0,257$, $p =$

0,119; Hsp60: $\rho = -0,216$, $p = 0,194$; Hsp70: $\rho = -0,278$, $p = 0,092$; Hsp90 α : $\rho = -0,296$, $p = 0,072$; HspBP1: $\rho = -0,077$, $p = 0,646$).

Nicméně, u žen se spontánním předčasným porodem byla pozorována silná pozitivní korelace mezi genovou expresí **Hsp60** ($\rho = 0,505$, $p = 0,049$) a **Hsp70** ($\rho = 0,567$, $p = 0,028$) v placentární tkáni a koncentracemi CRP v mateřském séru (graf 10). Zbylé tři hsp systémy nevykazovaly žádnou korelaci (Hsp27: $\rho = 0,191$, $p = 0,459$; Hsp90 α : $\rho = 0,153$, $p = 0,553$; HspBP1: $\rho = 0,372$, $p = 0,149$). Následná analýza podskupin s ohledem na profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů odhalila, že pacientky se spontánním předčasným porodem, kterým nebyly podány kortikosteroidy, také vykazovaly silnou pozitivní korelaci mezi genovou expresí **Hsp60** ($\rho = 0,905$, $p = 0,002$) a **Hsp70** ($\rho = 0,738$, $p = 0,037$) v placentě a koncentracemi CRP v mateřském séru (graf 10). Avšak tyto hsp systémy nevykazovaly žádnou korelaci u žen se spontánním předčasným porodem, kterým byly podány profylaktické antenatální kortikosteroidy (Hsp60: $\rho = -0,214$, $p = 0,610$; Hsp70: $\rho = 0,405$, $p = 0,320$).

Graf 10: Silná pozitivní korelace mezi genovou expresí Hsp60 a Hsp70 v placentární tkáni u žen s PTB a mateřským sérovým CRP – bez ohledu a s ohledem na profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů





7.1.7 Vztah mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a počtem leukocytů v krvi pacientek s PPROM a PTB s ohledem na profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů

Nakonec byl posuzován vztah mezi genovou expresí hsp v placentě a počtem leukocytů v krvi u žen s PPROM a PTB. Opět byl použit Spearmanův korelační koeficient. Nebyla nalezena žádná asociace mezi počtem leukocytů v krvi matky a genovou expresí hsp ani u žen s PPROM (Hsp27: $\rho = 0,017$, $p = 0,881$; Hsp60: $\rho = -0,191$, $p = 0,101$; Hsp70: $\rho = -0,060$, $p = 0,604$; Hsp90 α : $\rho = -0,073$, $p = 0,527$, HspBP1: $\rho = -0,067$, $p = 0,565$) ani u žen se spontánním předčasným porodem (Hsp27: $\rho = -0,193$, $p = 0,426$; Hsp60: $\rho = 0,236$, $p = 0,330$; Hsp70: $\rho = 0,107$, $p = 0,658$; Hsp90 α : $\rho = -0,178$, $p = 0,464$; HspBP1: $\rho = -0,286$, $p = 0,238$).

Ani profylaktické podání antenatálních kortikosteroidů nemělo žádný vliv na vztah mezi genovou expresí hsp v placentární tkáni a počtem leukocytů v krvi matky ve skupinách žen s PPROM a PTB [ženy s PTB, kterým nebyly podány kortikosteroidy (11 případů) – Hsp27: $\rho = -0,467$, $p = 0,174$; Hsp60: $\rho = 0,042$, $p = 0,907$; Hsp70: $\rho = -0,067$, $p = 0,855$; Hsp90 α : $\rho = -0,491$, $p = 0,150$, HspBP1: $\rho = -0,515$, $p = 0,128$; ženy s PTB, kterým byly podány kortikosteroidy (19 případů) - Hsp27: $\rho = 0,286$, $p = 0,493$; Hsp60: $\rho = 0,405$, $p = 0,320$; Hsp70: $\rho = 0,524$, $p = 0,183$; Hsp90 α : $\rho = 0,238$, $p = 0,570$, HspBP1: $\rho = 0,095$, $p = 0,823$; ženy s PPROM, kterým nebyly podány kortikosteroidy (23 případů) - Hsp27: $\rho = 0,230$, $p = 0,172$; Hsp60: $\rho = -0,121$, $p = 0,477$; Hsp70: $\rho = 0,192$, $p = 0,255$; Hsp90 α : $\rho = 0,122$, $p = 0,471$, HspBP1: $\rho = -0,177$, $p = 0,294$; ženy s PPROM, kterým byly podány kortikosteroidy (57 případů) - Hsp27:

$\rho = -0,055$, $p = 0,748$; Hsp60: $\rho = -0,096$, $p = 0,570$; Hsp70: $\rho = -0,033$, $p = 0,846$; Hsp90 α : $\rho = -0,056$, $p = 0,744$, HspBP1: $\rho = 0,056$, $p = 0,744$].

7.2 Genová exprese proteinů tepelného šoku v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s těhotenskými komplikacemi

Pacientky byly opět rozděleny do několika skupin na základě výskytu konkrétní těhotenské komplikace. Těmito skupinami byly preeklampsie s výskytem nebo bez výskytu fetální růstové restrikce (PE+/-FGR), fetální růstová restrikce (FGR), gestační hypertenze (GH) a skupina žen s normálním průběhem těhotenství (FG). Skupinová analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallis testu.

Základní analýza ukázala statisticky signifikantní zvýšení genové exprese **Hsp60** ($p = 0,006$) a **Hsp70** ($p < 0,001$) a snížení genové exprese **Hsp90 α** ($p < 0,001$) u žen s těhotenskými komplikacemi.

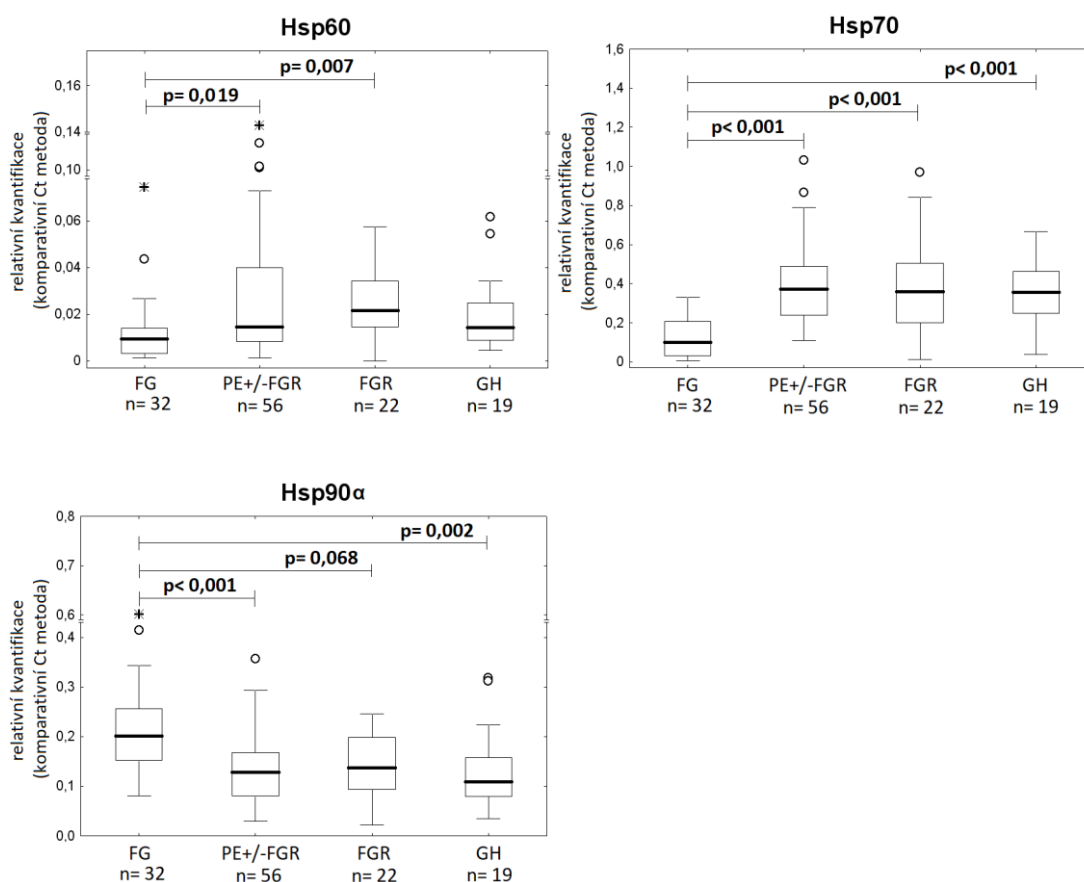
Při detailnějším rozdělení do jednotlivých skupin bylo pozorováno statisticky signifikantní zvýšení genové exprese Hsp70, a to ve všech námi sledovaných skupinách patologických gravidit – PE+/-FGR (**Hsp70: $p < 0,001$**), FGR (**Hsp70: $p < 0,001$**), GH (**Hsp70: $p < 0,001$**) ve srovnání se skupinou žen s fyziologickým průběhem gestace, viz graf 11.

Hsp60 vykazoval statisticky signifikantní zvýšení genové exprese oproti fyziologické skupině u skupiny žen s PE+/-FGR (**Hsp60: $p = 0,019$**) a u žen s fetální růstovou restrikcí (**Hsp60: $p = 0,007$**). Gestační hypertenze nevykazovala změny v expresi Hsp60 ($p = 0,339$) oproti fyziologické skupině, viz graf 11.

Hsp90 α vykazoval statisticky významné snížení genové exprese u skupiny pacientek s PE+/-FGR (**Hsp90 α : $p < 0,001$**) a gestační hypertenzí (**Hsp90 α : $p = 0,002$**) ve srovnání s fyziologickou skupinou. V případě fetální růstové restrikce se projevil trend k downregulaci Hsp90 α oproti normálnímu průběhu těhotenství, nicméně p hodnota nedosáhla hladiny signifikance (Hsp90 α : $p = 0,068$), viz graf 11.

U systémů Hsp27 a HspBP1 nebyla detekována signifikantní změna genové exprese u patologických gravidit v porovnání s fyziologickou graviditou – PE+/-FGR (Hsp27: $p=1,0$; HspBP1: $p=1,0$), FGR (Hsp27: $p=1,0$; HspBP1: $p=1,0$) a GH (Hsp27: $p=1,0$; HspBP1: $p=0,342$).

Graf 11: Genová exprese Hsp60, Hsp70 a Hsp90 α v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s těhotenskými komplikacemi



7.2.1 Asociace mezi genovou expresí hsp v mateřské plné periferní žilní krvi a závažností preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografií

Ženy s preeklampií s nebo bez FGR byly rozděleny na základě závažnosti klinických příznaků do dvou skupin – mírná PE a závažná PE. Další dělení do skupin bylo provedeno na základě gestačního stáří v době porodu – ženy, které rodily před

34. týdnem těhotenství, a ženy, které rodily po 34. týdnu gestace. Dále jsme studovali skupiny žen s ohledem na výskyt chronické hypertenze (PE superponovaná na předchozí hypertenzi vs. náhlý onset PE) a nakonec jsme hodnotili vztah genové exprese hsp k prenatálním parametrům Dopplerovské ultrasonografie.

U mírné preeklampsie došlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení genové exprese **Hsp60** ($p= 0,027$) a **Hsp70** ($p< 0,001$) a k downregulaci **Hsp90 α** ($p= 0,016$) ve srovnání s fyziologickými graviditami. Obdobné výsledky byly získány také pro závažnou preeklampsii – trend k upregulaci **Hsp60** ($p= 0,063$) a upregulace **Hsp70** ($p< 0,001$) a downregulace **Hsp90 α** ($p< 0,001$) (graf 12). Hsp27 nevykazoval žádnou změnu genové exprese ani u mírné (Hsp27: $p= 1,0$) ani u závažné (Hsp27: $p= 0,078$) preeklampsie. Žádná změna genové exprese nebyla pozorována ani u HspBP1 – mírná PE: $p= 1,0$, závažná PE: $p= 1,0$.

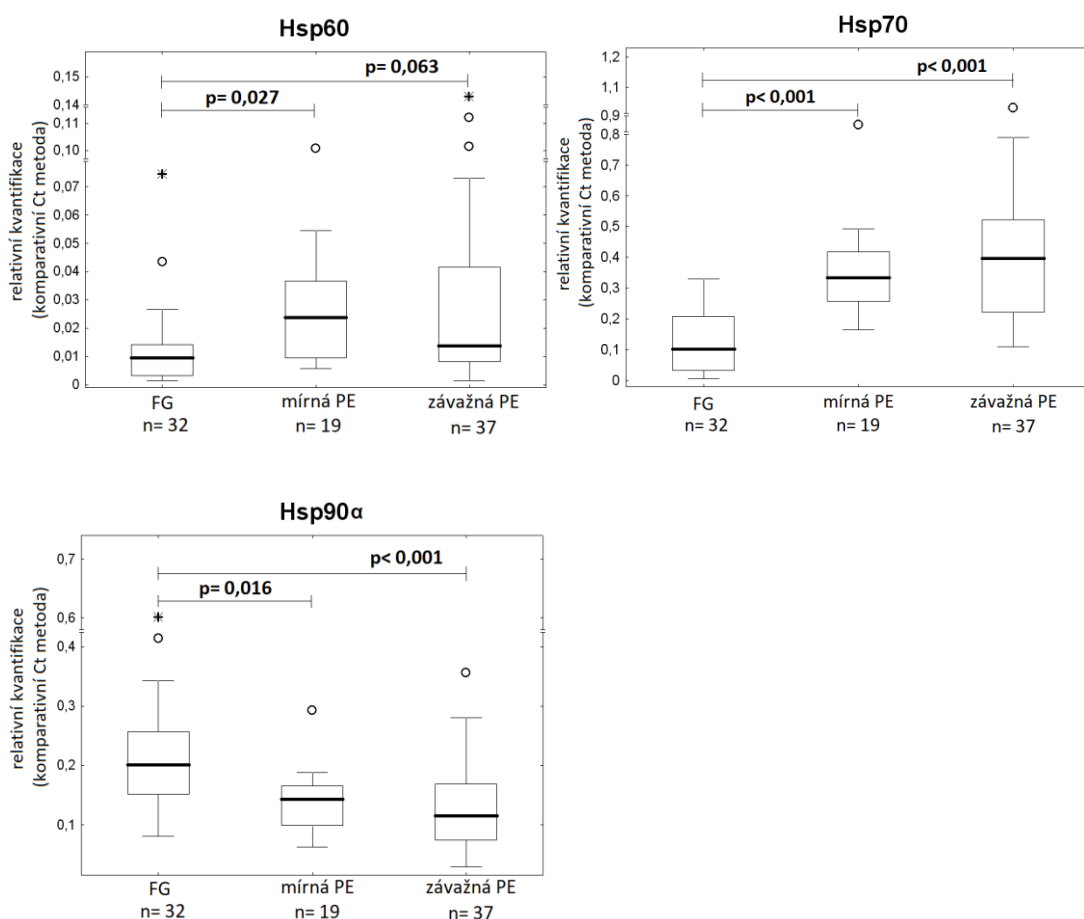
Gestační stáří v době porodu mělo rovněž vliv na genovou expresi jednotlivých hsp v mateřské plné periferní žilní krvi. Jak u žen s preeklampií, které rodily před 34. týdnem těhotenství, tak u žen, které rodily po 34. týdnu těhotenství došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese **Hsp60** ($p= 0,039$, $p= 0,003$) a **Hsp70** ($p< 0,001$, $p< 0,001$) a ke statisticky významné downregulaci **Hsp90 α** ($p< 0,001$, $p= 0,005$) oproti ženám s normálním průběhem těhotenství. Výsledky jsou znázorněny v grafu 13. Systémy Hsp27 a HspBP1 nevykazovaly žádnou změnu exprese ani u žen s PE, které rodily před 34. týdnem (Hsp27: $p= 0,477$; HspBP1: $p= 1,0$) ani u žen s PE, které rodily po 34. týdnu těhotenství (Hsp27: $p= 0,489$; HspBP1: $p= 1,0$) ve srovnání s fyziologickými kontrolami.

Obdobně jako v placentární tkáni ani v plné periferní žilní krvi matky nebyl detekován rozdíl v genové expresi hsp mezi pacientkami s preeklampií superponovanou na chronickou hypertenzi a ženami s náhlým výskytem preeklampsie bez předchozí hypertenze (Hsp27: $p= 0,866$; Hsp60: $p= 0,688$; Hsp70: $p= 0,076$; Hsp90 α : $p= 0,759$; HspBP1: $p= 0,602$).

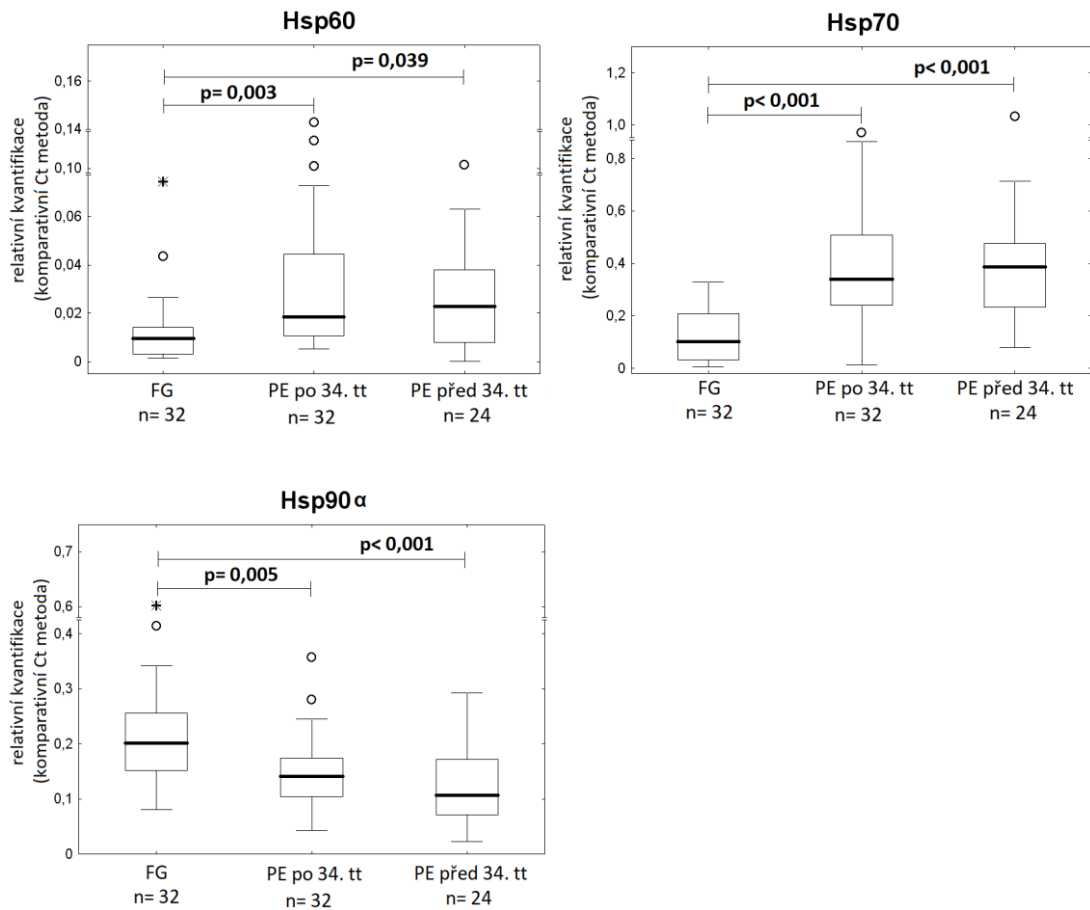
Dalšími sledovanými parametry byly index pulsatility v *arteria umbilicalis*, index pulsatility v *arteria cerebri media* a cerebroplacentární poměr u žen s preeklampií a nebo fetální růstovou restrikcí. Nebyl prokázán žádný efekt indexu pulsatility v

arteria umbilicalis (Hsp27: $p= 0,778$; Hsp60: $p= 0,209$; Hsp70: $p= 0,169$; Hsp90 α : $p= 0,898$; HspBP1: $p= 0,885$), indexu pulsatility v *arteria cerebri media* (Hsp27: $p= 0,408$; Hsp70: $p= 0,506$; Hsp90 α : $p= 0,372$, HspBP1: $p= 0,340$) a cerebroplacentárního poměru (Hsp27: $p= 0,249$; Hsp70: $p= 0,506$; Hsp90 α : $p= 0,355$; HspBP1: $p= 0,957$) na genovou expresi hsp v mateřské plné periferní žilní krvi. Pouze Hsp60 vykazoval statisticky signifikantní zvýšení exprese u pacientek s PE a/nebo FGR, které měly patologické průtoky v *arteria cerebri media* (**Hsp60: $p= 0,023$**) a patologický cerebroplacentární poměr (**Hsp60: $p= 0,005$**), ve srovnání s fyziologickými graviditami (graf 14).

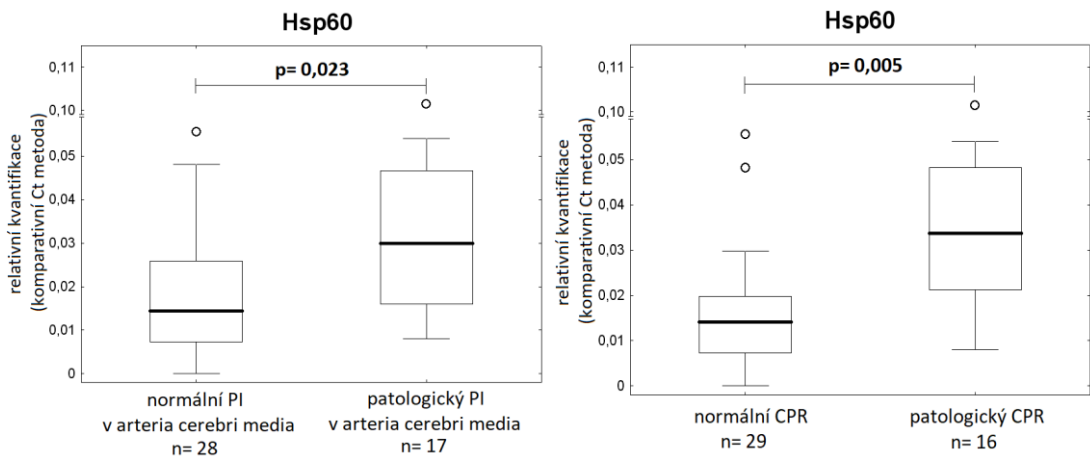
Graf 12: Upregulace Hsp60 a Hsp70 a downregulace Hsp90 α v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s mírnou a závažnou formou preeklampsie



Graf 13: Upregulace Hsp60 a Hsp70 a downregulace Hsp90 α v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s preeklamsií, které rodily před 34. týdnem a po 34. týdnu těhotenství



Graf 14: Zvýšení genové exprese Hsp60 v mateřské plné periferní žilní krvi u pacientek s PE a nebo FGR, které měly patologické průtoky v *arteria cerebri media* a patologický cerebroplacentární poměr



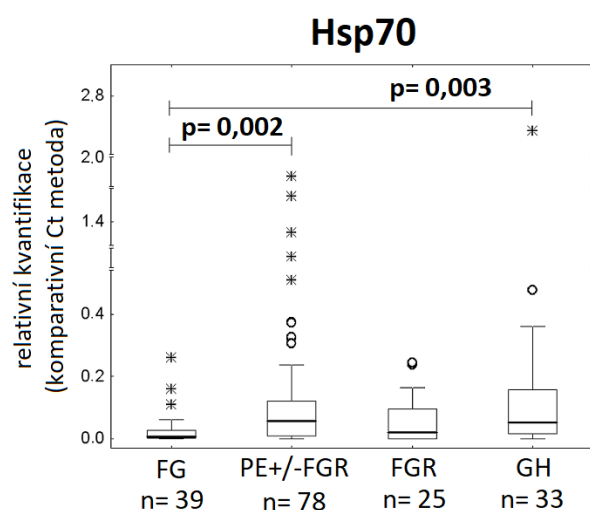
7.3 Genová exprese proteinů tepelného šoku v mateřské krevní plazmě u pacientek s těhotenskými komplikacemi

HspBP1 v mateřské krevní plazmě nebyl detekovatelný a Hsp60 amplifikoval pouze u některých vzorků plazem, proto bylo rozhodnuto o vyloučení těchto dvou hsp systémů ze studie a analýzy probíhaly pouze na systémech Hsp27, Hsp70 a Hsp90 α .

Pacientky byly opět rozděleny do jednotlivých skupin – fyziologická gravidita, preeklampsie s nebo bez fetální růstové restrikce, fetální růstová restrikce a gestační hypertenze.

Signifikantní zvýšení genové exprese v krevní plazmě bylo pozorováno pouze u **Hsp70 (p < 0,001)** u žen s těhotenskými komplikacemi (PE+/-FGR, FGR, GH) ve srovnání s ženami s normálním průběhem těhotenství. Následná Kruskal-Wallis analýza prokázala zvýšení genové exprese Hsp70 u pacientek s preeklampsií s nebo bez FGR (**Hsp70: p = 0,002**) a u žen s gestační hypertenzí (**Hsp70: p = 0,003**) ve srovnání s fyziologickou graviditou, výsledky jsou zaneseny v grafu 15. Fetální růstová restrikce nevykazovala změny v expresi Hsp70 (p = 0,996). U systémů Hsp27 a Hsp90 α nedošlo k významné změně genové exprese ani u skupiny žen s preeklampsií (Hsp27: p = 1,0; Hsp90 α : p = 0,271), ani u FGR (Hsp27: p = 1,0; Hsp90 α : p = 1,0) ani u pacientek s gestační hypertenzí (Hsp27: p = 1,0; Hsp90 α : p = 1,0).

Graf 15: Zvýšená genová exprese Hsp70 v krevní plazmě u žen s preeklampsii s nebo bez FGR a u žen s gestační hypertenzí



7.3.1 Asociace mezi genovou expresí hsp v mateřské krevní plazmě a závažností preeklampsie s ohledem na klinické příznaky, termín porodu a Dopplerovskou ultrasonografií

Ženy s preeklampsii s nebo bez FGR byly opět rozděleny do skupin podle závažnosti klinických příznaků na mírnou a závažnou preeklampsii. Další dělení proběhlo na základě gestačního stáří v době porodu – ukončení těhotenství před 34. týdnem a po 34. týdnu těhotenství. Následně byl zjišťován vliv superponované preeklampsie na chronickou hypertenzi na hsp expresi v plazmě matky a nakonec byla posuzována asociace mezi genovou expresí hsp v plazmě matky a prenatalními parametry Dopplerovské ultrasonografie.

Signifikantní zvýšení genové exprese Hsp70 oproti fyziologickým kontrolám bylo pozorováno jak u mírné preeklampsie (**Hsp70: p= 0,004**), tak u závažné preeklampsie (**Hsp70: p= 0,005**), viz graf 16. Zbylé dva hsp systémy nevykazovaly žádné změny genové exprese ani u mírné (Hsp27: p= 0,246; Hsp90α: p= 0,114) ani u závažné (Hsp27: p= 1,0; Hsp90α: p= 0,335) preeklampsie ve srovnání s normálním průběhem gravidity.

U těhotenství s preeklampsii s nebo bez FGR došlo také k signifikantnímu zvýšení genové exprese u Hsp70 jak u žen, které rodily před 34. týdnem (**Hsp70: p= 0,015**),

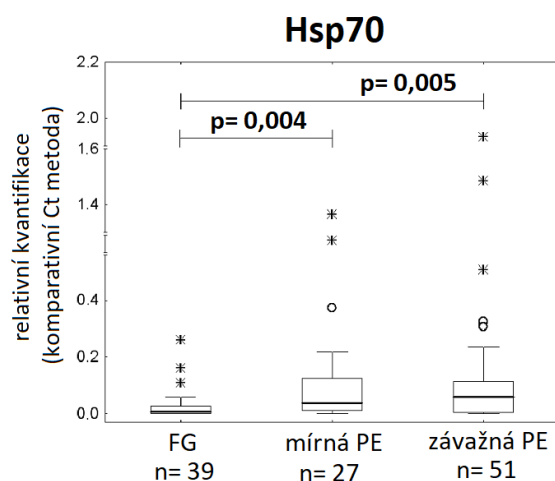
tak u žen, které rodily po 34. týdnu těhotenství (**Hsp70: p= 0,009**) v porovnání s fyziologickou graviditou (graf 17). U systémů Hsp27 a Hsp90α nedošlo ke statisticky významné změně genové exprese ani u žen, které rodily před 34. týdnem (Hsp27: p= 1,0; Hsp90α: p= 0,118) ani u žen, které rodily po 34. týdnu gestace (Hsp27: p= 0,183; Hsp90α: p= 0,348) ve srovnání s fyziologickými graviditami.

Ani v mateřské krevní plazmě se neobjevil rozdíl v genové expresi hsp mezi pacientkami s preeklampsií superponovanou na chronickou hypertenzi a ženami s náhlým výskytem preeklampsie bez předchozí hypertenze (Hsp27: p= 0,842; Hsp70: p= 0,761; Hsp90α: p= 0,937).

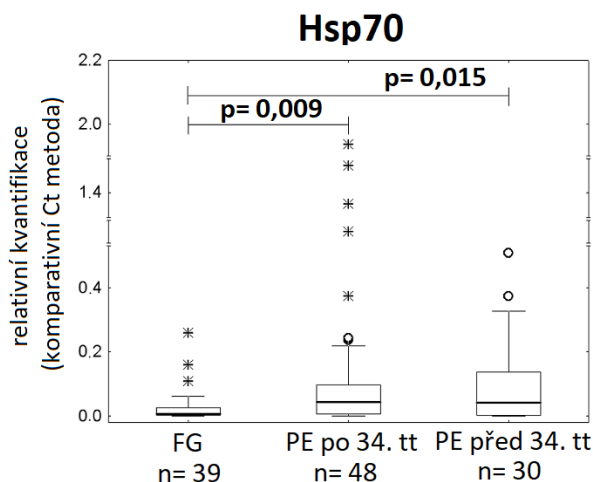
Posledními sledovanými parametry byly index pulsatility v *arteria umbilicalis*, index pulsatility v *arteria cerebri media* a cerebroplacentární poměr u žen s preeklampsií a nebo fetální růstovou restrikcí. Nebyl prokázán žádný efekt indexu pulsatility v *arteria umbilicalis* (Hsp27: p= 0,126; Hsp70: p= 0,872; Hsp90α: p= 0,199), indexu pulsatility v *arteria cerebri media* (Hsp27: p= 0,465; Hsp70: p= 0,392; Hsp90α: p= 0,465) ani cerebroplacentárního poměru (Hsp27: p= 0,145; Hsp70: p= 0,379; Hsp90α: p= 0,065) na genovou expresi hsp v krevní plazmě matek.

Tabulka 7 shrnuje dysregulaci genové exprese námi sledovaných proteinů tepelného šoku v jednotlivých typech biologického materiálu u konkrétních těhotenských komplikací.

Graf 16: Zvýšená genová exprese Hsp70 v mateřské krevní plazmě u pacientek s mírnou a závažnou preeklampsií



Graf 17: Zvýšená genová exprese Hsp70 v mateřské krevní plazmě u pacientek s preeklampsii s nebo bez FGR, které rodily před 34. týdnem a po 34. týdnu gestace



Tabulka 7: Souhrnné zhodnocení výsledků

Placenta	
Hsp27	↑ PE+/-FGR, ↑ mírná PE, ↑ PE po 34. tt, ↑ PPRM, ↑ PTB
Hsp60	↑ PPRM, ↑ PTB
Hsp70	↓ PPRM
Hsp90α	↑ mírná PE, ↑ PE po 34. tt
HspBP1	↑ mírná PE, ↑ PE po 34. tt, ↓ PPRM
Mateřská plná periferní žilní krev	
Hsp27	-
Hsp60	↑ PE+/-FGR, ↑ FGR, ↑ mírná PE, ↑ závažná PE (trend), ↑ PE před 34. tt, ↑ PE po 34. tt, ↑ patologický PI v <i>arteria cerebri media</i> , ↑ patologický CPR
Hsp70	↑ PE+/-FGR, ↑ FGR, ↑ GH, ↑ mírná PE, ↑ závažná PE, ↑ PE před 34. tt, ↑ PE po 34. tt
Hsp90α	↓ PE+/-FGR, ↓ FGR (trend), ↓ GH, ↓ mírná PE, ↓ závažná PE, ↓ PE před 34. tt, ↓ PE po 34. tt
HspBP1	-

Mateřská krevní plazma

Hsp27	-
Hsp60	-
Hsp70	↑ PE+/-FGR, ↑ GH, ↑ mírná PE, ↑ závažná PE, ↑ PE před 34. tt, ↑ PE po 34. tt
Hsp90α	-
HspBP1	-

8. Diskuze

U lidí se proteiny tepelného šoku vyskytují jak v buňkách (např. cytosol, jádro, centrozom, mitochondrie, endoplazmatické retikulum), membránově vázané, tak i v extracelulárním prostoru (např. krevní řečiště) a jejich exprese se zvyšuje při vystavení buněk stresu, např. vysoké teplotě, těžkým kovům, extrémnímu pH, infekci, zánětu, kyslíkovým radikálům nebo nedostatku živin a kyslíku. A právě během těhotenství, asociovaném s placentární insuficiencí nebo předčasným porodem, dochází k ischemii, oxidačnímu a hemodynamickému stresu a systémové zánětlivé odpovědi matky. Proto předpokládáme zvýšení genové exprese proteinů tepelného šoku u těchto gravidit. Cílem studie bylo prozkoumat expresní profil vybraných proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α a HspBP1) v placentární tkáni, plné periferní žilní krvi matky a krevní plazmě u žen s preeklampsii, fetální růstovou restrikcí, gestační hypertenzí, spontánním předčasným porodem a předčasným odtokem plodové vody.

Naše studie prokázala, že ani gestační hypertenze, ani fetální růstová restrikce nemají vliv na genovou expresi proteinů tepelného šoku v centrálním kotyledonu placentární tkáně. Zvýšená exprese byla zaznamenána pouze u Hsp27 u žen s preeklampsii s nebo bez fetální růstové restrikce ve srovnání s ženami s normálním průběhem těhotenství. Následná analýza ukázala, že těžké komplikace související s těhotenstvím, jako je závažná forma preeklampsie, která vyžaduje okamžité ukončení těhotenství císařským řezem, také neovlivnily hladiny mRNA proteinů tepelného šoku v placentě. Rozdílné hladiny mRNA exprese lze pozorovat v centrálním kotyledonu placenty pouze v případě mírné preeklampsie, která umožňuje další pokračování těhotenství, za předpokladu, že je pacientka pravidelně sledována a řádně léčena. Výsledky této studie ukazují zvýšení hladin mRNA v placentární tkáni u Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 u žen s mírnou preeklampsii a s preeklampsii vyskytující se po 34. týdnu gestace, což znamená, že placenta reaguje až na dlouhodoběji trvající patologické stavy (nedostatečný přísun mateřské krve spojený se sníženým přísunem živin a kyslíku do plodu) změnou genové exprese těchto proteinů [Hromadnikova et al, 2015]. V současné době existuje několik dalších studií, které se zabývají expresí proteinů tepelného šoku v placentární tkáni.

Studie z roku 1998 na normotenzních gravidních ženách ukazuje rozdílnou lokalizaci hsp v placentě v průběhu těhotenství [Shah et al, 1998]. V placentární tkáni byly Hsp60, Hsp70 a Hsp90 lokalizovány v cytotrofoblastu, syncytiotrofoblastu, intermediárním trofoblastu, Hofbauerových a endoteliálních buňkách. V buňkách se Hsp60 a Hsp90 nacházely primárně v jádře a Hsp70 byl nalezen jak v jádře, tak v cytoplazmě. Hsp27 byl v placentě nalezen pouze v intermediárním trofoblastu a syncytiotrofoblastu, a to jen v prvních dvou trimestrech [Shah et al, 1998]. Obdobné výsledky jako v naší studii získal Shin et al. v roce 2011 na placentách žen s preeklampsií v porovnání se zdravými kontrolami [Shin et al, 2011]. Pomocí imunohistochemické analýzy bylo prokázáno, že Hsp27 byl lokalizován převážně v buňkách trofoblastu a western blot analýza prokázala zvýšenou expresi Hsp27 v placentách žen s preeklampsií v porovnání se zdravými kontrolami [Shin et al, 2011]. Nicméně se nejednalo o genovou expresi Hsp27 a studie nehodnotila závažnost preeklampsie. Abdulsid et al. ve své studii srovnával hladiny Hsp27 mRNA mezi preeklamptickými a kontrolními skupinami v různých oblastech placenty s ohledem na vzdálenost od úponu pupečníku, avšak nenalezl změny v expresi Hsp27 mezi kontrolní a patologickou skupinou [Abdulsid & Lyall, 2013]. Do analýzy ovšem zahrnul pouze 6 pacientek v každé skupině, přičemž tak nízký počet vzorků nestačí k dosažení statistické významnosti.

V rozporu s naší studií jsou výsledky Liu a jeho týmu [Liu et al, 2008]. Liu pozoroval zvýšenou genovou i proteinovou expresi Hsp70 v placentě (není specifikována oblast placenty, která byla sledována) a v purifikovaných mikrovaskulárních endoteliálních buňkách u 28 pacientek s placentární insuficiencí (preeklampsie a IUGR). V této studii nebyl brán zřetel na závažnost onemocnění s ohledem na klinické příznaky a gestační stáří v době porodu [Liu et al, 2008]. Některé další výzkumy také potvrdily zvýšenou expresi Hsp70 v placentě během preeklampsie. Například Barut pozoroval zvýšenou hladinu Hsp70 v syncytiotrofoblastech, cytotrofoblastech a extravilózních trofoblastových buňkách u preeklamptických placent a placent s IUGR ve srovnání s normálním těhotenstvím [Barut et al, 2010].

Co se týče předčasných porodů, tak v dnešní době nejsou k dispozici žádné studie popisující vztah mezi genovou expresí hsp v placentě a patogenezí předčasného

porodu. Naše analýza odhalila zvýšenou genovou expresi Hsp27 a Hsp60 v placentě jak u pacientek se spontánním předčasným porodem, tak u žen s předčasným odtokem plodové vody ve srovnání s ženami, které porodily v termínu. Zdá se tedy, že reakce na stres v zóně centrálního kotyledonu placenty u spontánního předčasného porodu a předčasného odtoku plodové vody má rozdílný průběh v porovnání s porody v termínu. Analýza dále ukázala snížení genové exprese Hsp70 a HspBP1 v placentární tkáni u žen s předčasným odtokem plodové vody ve srovnání s normálním průběhem těhotenství, což naznačuje, že průběh porodu u těhotenství s PPRM se liší mnohem více od porodu v termínu než spontánní předčasný porod. U HspBP1 byl navíc pozorován rozdíl v genové expresi mezi skupinami PPRM a PTB. Vzhledem k tomu, že Hsp70 má anti-apoptickou funkci (inhibuje apoptózu) [Stankiewicz et al, 2005; Yang et al, 2012; Guo et al, 2005], snížené hladiny Hsp70 mRNA v placentě u pacientek s PPRM mohou vést k upregulaci proteinů, které se účastní biologických drah vedoucích k předčasnému stárnutí plodových obalů, kde hraje významnou roli senescence, apoptóza a proteolýza. Snížené hladiny HspBP1 mRNA v placentě mohou souviset se sníženou syntézou Hsp70 mRNA, z důvodu vytvoření funkčního komplexu Hsp70/HspBP1. HspBP1 se váže na Hsp70, inhibuje jeho chaperonovou aktivitu a podporuje disociaci nukleotidů z N-terminální ATPázové domény Hsp70 [Raynes & Guerriero, 1998]. Molární poměr HspBP1 k Hsp70 v buňkách je důležitým determinantem interakce mezi těmito dvěma proteiny, jakož i funkce výsledného komplexu. Naše studie nezjistila žádný rozdíl v poměru hladin mRNA HspBP1/Hsp70 v centrálním kotyledonu placenty mezi ženami s PPRM, PTB a normálním průběhem gravidity. Dále byla pozorována slabá pozitivní korelace mezi gestačním věkem v době porodu a genovou expresí Hsp70 v placentě ve skupině pacientek s PPRM. Vyšší hladiny Hsp70 mRNA v placentách v pozdějším gestačním věku mohou souviset se zpožděním ruptury plodových obalů tak, že Hsp70 inhibuje apoptózu plodových obalů [Dvorakova et al, 2017].

Obdobné zvýšení genové exprese Hsp27 v placentární tkáni jako u žen s PPRM a PTB bylo prokázáno také u pacientek s mírnou preeklampsií a preeklampsií s onsetem a dobou porodu po 34. týdnu těhotenství [Hromadnikova et al, 2015]. Upregulace cytoprotektivního a anti-apoptického Hsp27 u pacientek s PPRM,

PTB a preeklamsií může nastat jako fyziologická odpověď na přítomnost bakteriální infekce nebo nedostatečnou funkci placenty. Na druhou stranu Hsp90 α a HspBP1 byly upregulovány výhradně ve spojení s mírnou preeklamsií a preeklamsií s onsetem a dobou porodu po 34. týdnu těhotenství. Dále byl prokázán nárůst genové exprese Hsp27 ve skupinách PPRM i PTB se zvyšujícím se gestačním věkem, což může naznačovat funkční zapojení Hsp27 do stresové reakce přítomné v placentární tkáni, která nakonec vyústí v předčasný porod. Ačkoliv byla genová exprese Hsp70 u PPRM downregulována a hladina Hsp90 α mRNA se neměnila, nejvyšší hladiny Hsp70 a Hsp90 α mRNA byly detekovány u těhotenství s PPRM s narůstajícím gestačním věkem. Ani u jedné skupiny předčasných porodů nebyla pozorována žádná změna exprese hsp v placentární tkáni v souvislosti s počtem leukocytů v krvi matky. Obdobné výsledky byly zaznamenány také v souvislosti s hladinami CRP v séru u žen s PPRM. Přestože počet leukocytů v krvi matky a hladiny CRP nejsou specifické pro nitroděložní infekci a mohou být ovlivněny i jinými faktory, ve skupině pacientek s PTB byla zjištěna silná pozitivní korelace mezi genovou expresí Hsp60 a Hsp70 a hladinami CRP v mateřském séru.

V mateřské cirkulaci se odráží patologické stavy matky i plodu, a to velice záhy po výskytu těhotenské komplikace. Gestační hypertenze, preeklampsie i fetální růstová restrikce vždy vyvolaly upregulaci Hsp70 a downregulaci Hsp90 α v plné periferní žilní krvi matky. Závažnost preeklampsie ani gestační stáří v době porodu však neměly vliv na míru genové exprese Hsp70 a Hsp90 α v plné periferní žilní krvi matky. U obou hsp došlo ke změnám v genové expresi jak u mírné tak u závažné formy preeklampsie. V porovnání s fyziologickými graviditami se aberantní exprese Hsp70 a Hsp90 α rovněž vyskytovala jak u žen s preeklamsií, u kterých muselo být těhotenství ukončeno před 34. týdnem, tak u žen s preeklamsií, které rodily až po 34. týdnu gestace [Hromadnikova et al, 2015]. Naše výsledky podporují výsledky dalších studií, přestože tyto studie byly provedeny pouze na proteinové úrovni, a nikoliv na úrovni genové exprese, a rovněž popsaly zvýšené hladiny Hsp70 v séru a nebo plazmě u pacientek s tranzitní hypertenzí a preeklamsií v průběhu gravidity [Molvarec et al, 2006; Fukushima et al, 2005]. Jirecek et al. pozorovali zvýšené sérové hladiny Hsp70 u žen s časným onsetem závažné preeklampsie ve srovnání s pacientkami s pozdním nástupem závažné preeklampsie [Jirecek et al, 2002]. Naše

studie nezaznamenala žádný rozdíl mezi skupinami pacientek s PE s ohledem na závažnost a nebo dobu onsetu onemocnění, nicméně naše statistická analýza byla provedena separátně v jednotlivých skupinách pacientek [Hromadnikova et al, 2015].

Naše studie dále ukázala zvýšení genové exprese Hsp60 v plné periferní žilní krvi u žen s preeklampií a nebo fetální růstovou restrikcí oproti fyziologické graviditě. Gestační hypertenze v tomto případě nevykazovala žádné změny exprese Hsp60. Hladiny mRNA Hsp60 v mateřské krvi byly zvýšeny u mírné i u závažné preeklampsie, a to bez ohledu na gestační stáří v době porodu. Nicméně, nejvyšší hladiny mRNA Hsp60 byly pozorovány u těhotenství se známkami centralizace fetálního oběhu, což je silně asociováno se špatnou prognózou v důsledku přítomností fetální hypoxie. Centralizace fetálního oběhu představuje ochrannou reakci plodu proti hypoxii, která se projevuje redistribucí oběhu plodu do mozku, jater a srdce na úkor periférie.

Cirkulující nukleové kyseliny, vyskytující se v krevní plazmě nebo séru, se v dnešní době stále častěji využívají jako biomarkery pro sledování těhotenských komplikací. Zdrojem fetálních nukleových kyselin jsou apoptotická tělíska placentárního trofoblastu, která se uvolňují do mateřské cirkulace při remodelaci placenty v důsledku apoptózy a během normálního průběhu těhotenství dochází k narůstání hladin volné fetální DNA s gestačním věkem [Alberry et al, 2009]. Vzhledem k tomu, že při placentární insuficienci dochází k nadměrnému uvolňování apoptotických tělísek trofoblastu, tak dochází i ke zvýšenému výskytu fetálních nukleových kyselin v cirkulaci matky [Sifakis et al, 2009]. Předpokládáme, že mateřská cirkulace může odrážet jak patologický stav matky, tak placenty prostřednictvím genové exprese hsp. Vzhledem k tomu, že HspBP1 v mateřské krevní plazmě nebyl detekovatelný a Hsp60 amplifikoval pouze jen u některých vzorků mateřských krevních plazem, rozhodli jsme se vyloučit tyto dva hsp systémy ze studie a analýzy probíhaly pouze na systémech Hsp27, Hsp70 a Hsp90 α . Systémy Hsp27 a Hsp90 α nevykazovaly žádnou změnu genové exprese v krevní plazmě žen s těhotenskými komplikacemi ve srovnání s fyziologickou graviditou. Cirkulující Hsp70 byl jediný plazmatický marker, který odrážel mateřskou a placentární stresovou reakci na těhotenské komplikace na úrovni genové exprese. Zvýšené hladiny mRNA Hsp70 v krevní plazmě byly pozorovány u pacientek s preeklampií

s nebo bez fetální růstové restrikce a u žen s gestační hypertenzí ve srovnání s ženami s normálním průběhem těhotenství. Vzhledem k tomu, že zvýšená genová exprese Hsp70 v plazmě byla detekovaná jak ve skupině mírné, tak ve skupině závažné preeklampsie a zároveň u pacientek, které rodily před 34. týdnem i po 34. týdnu těhotenství ve srovnání s fyziologickým průběhem gravidity, nebyla zjištěna žádná souvislost mezi expresí Hsp70 v mateřské cirkulaci a závažností onemocnění [Hromadnikova et al, 2016]. Zvýšenou expresí Hsp70 u žen s preeklampsií nebo gestační hypertenzí popsali i další autoři, ovšem opět se jednalo o proteomické a nikoliv genomické studie [Jirecek et al, 2002; Molvarec et al, 2006; Molvarec et al, 2007; Molvarec et al, 2009; Peraçoli et al, 2013]. Zvýšené hladiny mRNA Hsp70 v mateřské cirkulaci mohou odrážet systémový zánět, oxidační stres, hepatocelulární poškození a placentární ischemii u žen s výskytem preeklampsie [Molvarec et al, 2009].

9. Závěr

Ve své disertační práci jsem sledovala vztah mezi genovou expresí proteinů tepelného šoku a vybranými těhotenskými komplikacemi (preeklampsie, fetální růstová restrikce, gestační hypertenze, spontánní předčasný porod, předčasný odtok plodové vody). K dispozici jsem měla vzorky placentární tkáně, plné periferní žilní krve a krevní plazmy matek v době výskytu těhotenských komplikací. Posuzovala jsem vliv závažnosti onemocnění na genovou expresi jednotlivých hsp a hodnotila jsem odpověď matky a placenty na stresové podmínky spojené s těhotenskými komplikacemi. Placentární tkáň reagovala zvýšenou expresí Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 v případě mírné preeklampsie, která nevyžadovala okamžité ukončení těhotenství, pokud byla řádně diagnostikována a léčena. Zvýšení hladin mRNA Hsp27 v placentě bylo také zjištěno u obou skupin předčasných porodů (PTB a PPRM). Naopak hladiny mRNA Hsp70 a HspBP1 jsou unikátně sniženy v placentární tkáni u předčasného odtoku plodové vody. V mateřské cirkulaci (plná periferní žilní krev) bylo zaznamenáno zvýšení genové exprese Hsp70 u preeklampsie a nebo FGR, a gestační hypertenze. Nicméně v krevní plazmě matky byly hladiny mRNA Hsp70 zvýšeny pouze u matek s preeklampií s nebo bez FGR, a gestační hypertenzí, ale nikoliv u těhotenství s diagnózou FGR. Hladiny mRNA Hsp70 byly v mateřské cirkulaci (jak v plné periferní žilní krvi, tak v krevní plazmě) zvýšeny bez ohledu na závažnost onemocnění s ohledem na klinickou symptomatologii a gestační stáří v době ukončení gravidity.

V plné periferní žilní krvi došlo navíc ke změnám genové exprese Hsp90 α (u PE, FGR i GH) a Hsp60 (u PE a FGR), ovšem v krevní plazmě matek žádné změny genové exprese těchto hsp zaznamenány nebyly. Genová exprese v plné periferní žilní krvi a krevní plazmě matek nebyla bohužel studována u předčasných porodů z důvodu absence biologického materiálu.

Vzhledem k tomu, že se upregulace Hsp70 u pacientek s preeklampií a gestační hypertenzí projevila jak v plné periferní žilní krvi, tak v krevní plazmě matek, což také potvrzují proteomické studie ostatních autorů, lze usuzovat, že Hsp70 dobře reflektuje systémovou odpověď matky na vzniklé těhotenské komplikace. V naší

studii sice nebyly zaznamenány změny genové exprese Hsp70 v placentě u žen s preeklampsií a gestační hypertenzí, ale v některých jiných studiích zvýšená exprese Hsp70 pozorována byla. Proto předpokládám, že Hsp70 v mateřské cirkulaci pochází také například z apoptotických tělísek placentárního trofoblastu, která se uvolňují do mateřské cirkulace při remodelaci placenty.

Studie byla financována výzkumnými programy Univerzity Karlovy PRVOUK P32 a PROGRES Q34.

10. Souhrn

Ve své disertační práci jsem sledovala genovou expresi proteinů tepelného šoku u vybraných těhotenských komplikací: preeklampsie, fetální růstová restrikce, gestační hypertenze, spontánní předčasný porod, předčasný odtok plodové vody. Pomocí kvantitativní RT-PCR v reálném čase jsem detekovala 5 hsp systémů – Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α a HspBP1.

Z výsledků je patrné, že placentární tkáň nereaguje změnou genové exprese námi sledovaných hsp na gestační hypertenzi, fetální růstovou restrikci a závažnou formu preeklampsie. Upregulace Hsp27, Hsp90 α a HspBP1 byla pozorována v placentární tkáni u mírné preeklampsie, která nevyžadovala okamžité ukončení těhotenství, pokud byla řádně léčena. V případě předčasných porodů došlo ke zvýšení genové exprese v placentě u Hsp27 a Hsp60, a to jak u žen s PPRoM, tak u žen s PTB. Dále došlo ke snížení genové exprese Hsp70 a HspBP1 v placentární tkáni u pacientek s PPRoM ve srovnání s normálním průběhem těhotenství. U HspBP1 byl navíc pozorován signifikantní rozdíl v genové expresi mezi skupinami PPRoM a PTB.

V plné periferní žilní krvi matek byla pozorována upregulace Hsp70 a downregulace Hsp90 α u pacientek s PE, FGR a GH bez ohledu na závažnost onemocnění a gestační stáří v době ukončení gravidity. Hsp60 byl rovněž upregulován, ale pouze u žen s PE a nebo FGR ve srovnání s normálním průběhem gravidity. V případě Hsp60 byl zaznamenán vliv závažnosti onemocnění na genovou expresi v plné periferní žilní krvi matek. Zvýšené hladiny mRNA Hsp60 byly detekovány u žen s preeklampsií a nebo FGR s patologickými průtoky v *arteria cerebri media* a přítomností centralizace oběhu plodu.

Jediným plazmatickým markerem, u kterého došlo k dysregulaci genové exprese v mateřské cirkulaci byl Hsp70. Zvýšené hladiny mRNA Hsp70 v krevní plazmě byly detekovány u pacientek s PE a GH jako systémová odpověď matky na výskyt těhotenské komplikace.

10. Summary

In my dissertation thesis, I studied the gene expression of heat shock proteins in the following pregnancy-related complications: preeclampsia, fetal growth restriction, gestational hypertension, spontaneous preterm birth and preterm prelabor rupture of membranes. Using real-time RT-PCR, I detected five hsp systems - Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α , and HspBP1.

The results show that placental tissue does not respond to gestational hypertension, fetal growth restriction, or severe preeclampsia with any change in expression of the studied hsps. Upregulation of Hsp27, Hsp90 α , and HspBP1 was observed in placental tissues affected with mild preeclampsia, which did not require immediate termination of pregnancy; as long as the condition was properly treated. In patients with preterm labor, the placental gene expression of Hsp27 and Hsp60 was increased, both in women with PPRM and PTB. Furthermore, gene expression of Hsp70 and HspBP1 was downregulated in placental tissues in PPRM patients when compared to women with normal pregnancies. In addition, the expression of HspBP1 differed significantly between the groups of women with PTB and PPRM.

Upregulation of Hsp70 and downregulation of Hsp90 α was observed in maternal whole peripheral venous blood of patients with PE, FGR, and GH, regardless of the disease severity or the gestational age of termination of pregnancy. Hsp60 was also upregulated, but only in women suffering from PE and/or FGR, compared to women with normal pregnancies. In the case of Hsp60, an effect of the disease severity on gene expression in maternal whole peripheral venous blood was noted. Increased levels of Hsp60 mRNA were detected in women with preeclampsia and/or FGR, with pathological flow rates in the middle cerebral artery and the presence of centralization of fetal circulation.

The sole plasmatic marker, whose gene expression in maternal circulation was dysregulated, was Hsp70. Increased Hsp70 mRNA levels in blood plasma were detected in both PE and GH patients as a systemic response of the mother to the occurrence of pregnancy-related complications.

11. Reference

AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.* 2001;7(9):1003-9.

Abdulsid A, Lyall F. Heat shock protein 27 expression is spatially distributed in human placenta and selectively regulated during preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2014;101-102:89-95.

ACOG Practice Bulletin No. 171: Management of Preterm Labor. *Obstet Gynecol.* 2016;128(4):e155-e64.

ACOG Practice Bulletin No. 188: Prelabor Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol.* 2018;131(1):e1-e14.

ACOG Practice Bulletin No. 204: Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol.* 2019;133(2):e97-e109.

ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2002;99,159–167.

Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011;31(1):66–74.

Akolekar R, Zaragoza E, Poon LC, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(6):732-9.

Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metawi H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, Avent ND, Soothill PW. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(1):98.e1-6.

Alfirevic Z, Stampalija T, Medley N. Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in singleton pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;2017(6):CD008991.

Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J.* 1994;13(24):6099-106.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1995;1(10):1024-8.

Anderson UD, Olsson MG, Rutardóttir S, Centlow M, Kristensen KH, Isberg PE, Thilaganathan B, Akerström B, Hansson SR. Fetal hemoglobin and α 1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(6):520.e1-5.

Arrigo AP, Viot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:414–22.

Bainbridge SA, Farley AE, McLaughlin BE, Graham CH, Marks GS, Nakatsu K, Brien JF, Smith GN. Carbon monoxide decreases perfusion pressure in isolated human placenta. *Placenta*. 2002;23(8-9):563-9.

Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer JN, Lyall F. Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed: reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction. *FASEB J*. 2001;15(7):1158-68.

Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, Harma MI, Ozdamar SO. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract*. 2010;206(9):651-6.

Baxter JK, Weinstein L. HELLP syndrome: the state of the art. *Obstet Gynecol Surv*. 2004;59(12):838-45.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000;2(8):469-75.

Bellos I, Fitrou G, Daskalakis G, Papantoniou N, Pergialiotis V. Serum cystatin-c as predictive factor of preeclampsia: A meta-analysis of 27 observational studies. *Pregnancy Hypertens*. 2019 Apr;16:97-104.

Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998;83:117-32.

Bisták P. Screening preeklampsie – pravda nebo fikce? *Actual Gyn*. 2017;9:5-9.

Boito SM, Laudy JA, Struijk PC, Stijnen T, Wladimiroff JW. Three-dimensional US assessment of hepatic volume, head circumference, and abdominal circumference in healthy and growth-restricted fetuses. *Radiology*. 2002;223(3):661-5.

Bracher A, Verghese J. GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 and BAG domain proteins: nucleotide exchange factors for Hsp70 molecular chaperones. *Subcell Biochem*. 2015;78:1-33.

Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2001;27:1835-41.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000a;2:645–52.

Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, Garrido C. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2000b;19(42):4855-63.

Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: The complicated roles of extracellular HSPs in immunity. *Front Immunol.* 2016;7:159.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:164–72.

Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(4):1026-35.

Csermely P, Schnaider T, Söti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 1998;79:129–68.

Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation.* 2007;115(13):1789-97.

Cui L, Shu C, Liu Z, Tong W, Cui M, Wei C, Tang JJ, Liu X, Hu J, Jiang J, He J, Zhang DY, Ye F, Li Y. The expression of serum sEGFR, sFlt-1, sEndoglin and PLGF in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2018;13:127-32.

Cunningham FG, Cox SM, Harstad TW, Mason RA, Pritchard JA. Chronic renal disease and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163(2):453-9.

Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene.* 2013;519(1):187-93.

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3702-10.

Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clin Exp Immunol.* 2006;145:183-9.

De Villiers CP, Hedley PL, Placing S, Wøjdemann KR, Shalmi AC, Carlsen AL, Rode L, Sundberg K, Tabor A, Christiansen M. Placental protein-13 (PP13) in combination with PAPP-A and free leptin index (fLI) in first trimester maternal serum screening for severe and early preeclampsia. *Clin Chem Lab Med.* 2017;56(1):65-74.

Denbow ML, Cox P, Taylor M, Hammal DM, Fisk NM. Placental angioarchitecture in monochorionic twin pregnancies: relationship to fetal growth, fetofetal transfusion syndrome, and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(2):417-26.

DeVore GR. The importance of the cerebroplacental ratio in the evaluation of fetal well-being in SGA and AGA fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(1):5-15.

Diaz-Latoud C, Buache E, Javouhey E, Arrigo AP. Substitution of the unique cysteine residue of murine Hsp25 interferes with the protective activity of this stress protein through inhibition of dimer formation. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(3-4):436-45.

Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 2006;25(11):2519-28.

Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005;330(7491):565.

Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation.* 2008;117(2):231-41.

Dvorakova L, Ivankova K, Krofta L, Hromadnikova I. Expression profile of heat shock proteins in placental tissues of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(4):1-14.

Figueras F, Gratacos E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014;34(7):655-9.

Foidart JM, Munaut C, Chantraine F, Akolekar R, Nicolaides KH. Maternal plasma soluble endoglin at 11-13 weeks' gestation in pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;35(6):680-7.

Franck E, Madsen O, van Rheede T, Ricard G, Huynen MA, de Jong WW. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *J Mol Evol.* 2004;59(6):792-805.

Frydman J, Nimmesgern E, Ohtsuka K, Hartl FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*. 1994;370(6485):111-7.

Fukushima A, Kawahara H, Isurugi C, Syoji T, Oyama R, Sugiyama T, Horiuchi S. Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2005;31(1):72-7.

García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 1998;392(6678):821-4.

Gehrmann M, Marienhagen J, Eichholtz-Wirth H, Fritz E, Ellwart J, Jäättelä M, Zilch T, Multhoff G. Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ*. 2005;12(1):38-51.

Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*. 2011;35:466-70.

Genç MR, Delaney ML, Onderdonk AB, Witkin SS; Microbiology and Prematurity (MAP) Study Group. Vaginal nitric oxide in pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56(2):86-90.

Genç MR, Karaşahin E, Onderdonk AB, Bongiovanni AM, Delaney ML, Witkin SS; Microbiology and Prematurity Study Group. Association between vaginal 70-kd heat shock protein, interleukin-1 receptor antagonist, and microbial flora in mid trimester pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(3):916-21.

Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, Papageorghiou A, Baschat AA, Baker PN, Silver RM, Wynia K, Ganzevoort W. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;48(3):333-9.

Göthová A. Postup u předčasného porodu s plodem na hranici viability (22.-25. týden) těhotenství. *Čes. Gynek*. 2013;78(6):573-83.

Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci*. 1997;110:357-68.

Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*. 2005;105(3):1246-55.

Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67(5):511-9.

Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep*. 2009;42:623-30.

Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, Schmetzer H, Hiddemann W, Multhoff G. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones*. 2000;5(5):438-42.

Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2008;283:12305–13.

Hendrix N, Berghella V. Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol*. 2008;32(3):161-5.

Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci*. 2005;14(7):1697-709.

Holwerda KM, Bos EM, Rajakumar A, Ris-Stalpers C, van Pampus MG, Timmer A, Erwich JJ, Faas MM, van Goor H, Lely AT. Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*. 2012;33(6):518-21.

Holwerda KM, Burke SD, Faas MM, Zsengeller Z, Stillman IE, Kang PM, van Goor H, McCurley A, Jaffe IZ, Karumanchi SA, Lely AT. Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(4):717-25.

Horwich AL, Farr GW, Fenton WA. GroEL-GroES-mediated protein folding. *Chem Rev*. 2006;106:1917-30.

Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:115-45.

Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. *Mol Biol Rep*. 2015;42(3):625-37.

Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *Indian J Med Res*. 2016;144(2):229-37.

Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, Krofta L. The Prediction of Gestational Hypertension, Preeclampsia and Fetal Growth Restriction via the First Trimester Screening of Plasma Exosomal C19MC microRNAs. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12): E2972.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171756.

Huang QT, Wang SS, Zhang M, Huang LP, Tian JW, Yu YH, Wang ZJ, Zhong M. Advanced oxidation protein products enhances soluble Fms-like tyrosine kinase 1 expression in trophoblasts: a possible link between oxidative stress and preeclampsia. *Placenta.* 2013;34(10):949-52.

Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996;56:273–9.

Chaiworapongsa T, Erez O, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Than NG, Mittal P, Kim YM, Camacho N, Edwin S, Gomez R, Hassan SS, Romero R. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(7):449-61.

Charette SJ, Landry J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann NY Acad Sci.* 2000;926:126–31.

Cheng D, Jiang S, Chen J, Li J, Ao L, Zhang Y. The Increased lncRNA MIR503HG in Preeclampsia Modulated Trophoblast Cell Proliferation, Invasion, and Migration via Regulating Matrix Metalloproteinases and NF- κ B Signaling. *Dis Markers.* 2019;(2019):4976845.

Imai T, Kato Y, Kajiwara C, Mizukami S, Ishige I, Ichiyangi T, Hikida M, Wang JY, Udono H. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(39):16363-8.

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* 1993;268:1517–20.

Jin X, Wang R, Xiao C, Cheng L, Wang F, Yang L, Feng T, Chen M, Chen S, Fu X, Deng J, Wang R, Tang F, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9(1):69-75.

Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Tempfer C, Knöfler M, Husslein P, Zeisler H. Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: a pilot-study. *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114(15-16):730-2.

Johnson JL. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(3):607-13.

Kacerovský M, Kokrdová Z, Koucký M, Křepelka P, Lamberská T, Mašata J, Měchurová A, Pařízek A, Smíšek J, Šimják P, Velebil P. Spontánní předčasný porod-doporučený postup. *Česká Gynekologie*. 2017a;82(2):160-5.

Kacerovský M, Kokrdová Z, Koucký M, Křepelka P, Lamberská T, Mašata J, Měchurová A, Pařízek A, Smíšek J, Šimják P, Velebil P. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu-doporučený postup. *Česká Gynekologie*. 2017b;82(2):166-7.

Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, Drahosova M, Hornychova H, Janku P, Prochazka M, Simetka O, Andrys C. Cervical fluid IL-6 and IL-8 levels in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015;28(2):134-40.

Kagan KO, Wright D, Valencia C, Maiz N, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free beta-hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Hum Reprod*. 2008;23(9):1968-75.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14:105-11.

Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, de Jong WW. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(1):53-61.

Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2003;163(3):457-61.

Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(20):3289-307.

Kristensen K, Lindström V, Schmidt C, Blirup-Jensen S, Grubb A, Wide-Swensson D, Strevens H. Temporal changes of the plasma levels of cystatin C, beta-trace protein, beta2-microglobulin, urate and creatinine during pregnancy indicate continuous alterations in the renal filtration process. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(6):612-8.

Kumar A, Begum N, Prasad S, Agarwal S, Sharma S. IL-10, TNF- α & IFN- γ : potential early biomarkers for preeclampsia. *Cell Immunol*. 2013;283(1-2):70-4.

Lahra MM, Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(1):147-51.

Lam CH, Lim KH, SA. Circulating Angiogenic Factors in the Pathogenesis and Prediction of Preeclampsia. *Hypertension*. 2005;46:1077-85.

Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem*. 2005;280(24):23349-55.

Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem*. 1992;267(2):794-803.

Langer T, Pfeifer G, Martin J, Baumeister W, Hartl FU. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J*. 1992;11(13):4757-65.

Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subject JR. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem*. 1995;270(26):15725-33.

Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*. 2001;47(1):137-9.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Ravi Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350:672-83.

Levy-Rimler G, Viitanen P, Weiss C, Sharkia R, Greenberg A, Niv A, Lustig A, Delarea Y, Azem A. The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. *Eur J Biochem*. 2001;268(12):3465-72.

Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10519-26.

Liu Y, Li N, You L, Liu X, Li H, Wang X. HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Mol Med*. 2008;14(9-10):561-6.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-7.

Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*. 1999;45(2):184-8.

Lowe DT. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2000;4(4):441-58.

Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*. 2000;14(1):208-19.

Ma Y, Liang X, Wu H, Zhang C, Ma Y. Long non-coding RNA NR_002794 is upregulated in pre-eclampsia and regulates the proliferation, apoptosis and invasion of trophoblast cells. *Mol Med Rep*. 2019;20(5):4567-4575.

Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol*. 2000;156(1):321-31.

Maron JL, Bianchi DW. Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(1):5-17.

Mayer MP. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell*. 2010;39(3):321-31.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111(5):649-58.

McCaig D, Lyall F. Inhibitors of heme oxygenase reduce invasion of human primary cytotrophoblast cells in vitro. *Placenta*. 2009;30(6):536-8.

Mehlen P, Arrigo AP. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *J Biol Chem*. 1994;269(1):327-34.

Mehlen P, Hickey E, Weber LA, Arrigo AP. Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNF α in NIH-3 T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241:187-92.

Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*. 1996;271:16510-4.

Měchurová A, Andělová K. Hypertenze v graviditě – doporučený postup. Čes. Gynek. 2013;78:suppl.45-47. Management hypertenzních onemocnění v těhotenství - revize doporučeného postupu schválená výborem ČGPS ČLS JEP dne 17. 01. 2019.

Menon R, Gerber S, Fortunato SJ, Witkin SS. Lipopolysaccharide stimulation of 70 kilo Dalton heat shock protein messenger ribonucleic acid production in cultured human fetal membranes. J Perinat Med. 2001;29(2):133-6.

Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. Endocrine. 2002;18(3):239-45.

Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. Mol Cell. 2003;11(3):647-58.

Milner CM, Campbell R. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. Immunogenetics. 1990;32:242-51.

Mohan AR, Sooranna SR, Lindstrom TM, Johnson MR, Bennett PR. The effect of mechanical stretch on cyclooxygenase type 2 expression and activator protein-1 and nuclear factor-kappaB activity in human amnion cells. Endocrinology. 2007;148(4):1850-7.

Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J Jr. Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. J Hum Hypertens. 2006;20(10):780-6.

Molvarec A, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. Cell Stress Chaperones. 2009;14(2):151-9.

Molvarec A, Rigó J Jr, Nagy B, Walentin S, Szalay J, Füst G, Karádi I, Prohászka Z. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. J Reprod Immunol. 2007;74(1-2):163-9.

Moran L, Mirault ME, Arrigo AP, Goldschmidt-Clermont M, Tissieres A. Heatshock of *Drosophila melanogaster* induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1978;283:391–406.

Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. Cell Stress Chaperones. 1996;1(3):167-76.

Multhoff G, Hightower LE. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. Cell Stress Chaperones. 2011;16:251–5.

Musa J, Mohammed C, Ocheke A, Kahansim M, Pam V, Daru P. Incidence and risk factors for pre-eclampsia in Jos Nigeria. *Afr Health Sci.* 2018;18(3):584–95.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):369-82.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22. Seravalli V, Miller JL, Block-Abraham D, Baschat AA. Ductus venosus Doppler in the assessment of fetal cardiovascular health: an updated practical approach. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016;95(6):635-44.

Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem.* 2003;49(5):727-31.

Nicolaides KH, Bindra R, Turan OM, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, Tal J, Cuckle HS. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;27(1):13-7.

Odibo AO, Zhong Y, Longtine M, Tuuli M, Odibo L, Cahill AG, Macones GA, Nelson DM. First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta.* 2011;32(4):333-8.

Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31636-40.

Oxvig C. The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. *J Cell Commun Signal.* 2015;9(2):177-87.

Parrish MR, Murphy SR, Rutland S, Wallace K, Wenzel K, Wallukat G, Keiser S, Ray LF, Dechend R, Martin JN, Granger JP, LaMarca B. The Effect of Immune Factors, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), and Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type I Receptor (AT1-AA) on Soluble fms-Like Tyrosine-1 (sFlt-1) and Soluble Endoglin (sEng) Production in Response to Hypertension During Pregnancy. *Am J Hypertens.* 2010; 23(8): 911–6.

Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013;100(2):129-34.

Pereira L, Petitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, Maidji E, Zydek M, Zhou Y, Inoue N, Loghavi S, Pepkowitz S, Kauvar LM, Ogunyemi D.

Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 2014;209(10):1573-84.

Perucci LO, Gomes KB, Freitas LG, Godoi LC, Alpoim PN, Pinheiro MB, Miranda AS, Teixeira AL, Dusse LM, Sousa LP. Soluble endoglin, transforming growth factor-Beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One.* 2014;9(5):e97632.

Pick E, Kluger Y, Giltnane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67(7):2932-7.

Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma.* 2002;52:611-7.

Pockley AG, Henderson B, Multhoff G. Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1744-51.

Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet.* 2003;362(9382):469-76.

Poon LC, Akolekar R, Lachmann R, Beta J, Nicolaides KH. Hypertensive disorders in pregnancy: screening by biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;35(6):662-70.

Poon LC, Maiz N, Valencia C, Plasencia W, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(1):23-33.

Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH; Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9517):1145-54.

Rajagopal D, Bal V, Mayor S, George A, Rath S. A role for the Hsp90 molecular chaperone family in antigen presentation to T lymphocytes via major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol.* 2006;36(4):828-41.

Ranford JC, Coates AR, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2:1-17.

Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;157(1):48-52.

Rauch JN, Gestwicki JE. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *J Biol Chem.* 2014;289(3):1402-14.

Raynes DA, Guerriero V Jr. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32883-8.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(2 Pt 1):499-506.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308:1592-94.

Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta.* 2000;21(7):597-602.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):S1-S22.

Reubinoff BE, Schenker JG. HELLP syndrome--a syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count--complicating preeclampsia-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 1991;36(2):95-102.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cell Mol Life Sci.* 1962;18(12):571-3.

Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol.* 2003;27:449-64.

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999;274(27):18947-56.

Romero R, Chaiworapongsa T. Preeclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an antiangiogenic state. *J Clin Invest.* 2013;123:2775-77.

Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-Tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine RJ, Karumanchi SA. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(1):9-23.

Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2003;59(2):161-73.

- Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 2007;28(2):192-209.
- Salas SP, Marshall G, Gutiérrez BL, Rosso P. Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension.* 2006;47(2):203-8.
- Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, Rice GE. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(9):3182-3194.
- Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2010;85(1):194-203.
- Shah M, Stanek J, Handwerger S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J.* 1998;30(7):509-18.
- Shennan A, Jones B. The cervix and prematurity: aetiology, prediction and prevention. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(6):471-9.
- Shin JK, Baik JC, Kang MY, Park JK, Lee SA, Lee JH, Choi WS, Paik WY. Proteomic analysis reveals an elevated expression of heat shock protein 27 in preeclamptic placentas. *Gynecol Obstet Invest.* 2011;71(3):151-7.
- Shu XO, Hatch MC, Mills J, Clemens J, Susser M. Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: results from a prospective study. *Epidemiology.* 1995;6:115-20.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007;81:15-27.
- Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, Paul RH. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:642-8.
- Siddiqui AH, Irani RA, Blackwell SC, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibody is highly prevalent in preeclampsia: correlation with disease severity. *Hypertension.* 2010;55(2):386-93.
- Sidle EH, Casselman R, Smith GN. Effect of cigarette smoke on placental antioxidant enzyme expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(2):R754-8.

Sifakis S, Zaravinos A, Maiz N, Spandidos DA, Nicolaides KH. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(5):472.e1-7.

Skinner SJ, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol*. 1981;57(4):487-9.

Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1762-7.

Soti C, Rácz A, Csermely P. A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7066-75.

Soti C, Vermes A, Haystead TA, Csermely P. Comparative analysis of the ATP-binding sites of Hsp90 by nucleotide affinity cleavage: a distinct nucleotide specificity of the C-terminal ATP-binding site. *Eur J Biochem*. 2003;270(11):2421-8.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1201-28.

Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*. 2004;562(1-3):11-5.

Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38729-39.

Strevens H, Wide-Swensson D, Grubb A. Serum cystatin C is a better marker for preeclampsia than serum creatinine or serum urate. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001;61(7):575-80.

Subtil D, Denoit V, Le Gouëff F, Husson MO, Trivier D, Puech F. The role of bacterial vaginosis in preterm labor and preterm birth: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;101(1):41-6.

Sykes L, Bennett PR. Efficacy of progesterone for prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;52:126-36.

Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J*. 1996;15(2):408-17.

Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010;11:59.

Tabatabaei N, Eren AM, Barreiro LB, Yotova V, Dumaine A, Allard C, Fraser WD. Vaginal microbiome in early pregnancy and subsequent risk of spontaneous preterm birth: a case-control study. *BJOG.* 2019;126(3):349-58.

Tanimura S, Hirano AI, Hashizume J, Yasunaga M, Kawabata T, Ozaki K, Kohno M. Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cells. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35430-9.

Terzidou V, Sooranna SR, Kim LU, Thornton S, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch up-regulates the human oxytocin receptor in primary human uterine myocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):237-46.

Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23463-71.

Thilaganathan B, Wormald B, Zanardini C, Sheldon J, Ralph E, Papageorghiou AT. Early-pregnancy multiple serum markers and second-trimester uterine artery Doppler in predicting preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2010;115(6):1233-8.

Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84(3):389-98.

Tsutsumi S, Mollapour M, Graf C, Lee CT, Scroggins BT, Xu W, Haslerova L, Hessling M, Konstantinova AA, Trepel JB, Panaretou B, Buchner J, Mayer MP, Prodromou C, Neckers L. Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(11):1141-7.

Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, Walker JJ; Yorkshire Obstetric Critical Care Group. Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG* 2005;112(7):875-80.

Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF 3rd. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174(4):1371-6.

Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *Journal of Pregnancy.* 2012;Article ID 632732:8 pages.

Vaughan JE, Walsh SW. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2002;21(3):205-23.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006;12(6):642-9.

Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(2):161.e1-e11.

Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, Calda P, Holzgreve W, Galindo A, Engels T, Denk B, Stepan H. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(1):58.e1-8.

Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol.* 1999;277:L1026-L1033.

Walter S. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1589-97.

Wang K, Ahmad S, Cai M, Rennie J, Fujisawa T, Crispi F, Baily J, Miller MR, Cudmore M, Hadoke PW, Wang R, Gratacós E, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Ahmed A. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation.* 2013;127(25):2514-22.

Wang Q, Lu X, Li C, Zhang W, Lv Y, Wang L, Wu L, Meng L, Fan Y, Ding H, Long W, Lv M. Down-regulated long non-coding RNA PVT1 contributes to gestational diabetes mellitus and preeclampsia via regulation of human trophoblast cells. *Biomed Pharmacother.* 2019;120:109501.

Wattanavaekin K, Kitporntheranunt M, Kreepala C. Cystatin C as a novel predictor of preterm labor in severe preeclampsia. *Kidney Res Clin Pract.* 2018;37(4):338-46.

Westergaard JG, Teisner B, Grudzinskas JG. Serum PAPP-A in normal pregnancy: relationship to fetal and maternal characteristics. *Arch Gynecol.* 1983;233(3):211-5.

Wikström AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M. Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2007;109(6):1368-74.

Winger EE, Reed JL, Ji X, Nicolaides K. Peripheral blood cell microRNA quantification during the first trimester predicts preeclampsia: Proof of concept. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190654.

Wittung-Stafshede P, Guidry J, Horne BE, Landry SJ. The J-domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70. *Biochemistry*. 2003;42(17):4937-44.

Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10(2):82-93.

Xiong X, Mayes D, Demianczuk N, Olson DM, Davidge ST, Newburn-Cook C, Saunders LD. Impact of pregnancy-induced hypertension on fetal growth. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:207-13.

Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*. 2012;321(2):137-43.

Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol*. 1998a;92(1):77-82.

Yoon BH, Romero R, Park JS, Chang JW, Kim YA, Kim JC, Kim KS. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol*. 1998b;179(5):1254-60.

Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374(1):13-22.

Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR, Stevenson DK. Effect of heme oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta*. 2009;30(10):861-8.

Zhao M, Yin Y, Wei J, Wu M, Yang C, Chen Q. Trophoblastic debris extruded from hydatidiform molar placentae activates endothelial cells: Possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta*. 2016;45:42-9.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-16.

Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1405-23.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Zhou. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of

defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1997;99(9):2152-64.

Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Härtig W. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7(4):180-5.

11.1 Publikace výstupů řešení disertační práce

Dvorakova L, Ivankova K, Krofta L, Hromadnikova I. Expression profile of heat shock proteins in placental tissues of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(4). IF= 3,091 (Příloha 1)

Hromadnikova I, **Dvorakova L**, Kotlabova K, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. *Mol Biol Rep.* 2015;42(3):625-37.

IF= 2,107 (Příloha 2)

Hromadnikova I, **Dvorakova L**, Kotlabova K, Kestlerova A, Hympanova L, Novotna V, Doucha J, Krofta L. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *Indian J Med Res.* 2016;144(2):229-37. IF= 1,251 (Příloha 3)

11.2 Publikace, které nejsou podkladem disertační práce

Hromadnikova I, **Dvorakova L**, Kotlabova K, Krofta L. The Prediction of Gestational Hypertension, Preeclampsia and Fetal Growth Restriction via the First Trimester Screening of Plasma Exosomal C19MC microRNAs. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2972. IF= 4,183

Hromadnikova I, Kotlabova K, **Dvorakova L**, Krofta L, Sirc J. Postnatal Expression Profile of microRNAs Associated with Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases in Children at the Age of 3 to 11 Years in Relation to Previous Occurrence of Pregnancy-Related Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):654. IF= 4,183

Hromadnikova I, Kotlabova K, **Dvorakova L**, Krofta L. Maternal Cardiovascular Risk Assessment 3-to-11 Years Postpartum in Relation to Previous Occurrence of Pregnancy-Related Complications. *J Clin Med.* 2019;8(4):544. IF= 5,688

Hromadnikova I, Kotlabova K, **Dvorakova L**, Krofta L. Postpartum profiling of microRNAs involved in pathogenesis of cardiovascular/cerebrovascular diseases in women exposed to pregnancy-related complications. *Int J Cardiol.* 2019;291:158-67. IF= 3,471

Hromadnikova I, Kotlabova K, **Dvorakova L**, Krofta L. Evaluation of Vascular Endothelial Function in Young and Middle-Aged Women with Respect to a History of Pregnancy, Pregnancy-Related Complications, Classical Cardiovascular Risk Factors, and Epigenetics. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2): E430. IF= 4,183

12. Seznam příloh

Příloha 1: Originální článek Am J Reprod Immunol. 2017

Příloha 2: Originální článek Mol Biol Rep. 2015

Příloha 3: Originální článek Indian J Med Res. 2016

Expression profile of heat shock proteins in placental tissues of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm labor with intact membranes

Lenka Dvorakova¹ | Katarina Ivankova² | Ladislav Krofta² | Ilona Hromadnikova¹ 

¹Department of Molecular Biology and Cell Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

²Institute for the Care of Mother and Child, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Correspondence

Ilona Hromadnikova, Head, Dpt. of Molecular Biology and Cell Pathology; Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.
Email: ilona.hromadnikova@lf3.cuni.cz

Funding information

Charles University research program PRVOUK P32 and PROGRES Q34.

Problem: Investigating the stress response in the central cotyledon zone of placental tissue in pregnancies with PPROM, PTB, and at term in labor.

Method of study: Gene expression of Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, and HspBP1 was compared between these particular groups. Correlation between variables including Hsp gene expression in placental tissue and the gestational age at delivery, WBC count at admission, and serum levels of CRP at admission in patients with PPROM and PTB was determined.

Results: Both PPROM and PTB pregnancies were associated with altered Hsp gene expression profile. While PPROM and PTB always induced upregulation of Hsp27 and Hsp60, downregulation of Hsp70 and HspBP1 was present entirely in patients with PPROM. HspBP1 expression profile was also able to differentiate between PPROM and PTB pregnancies. The highest mRNA levels of Hsp60 and Hsp70 were detected in PTB pregnancies with elevated CRP levels at admission. Some of the examined Hsp displayed increased expression with advancing gestational age in both groups (PPROM: Hsp27, Hsp70, and Hsp90; and PTB: Hsp27).

Conclusion: Upregulation of Hsp27 is a common phenomenon shared between pregnancies affected with PTB and PPROM. On the other hand, downregulation of Hsp70 and HspBP1 represents a unique feature of PPROM.

KEYWORDS

expression profile, heat shock proteins, placental tissue, preterm delivery, real-time PCR

1 | INTRODUCTION

Preterm birth is the leading cause of neonatal mortality and the most common reason of antenatal hospitalization. Of all early neonatal deaths (deaths within the first 7 days of life) that are not related to congenital malformations, 28% are due to preterm birth.^{1,2} The prevalence of preterm delivery varies from 6% to 15% of all deliveries, depending on the geographical and demographic features of the population studied, because in developing countries, there is the rate of premature births higher than in developed countries.³

Preterm deliveries are those that occur at less than 37 weeks of gestational age. The obstetric precursors leading to preterm birth are

as follows: (i) delivery for maternal or fetal indications, in which labor is either induced or the infant is delivered by prelabor Cesarean section; (ii) spontaneous preterm labor with intact membranes (PTB); and (iii) preterm prelabor rupture of the membranes (PPROM), irrespective of whether delivery is vaginal or by Cesarean section.^{4,5}

The causes of preterm birth are numerous, and some of them are preventable. The important thing is early detection of risk factors and intensive care for high-risk pregnancies. Currently used worldwide a broad spectrum of tocolytics, a considerable portion of them, however, has serious side effects.

Spontaneous preterm birth (PTB) is defined as the onset of regular contractions before 37 weeks of gestation.⁵

PPROM is defined as spontaneous rupture of the membranes at less than 37 weeks' gestation at least 1 hour before the onset of contractions.⁴ It is classified by gestational age: mid-trimester PPRM (before 24 weeks), early PPRM (24-34 weeks), and near-term PPRM (34-37 weeks). PPRM is responsible for approximately 3% of all birth and one-third of all preterm deliveries.⁶ The cause of membrane rupture in most cases is unknown, but asymptomatic intrauterine infection is a frequent precursor. Others risk factors are cigarette smoking during pregnancy, polyhydramnios, multiple gestation, previous preterm birth, vaginal bleeding, or low socioeconomic conditions. PPRM is often complicated by microbial invasion of the amniotic cavity (MIAC) and intraamniotic inflammation (IAI), resulting in the development of histological chorioamnionitis.^{7,8} MIAC is predominantly caused by *Ureaplasma* species and has been observed approximately in 30% pregnancies with PPRM.^{9,10} The presence of MIAC is the most important factor impacting the local cervical inflammatory response, which is determined by IL-6 and IL-8 levels in the cervical fluid.¹¹ Diagnosis of MIAC is performed using a transabdominal amniocentesis. On the other hand, histological chorioamnionitis (HCA) can only be diagnosed after delivery by histopathological evaluation of the placenta and fetal membranes.

Heat shock proteins (Hsp) are highly conserved molecules that are present in almost all subcellular structures (eg, nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, and cytoplasm) of all cell types from prokaryotes to eukaryotes.¹² Constitutive forms of these proteins are expressed by the cells under physiological conditions and their expression increases many times if the cell is exposed to sudden changes in temperature or other forms of stress, such as concentration imbalance, pH change, and exposure to infection, toxins, heavy metals, oxidative radicals, prostaglandins, and steroids.¹³⁻¹⁵ Under non-physiological conditions, there is also induced expression of the inducible form of the heat shock proteins.¹⁶⁻¹⁸

Human Hsp are categorized under distinct families based on their functions in the cells, their homologies in the primary structures, and their approximate molecular weight, measured in kDa. These families are the following: a family of small heat shock proteins, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, and Hsp110.¹⁹

Hsp have a dual role, depending on the intracellular or extracellular localization. Intracellular Hsp have a protective function and enable the cell to survive the deadly conditions.²⁰⁻²³ Extracellular Hsp or Hsp localized on the cell membrane mediated immunological functions and play a key role in the stimulation of the immune system.^{21,24} In humans, the presence of Hsp in serum is associated with the occurrence of stress factors, such as inflammation, bacterial, or viral infection.^{21,25-27}

To our knowledge, no studies describing gene expression of cognate and inducible isoforms of heat shock proteins in placenta affected with preterm prelabor rupture of membranes (PPROM) and spontaneous preterm labor with intact membranes (PTB) have been carried out. Our study describes for the first time mRNA levels of Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, and HspBP1 in placental tissues, in the central cotyledon zone, where the umbilical cord inserts into the chorionic plate, in pregnancies with preterm delivery resulting from

spontaneous preterm birth with intact fetal membranes (PTB) and premature rupture of fetal membranes (PPROM). We selected the best-studied constitutively expressed and highly inducible members from individual Hsp families. The best-studied member of small heat shock protein family is Hsp27, encoded by HSPB1 gene, constitutively expressed at basal levels in all cells and tissues, with intracellular location in cytoplasm and nucleus, acting as a protein chaperone and an antioxidant playing a role in the inhibition of apoptosis and actin cytoskeletal remodeling.²⁸⁻³¹

Human Hsp60, the product of the HSPD1 gene, is a constitutive mitochondrial chaperonin that is responsible for the transportation and refolding of approximately 15%-30% of all cellular proteins from cytoplasm into the mitochondrial matrix.³²

The human Hsp70 family has 13 members with similar structural and functional properties with a unique pattern of expression or subcellular localization. Eukaryotes have constitutive (Hsc70) and stress-inducible (iHsp70) isoforms produced by cells in response to hyperthermia, oxidative stress, and changes in pH. The major stress-inducible cytosolic and nuclear Hsp70 proteins (Hsp70-1 and Hsp70-2), encoded by closely related HSPA1A and HSPA1B genes, stabilize existing proteins against aggregation and mediate folding of newly synthesized proteins as well as the import of proteins into the organelles.^{28-30,33}

The members of Hsp90 family are the most abundant proteins in cells (producing 1%-2% of total cellular proteins) which can be found in different cell compartments such as cytosol, endoplasmic reticulum, and the mitochondria. They play an essential role in many cellular processes including cell cycle control, cell survival, hormone, and other signaling pathways. The most studied members of this group are two cytoplasmic isoforms of the protein, the inducible Hsp90 α (HSP90AA1 gene) and the constitutive Hsp90 β (HSP90AB1 gene).^{28-30,34}

Hsp70 cochaperon (Hsp70 binding protein 1, HspBP1), encoded by HSPBP1 gene, is an intracellular protein abundant in tissues that binds to the ATPase domain of Hsp70 and inhibits its ability to refold denaturated proteins.³⁵

Maternal hypertension and preeclampsia have been a well-documented cause of deep placentation failure.^{36,37} Moreover, De Wolf et al. found that fetal growth restriction and severe lesions of placental bed spiral arteries can occur even in the absence of sustained hypertension.³⁸ As Kim et al.³⁹ showed that preterm premature rupture of the membranes or labor without rupture of the fetal membranes was also associated with defective deep placentation, although to a lesser degree, and with the absence of severe vascular lesions, we decided to study Hsp expression profile directly in placental tissues in PPRM and PTB pregnancies. Moreover, several investigators⁴⁰⁻⁴³ demonstrated that decidual vasculopathy and alterations in umbilical artery flow velocity waveforms occurred more frequently than chorioamnionitis in patients in preterm labor. The umbilical cord typically contains two arteries and a single vein. Moreover, the umbilical cord typically inserts into the placenta near its center. For these reasons, we selected for the study the central cotyledon zone, the area where the umbilical cord inserts into the chorionic plate.

TABLE 1 Maternal and neonatal characteristics of normal and complicated pregnancies

	Term in labor (n=50)	PTB (n=30)	PPROM (n=80)	P-value ^a	P-value ^b
Age (y)	33.00 (30.00-35.75)	30.00 (28.00-35.00)	31.50 (28.00-36.00)	.212	.339
Gestational age at delivery (wks)	39.71 (38.50-40.57)	33.14 (29.71-35.14)	34.00 (31.00-36.00)	<.001	.325
Mode of delivery					
Vaginal	41 (82%)	22 (73.3%)	52 (65%)	.101	.109
Cesarean section	9 (18%)	8 (26.7%)	28 (35%)		
Fetal birth weight (g)	3435 (3252.5-3687.5)	2110 (1620-2570)	2205 (1528-2693)	<.001	.401
Fetal sex					
Male	28 (56%)	20 (66.7%)	49 (61.3%)	.650	.631
Female	22 (44%)	10 (33.3%)	31 (38.7%)		
BMI	25.00 (23.00-28.00)	25.2 (21.80-29.00)	25.00 (22.40-28.00)	.926	.809
Primiparity					
Yes	-	11 (36.7%)	37 (46.3%)	NS	.367
No	-	19 (63.3%)	43 (53.7%)		
Administration of corticosteroids					
Yes	-	19 (63.3%)	57 (71.3%)	NS	.424
No	-	11 (36.7%)	23 (28.7%)		
Administration of antibiotics					
Yes	-	25 (83.3%)	74 (92.5%)	NS	.154
No	-	5 (16.7%)	6 (7.5%)		
Tocolytic therapy					
Yes	-	12 (40%)	19 (23.8%)	NS	.092
No	-	18 (60%)	61 (76.2%)		
CRP levels (mg/L)	-	5.9 (3.9-23.0)	6.7 (3.6-13.0)	NS	.552
WBC count ($\times 10^9/L$)	-	11.4 (10.1-15.0)	12.7 (10.6-16.3)	NS	.383
Apgar score <7; 5 min	-	2 (6.7%)	4 (5%)	NS	.732
Apgar score <7; 10 min	-	1 (3.3%)	2 (2.5%)	NS	.811
Umbilical blood pH	-	7.32 (7.30-7.36)	7.32 (7.29-7.36)	NS	.404

BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; PPROM, preterm prelabor rupture of membranes; PTB, spontaneous preterm birth; WBC, white blood cells. Data are presented as median (25-75 percentile) for continuous variables and as number (percent) for categorical variables. Statistically significant results are marked in bold.

^aP-value: the comparison among three groups. Continuous variables were compared using the Kruskal-Wallis test (exact two-tailed P-value). Categorical variables were compared using Fisher's exact test (exact two-tailed P-value).

^bP-value: the comparison among women with spontaneous preterm birth and preterm prelabor rupture of membranes. Continuous variables were compared using the Kruskal-Wallis test. Categorical variables were compared using a chi-square test.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

The study was designed in a retrospective manner. Clinical samples were collected between 2014 and 2016 at the Institute for the Care of the Mother and Child (Prague, CZ). All samples were stored at -80°C until further processing. Samples processing and analyses were performed at the Department of Molecular Biology and Cell Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic. All patients who participated in this study provided written informed consent. The study was approved by

the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University.

The studied cohort consisted of Caucasian women with singleton pregnancies involving 80 pregnancies with preterm prelabor rupture of membranes (PPROM) delivering within 31+0-36+0 (median 34+0) weeks of gestation, 30 patients with spontaneous preterm labor (PTB) delivering within 29+5-35+1 (median 33+1) weeks of gestation, and 50 women at term in labor. The clinical characteristics of the patients are presented in Table 1. Gestational age was assessed using ultrasonography.

Women at term in labor were defined as those without medical, obstetrical, or surgical complications who subsequently delivered

TABLE 2 Primers and probes used for one step real-time RT-PCR analyses

Gene	Gene info-NCBI	Primer sequences	Probe sequences
β -actin	ACTB, GeneID 60	5'-CCTGGCACCAGCACAAT-3' 5'-GCCGATCCACGAGTACT-3'	5'-(VIC) ATCAAGATCAATGCTCTCTGAGCGC (TAMRA)-3' Amplicon length 70 bp
Hsp27	HSPB1, GeneID 3315	5'-TCCCTGGATGTAACCACTTC-3' 5'-TCTCCACCACGCCATCCT-3'	5'-(FAM) CCCCAGGACGAGCTGACGGTC (TAMRA)-3' Amplicon length 67 bp
Hsp60	HSPD1, GeneID 3329	5'-GATGTTGATGGAGAAGCTCTAAGTACA-3' 5'-TGCCACAACCTGAAGACCAA-3'	5'-(FAM) TCGTCTTGAATAGGCTAAAG (MGB)-3' Amplicon length 69 bp
Hsp70	HSPA1A, GeneID 3303	5'-ACCAAGCAGACGCAGATCTTC-3' 5'-GCCCTCGTACACTGGATCA-3'	5'-(FAM) CCTACTCCGACAACCAACCCGGG (TAMRA)-3' Amplicon length 87 bp
Hsp90 α	HSP90AA1, GeneID 3320	5'-TGCGGTCACTTAGCCAAGATG-3' 5'-GAAAGCGAAGCTCTCAACCT-3'	5'-(FAM) CCCAGACCAAGACCAACCGATGG (TAMRA)-3' Amplicon length 85 bp
HspBP1	HSPBP1, GeneID 23640	5'-TGGCCGACCTGTGTGAGA-3' 5'-GCAGGTGCATGCCAGACA-3'	5'-(FAM) CATGGACAATGCCG (MGB)-3' Amplicon length 66 bp

Forward and reverse primers together with probe sequences are listed for each gene.

full term (after 37 completed weeks of gestation), singleton, healthy infants weighing >2500 g.

PTB was defined as the occurrence of regular uterine contractions at a minimum frequency of two contractions per 10 minutes, along with cervical changes, leading to delivery before the 37th week of gestation was completed.

PPROM was defined as amniotic fluid leakage preceding the onset of labor by at least 1 hour. PPRM was diagnosed visually using a sterile speculum examination to confirm the pooling of amniotic fluid in the vagina and an alkaline pH of cervicovaginal discharge. When necessary, it was confirmed by a positive test for the presence of insulin-like growth factor-binding protein-1 (ACTIM PROM test; Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) in the vaginal fluid.

The exclusion criteria included women with gestational hypertension, preeclampsia, diabetes mellitus, significant vaginal bleeding, fetuses with the presence of congenital or chromosomal fetal abnormalities, signs of fetal growth restriction (an estimated weight below the 10th percentile for appropriate gestational age), and fetal hypoxia.

Women with PPRM and PTB at less than 34 weeks of gestation without signs of clinical infection (maternal pyrexia, uterine tenderness, offensive vaginal discharge, fetal or maternal tachycardia, and intrauterine infection) were treated with corticosteroids to accelerate lung maturation (one or maximally two doses of betamethasone administered intramuscularly 24 hours apart). Tocolysis was used only in those patients before 34 weeks of gestation with no sign of fetal infection, fetal distress, maternal infection, and negative perineal and perianal culture for GBS to allow the first course of antenatal corticosteroids to be completed and/or to transfer the patient to a tertiary care center. Prophylactic antibiotics were given to the majority of patients with preterm delivery to prevent signs of prepartum, intrapartum, and postpartum infection.

In case of PPRM, induction of labor was initiated or an elective Cesarean section was performed within 24-72 hour after the rupture of the membranes, depending on the gestational age of the pregnancy,

the fetal status, the maternal serum levels of C-reactive protein, and cervicovaginal streptococcus β -colonization.

A diagnosis of histological chorioamnionitis (HCA) was determined based on the presence of neutrophil infiltration in the chorion-decidua (grades 3-4) and/or chorionic plate (grades 3-4), and/or umbilical cord (grades 1-4) and/or amnion (grades 1-4) according to the criteria by Salafia et al.⁴⁴ Of the 80 patients with PPRM, 43 were diagnosed with histological chorioamnionitis (HCA).

2.2 | Processing of samples and total RNA isolation

Total RNA was extracted from 30 mg of placental tissue preserved in RNAlater (Ambion, Austin, USA) using QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. To minimize DNA contamination, the eluted RNA was treated with 5 μ L of deoxyribonuclease I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Canada) for 30 minutes at 37°C. All samples had an OD 260/280 nm ratio >1.9, indicating high quality and purity.

2.3 | Analysis of Hsp mRNA levels using one-step real-time RT-PCR

Analysis of samples was performed using a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) as previously described.⁴⁵ Human Hsp (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, and HspBP1) and β -actin primers and probes were designed using Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer and probe sequences are shown in Table 2. Total RNA samples extracted from placental tissues were diluted to the final concentration of 2 ng/ μ L for Hsp27, Hsp70, and Hsp90. To enhance detectability of Hsp60 and HspBP1 in placental tissues, RNA samples were diluted to 200 ng/ μ L. Reaction mixture (25 μ L in total) consisted of 1 \times TaqMan One-step RT-PCR Master Mix, TaqMan and/or MGB probes, forward and reverse primers, and 5 μ L of extracted total RNA. Primer and probe concentrations are shown in Table 3. All samples were analyzed in duplicate. The

TABLE 3 Primer and probe concentrations of individual real-time RT-PCR assays

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90	HspBP1
hsp	900/300	900/200	300/200	300/200	700/200
β -actin	300/200	300/200	300/200	300/200	200/100

Primer and probe concentrations (nmol L^{-1}) are listed as the equal forward and reverse primer concentrations/probe concentration.

thermal profile used for one-step real-time RT-PCR (the Hsp gene and endogenous control β -actin were amplified in the same tube) included reverse transcription at 48°C for 30 minutes, denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 50 cycles of PCR with denaturation at 95°C for 15 seconds, and annealing/extension at 60°C for 1 minutes. Analysis of relative changes in gene expression of Hsp was performed using the comparative Ct method.⁴⁶ The difference (ΔCt) between the Ct values of the Hsp and the endogenous control was calculated for each sample. RNA isolated from a randomly selected placenta derived from gestation of normal course was chosen as the reference for each comparison. The comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ calculation involved finding the difference between each sample's ΔCt and the reference's ΔCt . Finally, $\Delta\Delta\text{Ct}$ values were transformed to absolute values using the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. The mRNA levels of an endogenous control (β -actin) were comparable between the studied groups.

2.4 | Statistical analysis

Normality of the data was assessed using Shapiro-Wilk test, which indicated that our data did not follow a normal distribution. Therefore, Hsp mRNA levels were compared between groups by nonparametric test (the Kruskal-Wallis test for the comparison among multiple groups). The significance level was established at a P -value of $P < .05$. Data analysis was performed, and box plots were generated using computer program Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Each box encompasses the median (dark horizontal line) of normalized gene expression values for Hsp of interest in cohorts; the upper and lower limits of the boxes represent the 75th and 25th percentiles, respectively. The upper and lower whiskers represent the maximum and minimum values that are no more than 1.5 times the span of the interquartile range (range of the values between the 25th and the 75th percentiles). Outliers are indicated by circles and extremes by asterisks.

Correlation between variables including relative Hsp quantification in placental tissues and the gestational age at delivery, maternal WBC count at admission ($\times 10^9$ L), maternal serum levels of C-reactive protein (CRP) at admission (mg/L) in patients with PPROM and PTB was calculated using Spearman's rank correlation coefficient (ρ). If the correlation coefficient value is -1 or 1, there is a perfect negative or positive correlation. If it ranges within $< -1; 0.5 >$ or $< 0.5; 1 >$, there is a strong negative or positive correlation. If it varies from -0.5 to 0 and from 0 to 0.5, there is a weak negative or positive correlation. The significance level was established at a P -value of $P < .05$.

3 | RESULTS

Initially, Hsp mRNA levels were compared between the groups of women at term in labor, spontaneous preterm birth with intact membranes (PTB), and preterm prelabor rupture of membranes (PPROM). In addition, Hsp gene expression was analyzed in the group of PPROM patients in relation to the presence of histological chorioamnionitis (HCA). The comparison between the following groups was made: HCA positive vs HCA negative patients.

Consecutively, an effect of the delivery mode, the time to delivery, and gestational age on Hsp gene expression in placental tissue was evaluated in the group of PPROM and PTB pregnancies.

Moreover, the association between Hsp gene expression in placental tissue and maternal WBC count at admission and maternal serum CRP levels at admission in patients with PPROM and PTB was determined.

3.1 | Upregulation of Hsp27 and Hsp60 in PPROM and PTB pregnancies and downregulation of Hsp70 and HspBP1 in PPROM pregnancies

Overall, the expression of Hsp27, Hsp60, Hsp70, and HspBP1 in placental tissue samples differed significantly between the control group (term in labor pregnancies) and pregnancies affected with PPROM or PTB. While increased expression of Hsp27 and Hsp60 was observed in women with PPROM (Hsp27: $P = .002$, Hsp60: $P = .005$) and PTB (Hsp27: $P = .003$, Hsp60: $P = .004$), the downregulation of Hsp70 ($P = .021$) and HspBP1 ($P = .034$) was found in PPROM pregnancies. No difference was identified between the groups of PPROM and term in labor pregnancies for Hsp90 ($P = .415$). The expression of Hsp70 ($P = 1.0$), Hsp90 ($P = 1.0$) and HspBP1 ($P = 1.0$) did not differ between the control group and pregnancies affected with PTB (Figure 1).

3.2 | Differentiation between gestational age-matched pregnancies with PTB and PPROM based on placental expression profile of HspBP1

The expression of HspBP1 ($P = .009$) differed significantly between the PTB group and pregnancies affected with PPROM. Lower expression rate was detected in patients with PPROM. No difference was identified between the groups of PPROM and PTB patients for Hsp27 ($P = 1.0$), Hsp60 ($P = 1.0$), Hsp70 ($P = .266$), and Hsp90 ($P = .986$) (Figure 1).

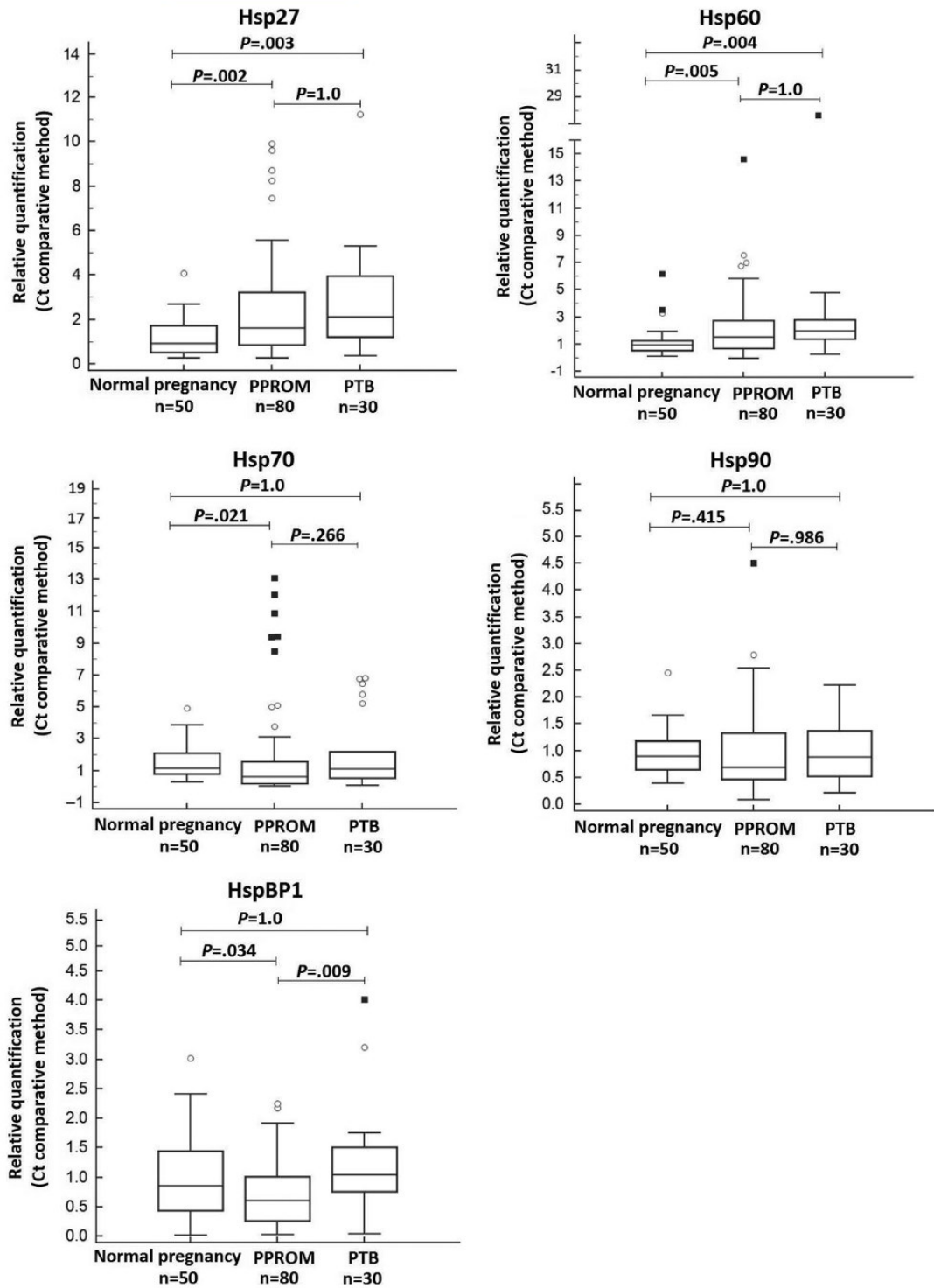


FIGURE 1 Hsp gene expression in the central cotyledon zone of placental tissues in the groups of women at term in labor, spontaneous preterm labor with intact membranes (PTB) and preterm prelabor rupture of membranes (PPROM). Increased expression of Hsp27 and Hsp60 was observed in women with PPR0M and PTB, and the downregulation of Hsp70 and HspBP1 ($P=.034$) was found in PPR0M pregnancies. The expression of HspBP1 differed significantly between the PTB group and pregnancies affected with PPR0M

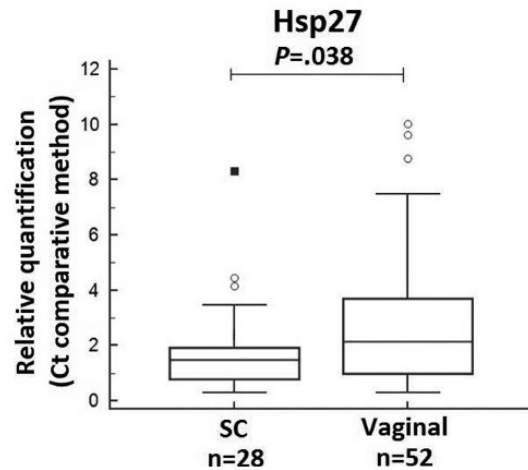


FIGURE 2 The effect of the delivery mode on Hsp27 gene expression in placental tissues within the group of PPR0M pregnancies. Significantly higher Hsp27 mRNA levels were observed in patients with a vaginal delivery than in patients with Cesarean section delivery

3.3 | Hsp expression profile in PPR0M pregnancies with and without the presence of HCA

Detailed statistical analyses within the group of PPR0M pregnancies revealed no difference in Hsp expression profile in placental tissues between HCA-positive ($n=43$) and HCA-negative ($n=37$) patients (Hsp27: $P=.804$; Hsp60: $P=.427$; Hsp70: $P=.504$; Hsp90: $P=.679$; and HspBP1: $P=.775$).

3.4 | The effect of the delivery mode and the time to delivery on Hsp gene expression in placental tissues within the groups of PPR0M, PTB, and TL pregnancies

The comparison of Hsp gene expression in placental tissues did not show any difference between patients with respect to the delivery mode (vaginal vs Cesarean section) within groups of PTB (Hsp27, $P=1.0$; Hsp60, $P=.227$; Hsp70, $P=.812$; Hsp90, $P=.516$; HspBP1, $P=.201$), PPR0M (Hsp60, $P=.498$; Hsp70, $P=.219$; Hsp90, $P=.604$; HspBP1, $P=.791$) and TL (Hsp27, $P=.382$; Hsp60, $P=.417$; Hsp70, $P=.613$; Hsp90, $P=.510$; HspBP1, $P=.305$). Nevertheless, in PPR0M pregnancies, significantly higher Hsp27 mRNA levels were observed in patients with a vaginal delivery ($P=.038$) (Figure 2).

Furthermore, we investigated the effect of the time to delivery on Hsp expression profile in placental tissues in PPR0M pregnancies.

The decision on whether to deliver was based on gestational age and fetal status. Labor was induced immediately, regardless of gestational age, in patients with intrauterine infection, placental abruption, or evidence of fetal compromise.⁴⁷ A weak negative correlation between the time to delivery and Hsp gene expression in placental tissues within the group of PPR0M patients was observed (Hsp27: $\rho=-0.278$, $P=.015$; Hsp60: $\rho=-0.387$, $P=.001$; Hsp70: $\rho=-0.319$, $P=.005$; Hsp90: $\rho=-0.269$, $P=.018$; HspBP1: $\rho=-0.153$, $P=.183$), which means that the expression of most of all Hsp decreased with advancing time to delivery (Figure 3).

3.5 | The effect of the gestational age on Hsp gene expression in placental tissues within the groups of PPR0M and PTB pregnancies

A weak positive correlation between the gestational age at delivery and Hsp gene expression in placental tissues within the group of PPR0M patients was observed (Hsp27: $\rho=0.297$, $P=.010$; Hsp70: $\rho=0.336$, $P=.003$; and Hsp90: $\rho=0.322$, $P=.005$) (Figure 4A). In addition, a strong positive correlation between the gestational age at delivery and Hsp27 gene expression in placental tissues within the group of PTB patients was found ($\rho=0.668$, $P=.002$), (Figure 4B). That means that pregnancies with PPR0M and PTB demonstrated increased expression of these particular Hsp with advancing gestational age at delivery. On the other hand, no association between Hsp gene expression in placental tissues and the gestational age at delivery was observed for Hsp60 ($\rho=0.216$, $P=.060$) and HspBP1 ($\rho=0.006$, $P=.959$) in patients affected with PPR0M (Figure 4A). The expression of other examined Hsp in placental tissues of PTB pregnancies was not influenced by the gestational age at delivery (Hsp60: $\rho=-0.035$, $P=.871$; Hsp70: $\rho=0.393$, $P=.065$; Hsp90: $\rho=0.340$, $P=.110$; and HspBP1: $\rho=0.261$, $P=.221$) (Figure 4B).

3.6 | The association between Hsp gene expression in placental tissues and maternal serum CRP levels within the groups of PPR0M and PTB pregnancies with respect to antenatal corticosteroids therapy

No association between maternal serum CRP levels at admission and Hsp gene expression in placental tissues was found in the group of PPR0M pregnancies (Hsp27: $\rho=-0.157$, $P=.189$; Hsp60: $\rho=-0.144$, $P=.228$; Hsp70: $\rho=-0.124$, $P=.300$; Hsp90: $\rho=-0.203$, $P=.090$; and HspBP1: $\rho=0.053$, $P=.658$). The administration of antenatal corticosteroids had no effect on association between Hsp gene expression in placental tissues and maternal serum CRP levels at admission in PPR0M pregnancies. Women with PPR0M after 34 week of gestation

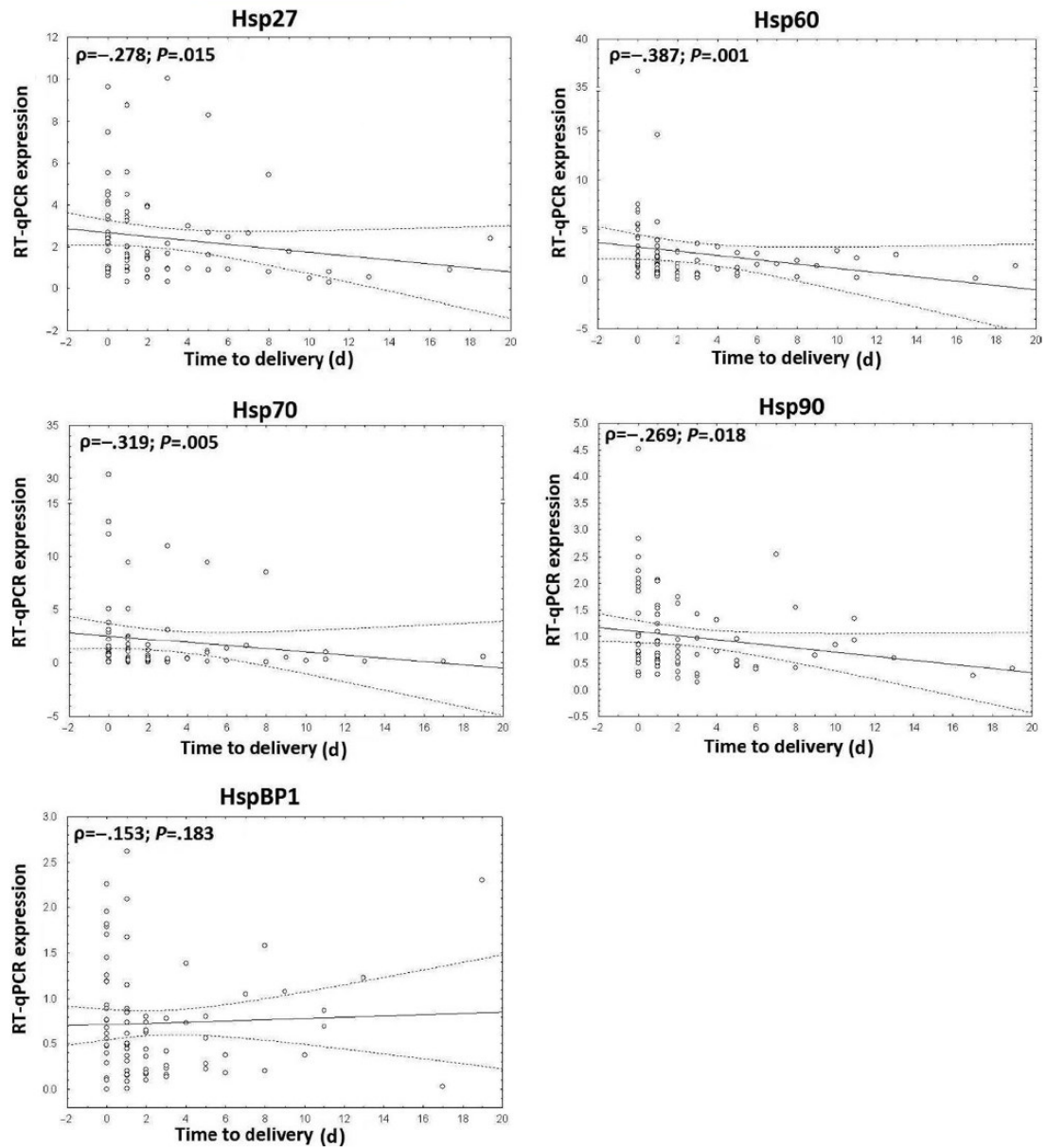


FIGURE 3 The effect of the time to delivery on Hsp gene expression in placental tissues within the group of PPROM pregnancies. A weak negative correlation between the time to delivery and Hsp gene expression in placental tissues was observed for Hsp27, Hsp60, Hsp70, and Hsp90

without the need of prophylactic prenatal corticosteroids (Hsp27: $\rho = 0.140, P = .437$; Hsp60: $\rho = 0.145, P = .419$; Hsp70: $\rho = 0.243, P = .175$; Hsp90: $\rho = -0.031, P = .864$; and HspBP1: $\rho = 0.242, P = .175$) showed similar results as women with PPROM indicated for antenatal corticosteroid therapy (Hsp27: $\rho = -0.257, P = .119$; Hsp60: $\rho = -0.216, P = .194$;

Hsp70: $\rho = -0.278, P = .092$; Hsp90: $\rho = -0.296, P = .072$; and HspBP1: $\rho = -0.077, P = .646$).

Similarly, no effect of maternal serum CRP levels at admission on Hsp mRNA levels in placental tissues was observed for Hsp27 ($\rho = 0.191, P = .459$), Hsp90 ($\rho = 0.153, P = .553$), and HspBP1 ($\rho = 0.372,$

$P=.149$) in PTB pregnancies. Nevertheless, in the group of PTB pregnancies, a strong positive correlation between Hsp60 and Hsp70 mRNA levels in placental tissues and maternal serum CRP levels

at admission was observed (Hsp60: $\rho=0.505$, $P=.049$; and Hsp70: $\rho=0.567$, $P=.028$) (Figure 5). The subgroup analysis with respect to administration of antenatal corticosteroids revealed that PTB

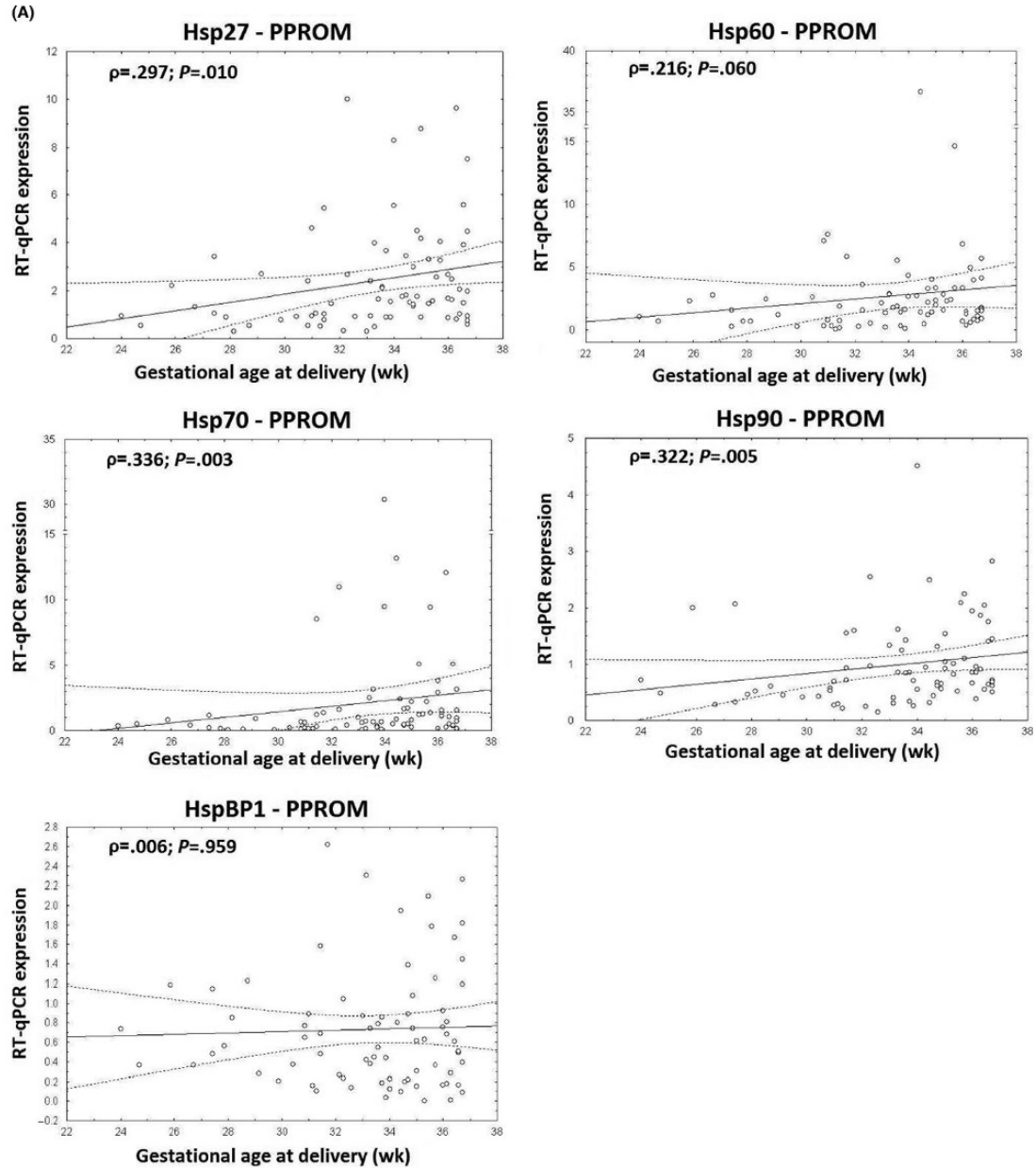


FIGURE 4 (A) The effect of the gestational age on Hsp gene expression in placental tissues within the group of PPRM pregnancies. A weak positive correlation between the gestational age at delivery and Hsp gene expression in placental tissues was observed for Hsp27, Hsp70, and Hsp90. (B) The effect of the gestational age on Hsp gene expression in placental tissues within the group of PTB pregnancies. Strong positive correlation between the gestational age at delivery and Hsp27 gene expression in placental tissues was found

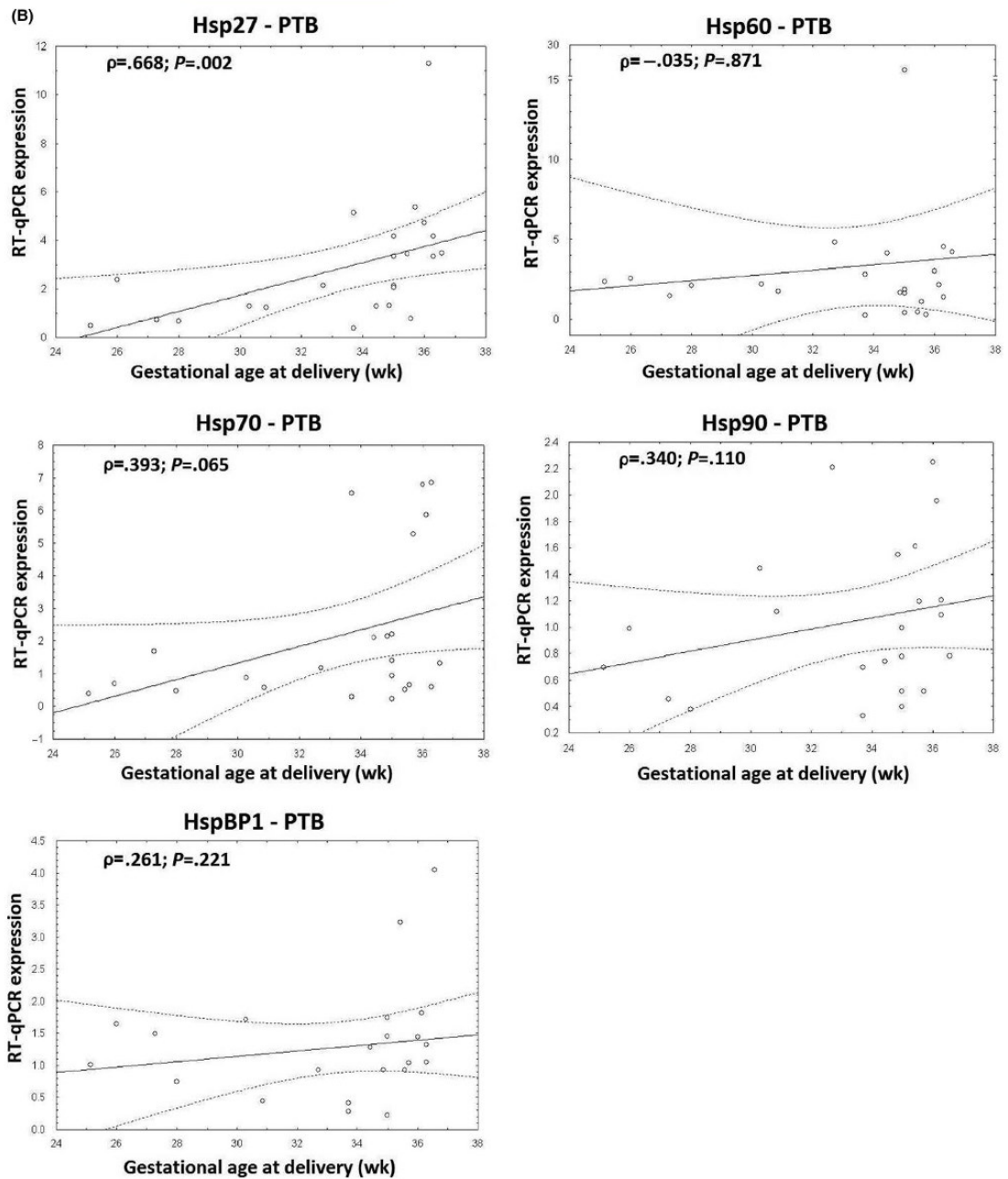


FIGURE 4 (Continued)

pregnancies, that were not given antenatal corticosteroids, also showed a strong positive correlation between Hsp60 and Hsp70 mRNA levels in placental tissues and maternal serum CRP levels at admission (Hsp60: $\rho = 0.905, P = .002$; and Hsp70: $\rho = 0.738, P = .037$)

(Figure 5). Nevertheless, this effect was not observed within the group of PTB pregnancies indicated to prophylactic prenatal corticosteroids therapy (Hsp60: $\rho = -0.214, P = .610$; and Hsp70: $\rho = 0.405, P = .320$).

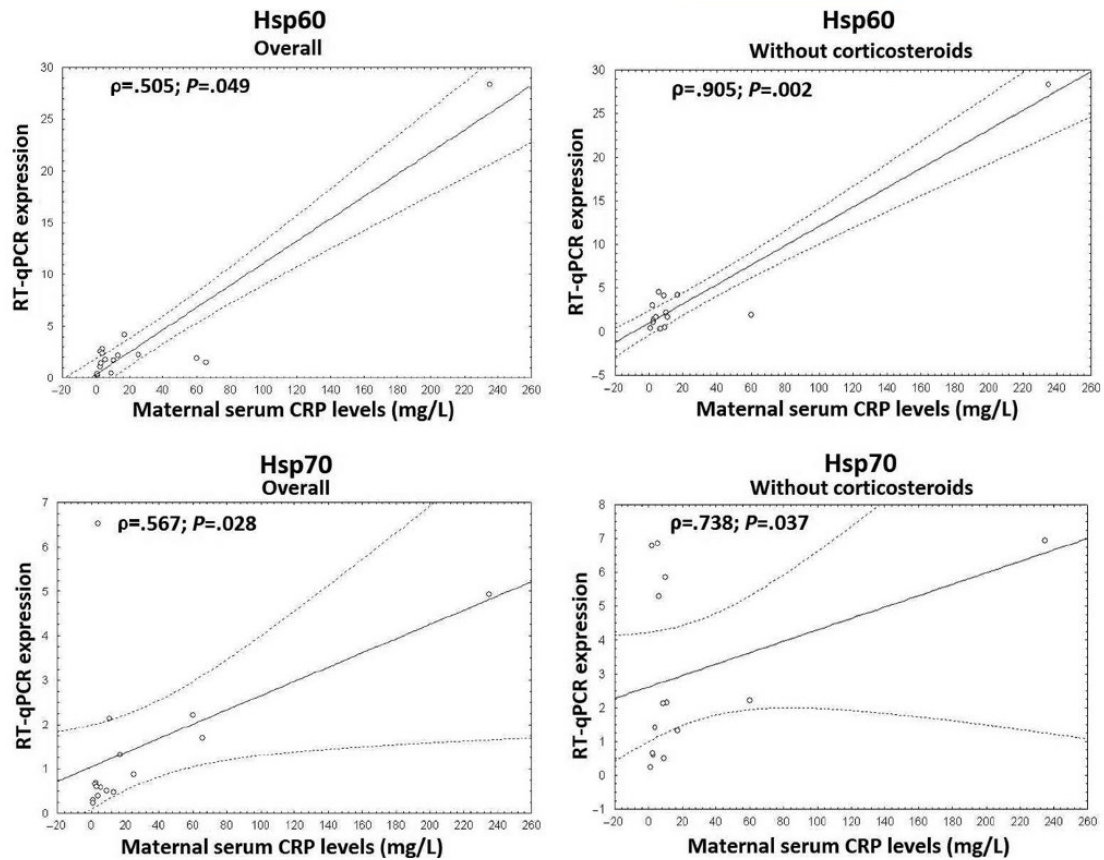


FIGURE 5 The association between Hsp60 and Hsp70 gene expression in placental tissues and maternal serum CRP levels within the group of PTB pregnancies with respect to antenatal corticosteroid therapy. Strong positive correlation between Hsp60 and Hsp70 mRNA levels in placental tissues and maternal serum CRP levels at admission was observed in the group of PTB pregnancies regardless to administration of antenatal corticosteroids. PTB pregnancies, that were not given antenatal corticosteroids, also showed a strong positive correlation between Hsp60 and Hsp70 mRNA levels in placental tissues and maternal serum CRP levels at admission

3.7 | The association between Hsp gene expression in placental tissues and maternal white blood cell (WBC) count at admission within the groups of PPROM and PTB pregnancies with respect to antenatal corticosteroids therapy

No association between maternal white blood cell (WBC) count at admission and Hsp gene expression levels in placental tissues was found in the overall group of PPROM pregnancies (Hsp27: $\rho=0.017$, $P=.881$; Hsp60: $\rho=-0.191$, $P=.101$; Hsp70: $\rho=-0.060$, $P=.604$; Hsp90: $\rho=-0.073$, $P=.527$; and HspBP1: $\rho=-0.067$, $P=.565$) and PTB pregnancies (Hsp27: $\rho=-0.193$, $P=.426$; Hsp60: $\rho=0.236$, $P=.330$; Hsp70: $\rho=0.107$, $P=.658$; Hsp90: $\rho=-0.178$, $P=.464$; and HspBP1: $\rho=-0.286$, $P=.238$). In addition, administration of prophylactic prenatal corticosteroids therapy did not have any impact on the association between Hsp gene expression in placental tissue and maternal

WBC count at admission within the groups of PPROM and PTB pregnancies (Table 4).

4 | DISCUSSION

Nowadays, no studies describing the relationship between Hsp gene expression in placenta and the pathogenesis of preterm birth resulting from spontaneous preterm birth with intact fetal membranes (PTB) and premature rupture of fetal membranes (PPROM) are available. The aim of this study was to investigate expression profile of heat shock proteins (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, and HspBP1) in placental tissues derived from PTB, PPROM, and term pregnancies in labor. The analyses revealed the upregulation of Hsp27 and Hsp60 in both PPROM and PTB pregnancies. Therefore, it seems that concerning stress response in the central cotyledon zone of placental

	PTB without corticosteroids (n=11)		PTB with corticosteroids (n=19)		PPROM without corticosteroids (n=23)		PPROM with corticosteroids (n=57)	
	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>
Hsp27	-0.467	.174	0.286	.493	0.230	.172	-0.055	.748
Hsp60	0.042	.907	0.405	.320	-0.121	.477	-0.096	.570
Hsp70	-0.067	.855	0.524	.183	0.192	.255	-0.033	.846
Hsp90	-0.491	.150	0.238	.570	0.122	.471	-0.056	.744
HspBP1	-0.515	.128	0.095	.823	-0.177	.294	0.056	.744

TABLE 4 Association between Hsp gene expression in placental tissues and maternal white blood cell count at admission within the groups of PPRM and PTB pregnancies with respect to administration of prophylactic prenatal corticosteroids therapy

tissue premature rupture of fetal membranes (PPROM) and spontaneous preterm birth with intact fetal membranes (PTB) have a dissimilar course as term in labor pregnancies. Additionally, the analyses indicated that mRNA levels of Hsp70 and HspBP1 were significantly decreased in placental tissue samples in PPRM pregnancies, which indicates that the course of labor in PPRM pregnancies differ much more from term in labor pregnancies than the course of labor in PTB pregnancies. Moreover, HspBP1 down-regulated profile differentiated between gestational age-matched PTB and PPRM pregnancies. As Hsp70 has anti-apoptotic function (it directly inhibits apoptosis), the decreased mRNA levels of Hsp70 in placental tissues of patients with PPRM may lead to upregulation of relevant proteins involved in the direction of key biological pathways such as premature aging of the fetal membranes where senescence, apoptosis, and proteolysis play an important role.⁴⁸⁻⁵⁰ The cause of PPRM is multifactorial and next to intraamniotic infection, reduction in membrane collagen content, stretched membranes, vasculopathy in placentation, and decidual hemorrhage are considered to be possible mechanisms underlying PPRM.^{51, 52} Adequately, lower HspBP1 mRNA levels may be synthesized in placental tissues of patients with PPRM as a result of a decreased Hsp70 mRNA synthesis in order to create a functional Hsp70/HspBP1 complex, in which HspBP1 binds to the ATPase domain of Hsp70 to inhibit its ability to refold denaturated proteins.³⁵ The molar ratio of HspBP1 to Hsp70 in cells is an important determinant of the interaction between these two proteins and of the function of the resulting complex and usually is 1:1. Furthermore, our study revealed that there is no difference in the ratio of HspBP1 mRNA level to Hsp70 mRNA level in the central cotyledon zone of placental tissue between term in labor, PPRM, and PTB pregnancies. Nevertheless, a weak positive correlation between the gestational age at delivery and Hsp70 gene expression in placental tissues within the group of PPRM patients was observed (Hsp70: $\rho=0.336$ $P=.003$). We suppose that higher Hsp70 mRNA levels that are present in placental tissues in PPRM pregnancies in later gestational age may delay the rupture of fetal membranes, as Hsp70 directly inhibits apoptosis of fetal membranes.

Interestingly, our recent study demonstrated that mild preeclampsia and pregnancies complicated with preeclampsia w or w/o fetal growth restriction delivering after 34 week of gestation regardless of the degree of clinical sign showed upregulation of Hsp27 in the central cotyledon zone of placental tissue similarly as PPRM and

PTB pregnancies.⁵³ Nevertheless, while significantly higher Hsp90 and HspBP1 mRNA levels were found in these particular pregnancy-related complications, the expression of Hsp90 did not differ between term in labor pregnancies and pregnancies affected with PPRM or PTB and HspBP1 downregulation was observed in the group of PPRM pregnancies.⁵³ Therefore, it seems that multifactorial etiology of preterm delivery has dissimilar impact on Hsp gene expression in the central cotyledon zone of placental tissue.

No association between Hsp gene expression in placental tissues and maternal WBC count at admission in groups of PPRM and PTB pregnancies was observed. Likewise, no effect of maternal serum C-reactive protein (CRP) at admission on Hsp gene expression levels of any of the Hsp in the group of PPRM patients was demonstrated. Although maternal WBC count and CRP levels are not specific to intrauterine infections and may be influenced by other factors,⁵⁴ in the group of patients with PTB a strong positive correlation between Hsp60 and Hsp70 mRNA levels and maternal serum CRP levels was identified.

In addition, in both PPRM and PTB groups, Hsp27 displayed increased expression with advancing gestational age, which suggests a functional involvement of Hsp27 in stress response occurring in placental tissue that finally results in preterm delivery. Although overall Hsp70 gene expression is downregulated and Hsp90 gene expression is not altered in PPRM pregnancies, the highest mRNA levels of Hsp70 and Hsp90 can be detected in PPRM pregnancies with advanced gestational age.

In conclusion, this study demonstrated for the first time that both PPRM and PTB pregnancies were associated with altered Hsp gene expression profile in the central cotyledon zone of placental tissue. The expression profile of Hsp was the most distinct between PPRM group and women at term in labor, where Hsp27 and Hsp60 were upregulated and Hsp70 and HspBP1 were downregulated. Upregulation of Hsp27 and Hsp60 also differentiated between PTB and term in labor groups. The data from current study revealed that upregulation of Hsp27 is a common phenomenon shared between PTB and PPRM, and downregulation of Hsp70 and HspBP1 represents a unique feature of preterm prelabor rupture of the membranes (PPROM). Moreover, upregulation of Hsp27 also appeared in case of mild preeclampsia and preeclampsia occurring after 34 weeks of gestation.⁵³ Upregulation of cytoprotective and anti-apoptotic Hsp27 in PTB, PPRM, and preeclampsia may occur as a physiological

response on the presence of bacterial infection or the presence of placental vascular alterations consisting of lack of adaptive changes in the decidual portion of the spiral arterioles and the presence of uneven accelerated maturation of villi, multiple syncytial knots, and placental infarcts.⁵⁵ On the other hand, our previous study pointed to the fact Hsp90 and HspBP1 were exclusively upregulated in association with mild preeclampsia and preeclampsia occurring after 34 weeks of gestation.⁵³

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the Charles University research program PRVOUK P32 and PROGRES Q34.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Beck S, Wojdyla D, Say L, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ.* 2010;88:31-38.
- Lawn JE, Wilczynska-Ketende K, Cousens SN. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol.* 2006;35:706-718.
- Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *Lancet.* 2002;360:1489-1497.
- Tucker JM, Goldenberg RL, Davis RO, Copper RL, Winkler CL, Hauth JC. Etiologies of preterm birth in an indigent population: is prevention a logical expectation? *Obstet Gynecol.* 1991;77:343-347.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371:75-84.
- Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes: current approaches to evaluation and management. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005;32:411-428.
- Romero R, Ghidini A, Mazor M, Behnke E. Microbial invasion of the amniotic cavity in premature rupture of membranes. *Clin Obstet Gynecol.* 1991;34:769-778.
- Shim SS, Romero R, Hong JS, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1339-1345.
- Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol.* 1998;92:77-82.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1254-1260.
- Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, et al. Cervical fluid IL-6 and IL-8 levels in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28:134-140.
- Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol.* 2003;27:449-464.
- Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol.* 1999;277:L1026-L1033.
- Préville X, Salvemini F, Giraud S, et al. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res.* 1999;247:61-78.
- Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1998;83:117-132.
- Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80:183-201.
- Mahroof R, Zhu KY, Neven L, Subramanyam B, Bai J. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;141:247-256.
- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol.* 1989;9:3919-3930.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14:105-111.
- Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2001;27:1835-1841.
- Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007;81:15-27.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1-and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem.* 1996;271:16510-16514.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 2000;19:4310-4322.
- Horváth I, Multhoff G, Sonleitner A, Vigh L. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778:1653-1664.
- Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma.* 2002;52:611-617.
- Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostgård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 2003;42:235-238.
- Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock.* 2011;35:466-470.
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 2001;81:1461-1497.
- Tóth ME, Gombos I, Sántha M. Heat shock proteins and their role in human diseases. *Acta Biol Szeged.* 2015;59(Suppl.1):121-141.
- Kopeček P, Altmannová K, Weigl E. Stress proteins: nomenclature, division and functions. *Biomed Pap.* 2001;145:39-47.
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996;56:273-279.
- Ranford JC, Coates AR, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2:1-17.
- Frydman J, Nimmegern E, Ohtsuka K, Hartl FU. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature.* 1994;370:111-117.
- Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J.* 1994;13:6099-6106.
- Raynes DA, Guerriero V. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem.* 1998;273:32883-32888.

36. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972;1:177-191.
37. Robertson WB, Brosens I, Dixon HG. The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93:581-592.
38. De Wolf F, De Wolf-Peeters C, Brosens I, Robertson WB. The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;137:58-70.
39. Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:1063-1069.
40. Giles WB, Trudinger BJ, Baird P. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985;92:31-38.
41. McCowan LM, Mullen BM, Ritchie K. Umbilical artery flow velocity waveforms and the placental vascular bed. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;157:900-902.
42. Fok RY, Pavlova Z, Benirschke K, Paul RH, Platt LD. The correlation of arterial lesions with umbilical artery Doppler velocimetry in the placentas of small-for-dates pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1990;75:578-583.
43. Salafia CM, Vogel CA, Vinzileos AM, Bantham KF, Pezzullo J, Silberman L. Placental pathologic findings in preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:934-938.
44. Salafia CM, Weigl C, Silberman L. The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1989;73:383-389.
45. Hromadnikova I, Sedlackova L. Analysis of cell surface and relative gene expression of heat shock protein 70 in human leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:570-576.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods.* 2001;25:402-408.
47. Armstrong C. ACOG guidelines on premature rupture of membranes. *Am Fam Physician.* 2008;77:245-246.
48. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* 2014;184:1740-1751.
49. Menon R, Polettini J, Syed TA, Saade GR, Boldogh I. Expression of 8-oxoguanine glycosylase in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72:75-84.
50. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS ONE.* 2013;7:e31136.
51. Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;338:663-670.
52. Mercer BM. Preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 2003;101:178-193.
53. Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, et al. Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels. *Mol Biol Rep.* 2015;42:625-637.
54. Le J (ed). *Obstetrics and Gynecology*(7th edn). Beijing: Beijing People's Medical Publishing House; 2008:137-138.
55. Arias F, Rodriguez L, Rayne SC, Kraus FT. Maternal placental vasculopathy and infection: two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:585-591.

How to cite this article: Dvorakova L, Ivankova K, Krofta L, Hromadnikova I. Expression profile of heat shock proteins in placental tissues of patients with preterm prelabor rupture of membranes and spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2017;00:e12698. <https://doi.org/10.1111/aji.12698>

Assessment of placental and maternal stress responses in patients with pregnancy related complications via monitoring of heat shock protein mRNA levels

Iлона Hromadnikova · Lenka Dvorakova · Katerina Kotlabova ·
Andrea Kestlerova · Lucie Hympanova · Veronika Novotna ·
Jindrich Doucha · Ladislav Krofta

Received: 4 April 2014 / Accepted: 27 October 2014 / Published online: 31 October 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The study describes the stress response in the central cotyledon zone of placental tissue and in maternal whole peripheral blood to pregnancy related complications including gestational hypertension (n = 31), preeclampsia w or w/o fetal growth restriction (n = 95), and fetal growth restriction (n = 39) using real-time RT-PCR and genes encoding Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and HspBP1 proteins. The placental tissue does not respond to pregnancy induced hypertension, fetal growth restriction and short-term severe preeclampsia that requires immediate termination of gestation. Upregulation of Hsp27, Hsp90 and HspBP1 appears just in case of long-term deteriorated conditions (usually in mild preeclampsia, that enable further continuation of gestation, when properly treated). On the other hand, maternal circulation is able to reflect both maternal and fetal pathologic conditions. While pregnancy related complications always induce upregulation of Hsp70 and downregulation of Hsp90 in maternal whole peripheral blood, the increase of Hsp60 mRNA levels occurs entirely in patients with preeclampsia and/or fetal growth restriction. Hsp60, Hsp70 and Hsp90 are dysregulated in maternal

circulation irrespective of the severity of the disease (in both mild and severe preeclampsia) and the requirements for the delivery (before and after 34th week of gestation). Nevertheless, the highest Hsp60 mRNA levels may be observed in pregnancies with signs of the centralization of the fetal circulation associated with fetal hypoxia.

Keywords Heat shock proteins · Placenta · Preeclampsia · Gestational hypertension · Fetal growth restriction · Stress response

Introduction

Heat shock proteins (hsps) are ubiquitously distributed, phylogenetically conserved molecules, present in the cells of all living organisms. Under physiological conditions, the stress proteins are expressed in low concentrations as the constitutive proteins, regulating cellular homeostasis, maintaining the integrity and function of other cellular proteins. The synthesis of constitutive forms of hsps is significantly up regulated by a variety of stressful factors, including heat shock, concentration imbalance, pH change, and exposure to infection, toxins, heavy metals, oxidative radicals, prostaglandins and steroids [1]. The de novo synthesis of heat shock proteins appears as well, when cells are exposed to stressful stimuli. Human hsps are categorized under distinct families based on their functions in the cells, their homologies in the primary structures, and their approximate molecular weight, measured in kDa. These families are following: a family of small heat shock proteins, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp110.

Hsp27 belongs to the small molecular weight heat shock protein family. Hsp27 is present at basal levels in all cells and tissues, acts as a protein chaperone and an antioxidant

I. Hromadnikova (✉) · L. Dvorakova · K. Kotlabova ·
L. Hympanova
Department of Molecular Biology and Cell Pathology, Third
Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87,
100 00 Prague, Czech Republic
e-mail: Iлона.Hromadnikova@lf3.cuni.cz

A. Kestlerova · L. Hympanova · V. Novotna · L. Krofta
Institute for the Care of the Mother and Child, Third Faculty of
Medicine, Charles University, Podolske nabrezi 157/36,
147 00 Prague, Czech Republic

J. Doucha
Clinic of Obstetrics and Gynecology, Second Faculty of
Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

and plays a role in the inhibition of apoptosis and actin cytoskeletal remodeling [2]. During oxidative stress, Hsp27 functions as an antioxidant, lowering the levels of reactive oxygen species (ROS) by raising levels of intracellular glutathione and lowering the levels of intracellular iron [3].

Human Hsp60, the product of the HSPD1 gene, is a mitochondrial chaperonin that is responsible for the transportation and refolding of approximately 15–30 % of all cellular proteins from the cytoplasm into the mitochondrial matrix [4]. In addition to its role as a heat shock protein, Hsp60 plays an important role in the transmission and replication of mitochondrial DNA. The upregulation of Hsp60 production allows for the maintenance of other cellular processes occurring in the cell, especially during stressful times. However, Hsp60 possibly plays a role in a “danger signal cascade” immune response [5]. The fact that Hsp60 is released by peripheral blood mononuclear cells after exposure to lipopolysaccharides (LPS) or Hsp60’s bacterial homolog (GroEL), has the ability to activate certain types of cells (monocytes, macrophages and dendritic cells) and induce secretion of a wide range of cytokines, supports the idea that Hsp60 is part of a danger signal cascade, which is involved in activating an immune response [5]. There is also an evidence that it plays a role in autoimmune diseases [6].

Eukaryotic organisms express several slightly different Hsp70 proteins. All share the common domain structure, but each has a unique pattern of expression or subcellular localization. Eukaryotes have constitutive (Hsc70) and stress-inducible (iHsp70) isoforms. High levels of inducible isoforms are produced by cells in response to hyperthermia, oxidative stress, and changes in pH.

Hsc70 (Hsp73/HSPA8) is a constitutively expressed chaperone protein. Hsp70 (encoded by three very closely related paralogs: HSPA1A, HSPA1B, and HSPA1L) is a stress-induced protein. Molecular chaperones of the Hsp70 family have diverse functions in cells. They assist the folding of newly synthesized and stress-denatured proteins, as well as the import of proteins into organelles, and the dissociation of aggregated proteins [7]. The well-conserved Hsp70 chaperones are ATP dependent: binding and hydrolysis of ATP regulates their interactions with unfolded polypeptide substrates, and ATPase cycling is necessary for their function [8]. Hsp70 proteins can act to protect cells from thermal or oxidative stress. These stresses normally act to damage proteins, causing partial unfolding and possible aggregation. By temporarily binding to hydrophobic residues exposed by stress, Hsp70 prevents these partially denatured proteins from aggregating, and allows them to refold. Hsp70 seems to be able to participate in disposal of damaged or defective proteins. Interaction with CHIP (Carboxyl-terminus of Hsp70 Interacting Protein), an E3 ubiquitin ligase, allows Hsp70 to pass proteins to the cell’s ubiquitination and proteolysis pathways [9].

Finally, in addition to improving overall protein integrity, Hsp 70 directly inhibits apoptosis. A novel Hsp70 co-chaperone called Hsp70 binding protein 1 (HspBP1), an intracellular protein abundant in tissues, was found to bind to the ATPase domain of Hsp70 and inhibit its ability to refold denatured proteins [10]. The molar ratio of HspBP1 to Hsp70 in cells might be expected to be an important determinant of the interaction between these two proteins as well as of the function of the resulting complex.

In mammalian cells, there are two or more genes encoding inducible cytosolic Hsp90 homologues, with the human Hsp90 α showing 85 % sequence identity to constitutively expressed Hsp90 β . Hsp90 is a highly abundant and ubiquitous molecular chaperone which plays an essential role in many cellular processes including cell cycle control, cell survival, hormone and other signaling pathways [11]. It is important for the cell’s response to stress and is a key player in maintaining cellular homeostasis. Hsp90 interacts with ‘client proteins’, including protein kinases, transcription factors and others, and either facilitates their stabilization and activation or directs them for proteasomal degradation [12]. Under stressful conditions, Hsp90 stabilizes its client proteins and provides protection to the cell against cellular stressors. As with many of the other classes of molecular chaperone, Hsp90 has a critical ATPase activity, and ATP binding and hydrolysis modulates the conformational dynamics of the protein.

Preeclampsia and fetal growth restriction (FGR) are major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality in between 2 and 10 % of pregnant women [13]. Preeclampsia is characterized by gestational hypertension combined with proteinuria after 20 weeks of gestation. FGR is defined as fetal growth less than the 10th percentile for appropriate gestational age. The causes of preeclampsia and FGR remain unknown. Nevertheless, it is believed that preeclampsia results mainly from defective placentation and insufficient maternal spiral artery remodeling that elicit inadequate uteroplacental blood perfusion, ischemia, and finally generalized maternal systemic inflammatory response [14, 15]. Redman et al. [15] suggested that the maternal syndrome of preeclampsia manifested as a generalized maternal intravascular inflammatory reaction involving endothelial cell dysfunction, intravascular leukocytes as well as the clotting and complement systems. Later, preeclamptic patients have been demonstrated to have significantly higher levels of C-reactive protein (CRP) and particular complement components including terminal Complement Complex SC5b9 [16]. Subsequently, elevated amounts of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules in the maternal circulation have been shown to play a central role in the excessive systemic inflammatory response and in the generalized endothelial dysfunction characteristics of preeclampsia [17].

Recent studies have focused on the identification of heat shock proteins associated with preeclampsia using standard and/or more sophisticated proteomic analyses such as Western blotting, immunohistochemistry, two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Among differentially expressed proteins, most investigators identified Hsp27 to be up regulated in placental tissues derived from patients with preeclampsia [18, 19]. Nevertheless, no changes were found at the Hsp27 mRNA level between the control and preeclampsia groups [20].

Former studies evaluating the relationship between preeclampsia, intrauterine growth restriction (IUGR) or premature labour and expression of total Hsp60 and Hsp90 revealed that a stress response in placental and decidual tissues, as determined by immunohistochemical and immunofluorescence analyses, was not associated with pregnancy outcome [21, 22].

Initial studies demonstrated constant expression of either total Hsp70, or cognate and inducible isoforms of Hsp70 irrespective of the course of gestation throughout the third trimester of pregnancy [21–23]. Nevertheless, most investigators later reported significantly higher levels of total Hsp70, constitutive and induced forms of Hsp70 in preeclampsia and intrauterine growth restriction, along with oxidative stress in placental tissues [24–26]. Liu et al. [27] brought an evidence of Hsp70 upregulation in both mRNA and protein levels in placental vascular diseases such as preeclampsia and IUGR by a complex proteomics and genomics approach using microarrays, real-time PCR and Western blotting.

Several researchers also pointed to the fact that the expression of hsps might vary in different placental zones. For example, Abdulsid et al. [28] observed increased Hsp70 levels entirely in the inner region of preeclamptic placental tissues compared to the control group. Wataba et al. [29] notified that expression of all hsps (Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90) was higher in the thrombus, but lower in the infarctation than in control samples. The results of Padmini et al. [26] study indicated overexpression of Hsp70 and Hsp90 in endothelial cells isolated from preeclamptic placenta.

Additionally, elevated circulating Hsp70 concentrations reflecting systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury were associated with an increased risk of several pregnancy related complications including transient hypertension of pregnancy, preeclampsia, HELLP syndrome and preterm delivery [30–38].

Since most investigators studied hsp expression at protein level in placental tissues, we focused on the examination of hsp mRNA levels, especially in the central cotyledon zone, where the umbilical cord inserts into the chorionic plate. To our knowledge, few studies are

available in case of Hsp27 and Hsp70, and no study describing Hsp60, Hsp90 and HspBP1 mRNA levels in placenta affected with preeclampsia and/or fetal growth restriction has been carried out. Our study describes also for the first time hsp mRNA levels in placental tissues derived from pregnancies with gestational hypertension.

Moreover, we extended the present study for examination of up to now unexplored maternal systemic inflammatory response in patients with pregnancy related complications via determination of hsp mRNA levels in whole maternal peripheral blood. The current work oriented towards novel insights into pathogenesis of pregnancy related disorders and improvement of diagnostic modalities.

Materials and methods

Patients

The study was designed in a retrospective manner. The studied cohort consisted of Caucasian women involving 95 pregnancies with clinically established preeclampsia (PE) w or w/o fetal growth restriction (FGR), 39 pregnancies complicated by fetal growth restriction (10 SGA and 29 IUGR), 31 patients with gestational hypertension (GH) and 42 normal pregnancies. Of the 95 patients with preeclampsia, 40 women had symptoms of mild preeclampsia and 55 women were diagnosed with severe preeclampsia. Thirty-eight preeclamptic patients required the delivery before 34 week of gestation and 57 patients delivered after 34 week of gestation. Preeclampsia occurred both in previously normotensive patients (70 cases), and in a form superimposed on the previous hypertension (25 cases). Seven growth-retarded fetuses were delivered before 34 week of gestation and 32 those after 34 week of gestation. Oligohydramnios or anhydramnios were present in 14 growth-restricted fetuses. The examination of the flow of blood vessels (Doppler ultrasonography) showed an abnormal pulsatility index (PI) in the umbilical artery (14 preeclampsia and 14 FGR) and/or in the middle cerebral artery (9 preeclampsia and 6 FGR). Cerebro-placental ratio (CPR), expressed as a ratio between middle cerebral artery and umbilical artery pulsatility index was below the fifth percentile in 18 cases (9 preeclampsia and 9 FGR). Absent or reversed end-diastolic velocity waveforms in the umbilical artery occurred in 9 cases (7 preeclampsia and 2 FGR).

Women with normal pregnancies were defined as those without medical, obstetrical, or surgical complications at the time of the study and who subsequently delivered full term, singleton, healthy infants weighing >2,500 g after 37 completed weeks of gestation. Preeclampsia was defined as

Table 1 Clinical characteristics of normal and complicated pregnancies

	Healthy pregnant women (n = 42)	Preeclamptic patients (n = 95)	FGR patients (n = 39)	GH patients (n = 31)
Age (years)	31 (28–33)	32 (29–35)	29 (27–34)	30 (28–31)
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	120 (112–128)	155 (149–160)	120 (120–125)	150 (144–160)
Diastolic	76 (70–80)	100 (90–103)	80 (75–80)	95 (92–100)
Proteinuria (g/24 h)	None	1.46 (0.53–3.5)	None	None
Gestational age at blood sampling (weeks)	36 (35–37)	35 (31–38)	36 (30–37)	37 (36–39)
Gestational age at delivery (weeks)	39 (38–40)	36 (31–38)	37 (35–38)	39 (38–40)
Mode of delivery				
Vaginal	35 (83.3 %)	15 (15.8 %)	9 (23.1 %)	24 (77.4 %)
Caesarian section	7 (16.7 %)	80 (84.2 %)	30 (76.9 %)	7 (22.6 %)
Fetal birth weight (grams)	3,345 (3,232–3,548)	2,425 (1,590–2,925)	2,350 (1,875–2,568)	3,110 (3,020–3,210)

Data are presented as median (25–75 percentile) for continuous variables and as number (percent) for categorical variables

blood pressure >140/90 mmHg in two determinations 4 h apart that was associated with proteinuria >300 mg/24 h after 20 weeks of gestation. Severe preeclampsia was diagnosed by the presence of one or more of the following findings: (1) a systolic blood pressure >160 mmHg or a diastolic blood pressure >110 mmHg, (2) proteinuria greater than 5 g of protein in a 24-h sample, (3) very low urine output (less than 500 ml in 24 h), (4) signs of respiratory problems (pulmonary oedema or cyanosis), (5) impairment of liver function, (6) signs of central nervous system problems (severe headache, visual disturbances), (7) pain in the epigastric area or right upper quadrant, (8) thrombocytopenia, and (9) the presence of severe fetal growth restriction. Fetal growth restriction was diagnosed when the estimated fetal weight (EFW), calculated using the Hadlock formula (Astraia Software GmbH), was below the tenth percentile for the evaluated gestational age, adjustments were made for the appropriate population standards of the Czech Republic. Small for gestational age (SGA) was used to indicate fetuses below a reference range for size and weight for a given gestational age. In addition to fetal weight below the threshold of the 10th percentile IUGR fetuses had at least one of the following pathological finding: an abnormal pulsatility index in the umbilical artery, absent or reversed end-diastolic velocity waveforms in the umbilical artery, an abnormal pulsatility index in the middle cerebral artery, a sign of a blood flow centralisation, and a deficiency of amniotic fluid (anhydramnios and oligohydramnios).

The clinical characteristics of normal and complicated pregnancies are presented in Table 1. All patients who participated in this study provided written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

Processing of samples and total RNA isolation

Samples of placenta and maternal peripheral blood (EDTA tubes) were collected at the Institute for the Care of the Mother and Child and Clinic of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Motol (Prague, CZ) and stored at -80°C until further processing.

Total RNA was extracted from 30 mg of placental tissue preserved in RNAlater (Ambion, Austin, USA) and from 200 μl of whole maternal peripheral blood using QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. To minimize DNA contamination, we treated the eluted RNA with 5 μl of Deoxyribonuclease I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Canada) for 30 min at 37°C . All samples had an OD 260/280 nm ratio >1.9, indicating high quality and purity.

Analysis of hsp mRNA levels using real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

All PCR reactions were performed using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) as previously described. Human hsp and β -actin primers and probes were designed using Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer and probe sequences of hsp genes are shown in Table 2. To perform one-step duplex real-time quantitative RT-PCR assay, the hsp gene and endogenous control β -actin were amplified in the same tube in a reaction volume of 25 μl consisting of 1 \times TaqMan One-step RT-PCR Master Mix, TaqMan and/or MGB probes, forward and reverse primers. 10 ng of extracted total RNA from

Table 2 Primers and probes used for real-time RT-PCR analysis

Gene	Gene info-NCBI	Primer sequences	Probe sequences
β -actin	ACTB, GeneID 60	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	5'-(VIC) ATCAAGATCAATGCTCCTCCTGAGCGC (TAMRA)-3'
Hsp27	HSPB1, GeneID 3315	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' 5'-TCCTGGATGTCAACCACTTC-3'	Amplicon length 70 bp 5'-(FAM) CCCCGGACGAGCTGACGGTC (TAMRA)-3'
Hsp60	HSPD1, GeneID 3329	5'-TCTCCACCACGCCATCCT-3' 5'-GATGTTGATGGAGAAGCTCT AAGTACA-3'	Amplicon length 67 bp 5'-(FAM) TCGTCTGAATAGGCTAAAG (MGB)-3'
Hsp70	HSPA1A, GeneID 3303	5'-TGCCACAACCTGAAGACCAA-3' 5'-ACCAAGCAGACGCAGATCTTC-3'	Amplicon length 69 bp 5'-(FAM) CCTACTCCGACAACCAACCCGGG (TAMRA)-3'
Hsp90 α	HSP90AA1, GeneID 3320	5'-GCCCTCGTACACCTGGATCA-3' 5'-TGCGGTCACTTAGCCAAGATG-3'	Amplicon length 87 bp 5'-(FAM) CCCAGACCCAAGACCAACCGATGG (TAMRA)-3'
Hsp P1	HSPBP1, GeneID 23640	5'-GAAAGGCGAACGTCTCAACCT-3' 5'-TGGCCGACCTGTGTGAGA-3' 5'-GCAGGTGCATGCCAGACA-3'	Amplicon length 85 bp 5'-(FAM) CATGGACAATGCCG (MGB)-3' Amplicon length 66 bp

Forward and reverse primers together with probe sequences are listed for each gene

Table 3 Primer and probe concentrations of individual hsp real-time RT-PCR assays

	Hsp27	Hsp60	Hsp70	Hsp90	HspBP1
hsp	900/300	900/200	300/200	300/200	700/200
β -actin	300/200	300/200	300/200	300/200	200/100

Primer and probe concentrations (nmol/l) are listed as the equal forward and reverse primer concentrations/probe concentration

placental tissue and maternal whole peripheral blood was used for the detection of Hsp27, Hsp70 and Hsp90. Successful amplification of Hsp60 and HspBP1 required increased amount of total RNA (50 ng/well in case of maternal peripheral blood and 500 ng RNA/well in case of placental tissue). Primer and probe concentrations of individual hsp are shown in Table 3. Each sample was analyzed in duplicate. The thermal profile used for one-step real-time RT-PCR included reverse transcription at 48 °C for 30 min, denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of PCR with denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min. For the analysis of relative changes in hsp mRNA levels the comparative Ct method was used to interpret the data. The difference (Δ Ct) between the Ct values of the hsp and the endogenous control was calculated for each sample. RNA isolated from a randomly selected placenta derived from gestation of normal course was chosen as the reference for each comparison. The comparative $\Delta\Delta$ Ct calculation involved finding the difference between each sample's Δ Ct and the reference's Δ Ct. Finally, $\Delta\Delta$ Ct values were transformed to

absolute values using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The mRNA levels of an endogenous control (β -actin) were comparable between the studied groups.

Statistical analysis

Normality of the data was assessed using Shapiro–Wilk test, which indicated that our data did not follow a normal distribution. Therefore, hsp mRNA levels were compared between groups by non-parametric tests (the Mann–Whitney U test for the comparison between two groups and the Kruskal–Wallis test for the comparison among multiple groups) using Statistica software (version 9.0; StatSoft, Inc., USA). The significance level was established at a p value of <0.05.

Results

Hsp mRNA levels in placental tissue in patients with pregnancy related complications

Overall, significantly increased mRNA levels were observed only for Hsp27 ($p = 0.021$) in women with pregnancy related complications (gestational hypertension, preeclampsia and/or fetal growth restriction) compared to pregnancies with normal course of gestation. Consecutively, Kruskal–Wallis analysis revealed Hsp27 overexpression in the group of patients with preeclampsia w or w/o FGR ($p = 0.012$), but not in the group of patients with

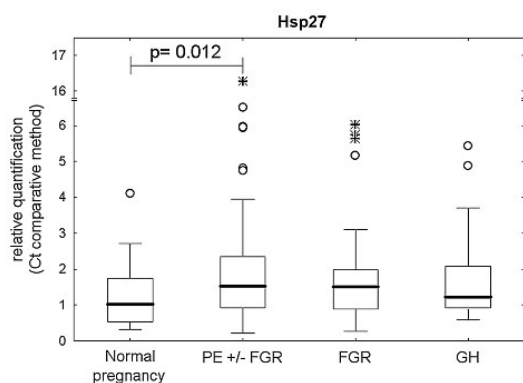


Fig. 1 Hsp27 overexpression in the central cotyledon zone of placental tissue in preeclampsia w or w/o fetal growth restriction

gestational hypertension ($p = 0.57$) or fetal growth restriction ($p = 0.22$) (Fig. 1).

The expression of Hsp60, Hsp70, Hsp90 and HspBP1 did not differ between the control group and pregnancies affected with gestational hypertension ($p = 0.85$, $p = 1.0$, $p = 1.0$, $p = 1.0$), preeclampsia w or w/o FGR ($p = 0.43$, $p = 1.0$, $p = 0.15$, $p = 0.53$) and fetal growth restriction ($p = 1.0$, $p = 1.0$, $p = 1.0$, $p = 0.27$).

The association study of hsp mRNA levels in placental tissue and the severity of the disease with respect to clinical signs, requirements for the delivery and Doppler ultrasonography monitoring

Hsp mRNA levels were analyzed in relation to the severity of the disease with respect to the degree of clinical signs (mild and severe preeclampsia) and requirements for the delivery (before and after 34 week of gestation). When compared to normal pregnancies significant upregulation of particular hsps was observed in patients with mild preeclampsia (Hsp27, $p < 0.001$; Hsp90, $p = 0.008$; HspBP1, $p = 0.012$) (Fig. 2a–c) and in pregnancies complicated with preeclampsia w or w/o FGR delivering after 34 week of gestation regardless of the degree of clinical signs (Hsp27, $p = 0.001$; Hsp90, $p = 0.05$; HspBP1, $p = 0.05$) (Fig. 3a–c).

On the other hand, no difference in hsp mRNA levels between the groups of patients with severe preeclampsia and controls was found (Hsp27, $p = 0.249$; Hsp60, $p = 0.267$; Hsp70, $p = 1.0$; Hsp90, $p = 0.706$; HspBP1, $p = 1.0$). Similarly, hsp mRNA levels did not differ between preeclamptic pregnancies with requirements for the delivery before 34 week of gestation and controls (Hsp27, $p = 0.428$; Hsp60, $p = 0.854$; Hsp70, $p = 1.0$; Hsp90, $p = 0.405$; HspBP1, $p = 1.0$).

Further, hsp mRNA levels were found significantly higher in placenta samples of patients with mild preeclampsia delivering after 34 week of gestation when compared with patients suffering from severe preeclampsia requiring the delivery before 34 week of gestation (Hsp27, $p = 0.046$; HspBP1, $p = 0.024$) (Fig. 4a, b).

Additionally, the association between hsp mRNA levels and the occurrence of previous hypertension in the group of patients with preeclampsia was determined. The statistical analyses revealed no difference between the group of preeclampsia superposed on chronic hypertension and/or gestational hypertension and the group of patients with unexpected onset of preeclampsia (Hsp27, $p = 0.259$; Hsp60, $p = 0.439$; Hsp70, $p = 0.889$; Hsp90, $p = 0.396$; HspBP1, $p = 0.561$).

The association between hsp mRNA levels in placental tissue and Doppler ultrasonography parameters was analyzed in the cohort of pregnancies complicated with preeclampsia and/or fetal growth restriction. The difference within the group of complicated pregnancies with normal and abnormal values of flow rates was assessed. The statistical analysis showed no effect of the pulsatility index in the umbilical artery (Hsp27, $p = 0.418$; Hsp60, $p = 0.862$; Hsp70, $p = 0.264$; Hsp90, $p = 0.695$; HspBP1, $p = 0.184$), the pulsatility index in the middle cerebral artery (Hsp27, $p = 0.685$; Hsp60, $p = 0.784$; Hsp70, $p = 0.813$; Hsp90, $p = 0.977$; HspBP1, $p = 0.462$) and the cerebroplacental ratio (Hsp27, $p = 0.964$; Hsp60, $p = 0.468$; Hsp70, $p = 0.404$; Hsp90, $p = 0.907$; HspBP1, $p = 0.317$) on hsp mRNA levels in placental tissue.

Hsp mRNA levels in maternal whole peripheral blood in patients with pregnancy related complications

Overall, overexpression of Hsp60 ($p = 0.006$) and Hsp70 ($p < 0.001$), and downregulation of Hsp90 ($p < 0.001$) was observed in whole peripheral blood of women with pregnancy related complications compared to normal pregnancies.

Consecutive detailed group analysis showed substantially increased Hsp70 mRNA levels in patients with gestational hypertension ($p < 0.001$), established preeclampsia w or w/o FGR ($p < 0.001$) and fetal growth restriction ($p < 0.001$) (Fig. 5a).

While whole peripheral blood mRNA levels of Hsp60 did not differ between the control group and the group of patients with gestational hypertension ($p = 0.339$), increased levels were also detected in groups of patients with established preeclampsia w or w/o FGR ($p = 0.019$) and fetal growth restriction ($p = 0.007$) (Fig. 5b).

On the other hand, significant downregulation of Hsp90 was found in groups of patients with preeclampsia w or w/o FGR ($p < 0.001$) and gestational hypertension ($p = 0.002$). In case of fetal growth restriction the decrease of Hsp90

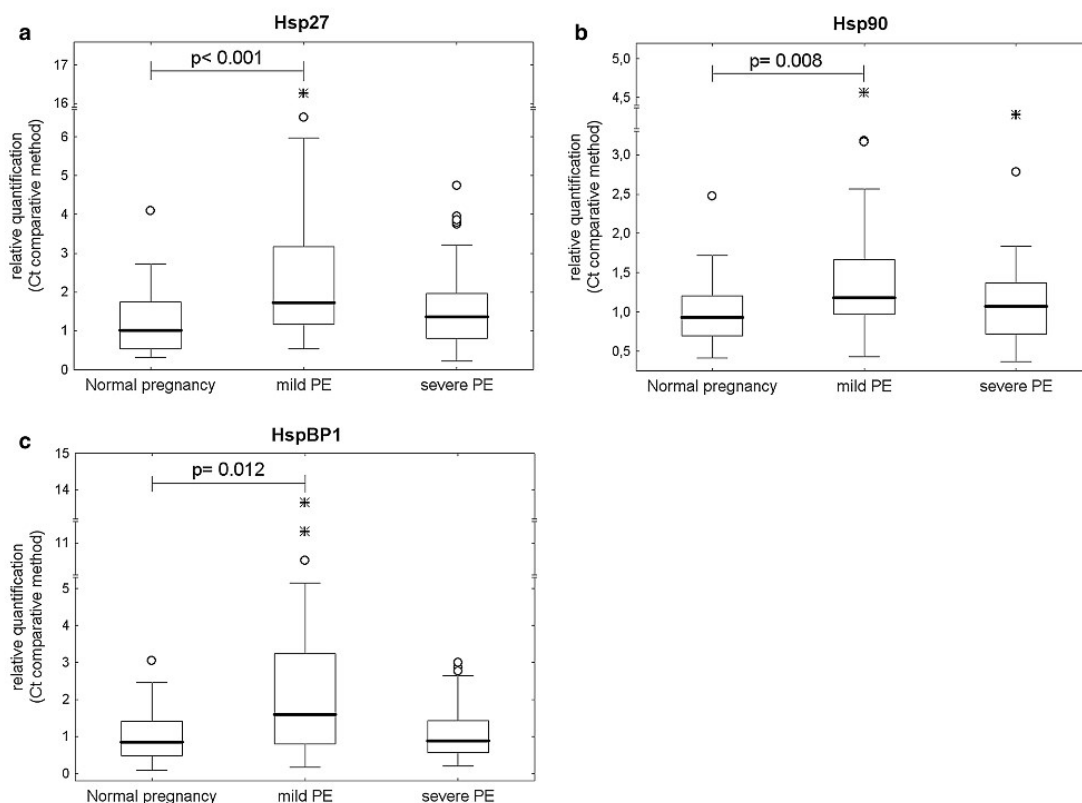


Fig. 2 Hsp27, Hsp90 and HspBP1 upregulation in the central cotyledon zone of placental tissue in patients with mild preeclampsia

mRNA levels nearly reached a statistical significance ($p = 0.068$) (Fig. 5c).

Parallel, no significant difference in Hsp27 and HspBP1 mRNA levels was observed between groups of preeclampsia w or w/o FGR ($p = 1.0$, $p = 1.0$), gestational hypertension ($p = 1.0$, $p = 0.342$), fetal growth restriction ($p = 1.0$, $p = 1.0$) and controls.

The association study of hsp mRNA levels in maternal whole peripheral blood and the severity of the disease with respect to clinical signs, requirements for the delivery and Doppler ultrasonography monitoring

No effect of the severity of the disease on hsp mRNA levels in maternal whole peripheral blood was observed. Aberrant hsp mRNA levels were detected in patients with mild preeclampsia (Hsp60, $p = 0.027$; Hsp70, $p < 0.001$; Hsp90, $p = 0.016$), as well in patients with severe symptoms of the disease (Hsp60, $p = 0.063$; Hsp70, $p < 0.001$; Hsp90, $p < 0.001$) (Fig. 6a–c).

Similarly, pregnancies complicated with preeclampsia and/or fetal growth restriction delivering before and after 34 weeks of gestation showed upregulation of Hsp60 ($p = 0.039$, $p = 0.003$), and Hsp70 ($p < 0.001$, $p < 0.001$), and downregulation of Hsp90 ($p < 0.001$, $p = 0.005$) in maternal whole peripheral blood (Fig. 7a–c).

Similarly as in placental tissue, maternal circulation showed no difference in hsp mRNA levels between the groups of patients with preeclampsia superposed on previous hypertension and patients with unexpected onset of preeclampsia (Hsp27, $p = 0.866$; Hsp60, $p = 0.688$; Hsp70, $p = 0.076$; Hsp90, $p = 0.759$; HspBP1, $p = 0.602$).

Interestingly, maternal circulation showed the most increased Hsp60 mRNA levels in patients with preeclampsia and/or fetal growth restriction that had abnormal values of flow rates in the middle cerebral artery ($p = 0.023$) and the cerebroplacental ratio ($p = 0.005$) (Fig. 8a, b). Again, no effect of the pulsatility index in the umbilical artery (Hsp27, $p = 0.778$; Hsp60, $p = 0.209$; Hsp70, $p = 0.169$; Hsp90, $p = 0.898$; HspBP1, $p = 0.885$), the pulsatility index in the middle cerebral artery (Hsp27, $p = 0.408$; Hsp70, $p = 0.506$;

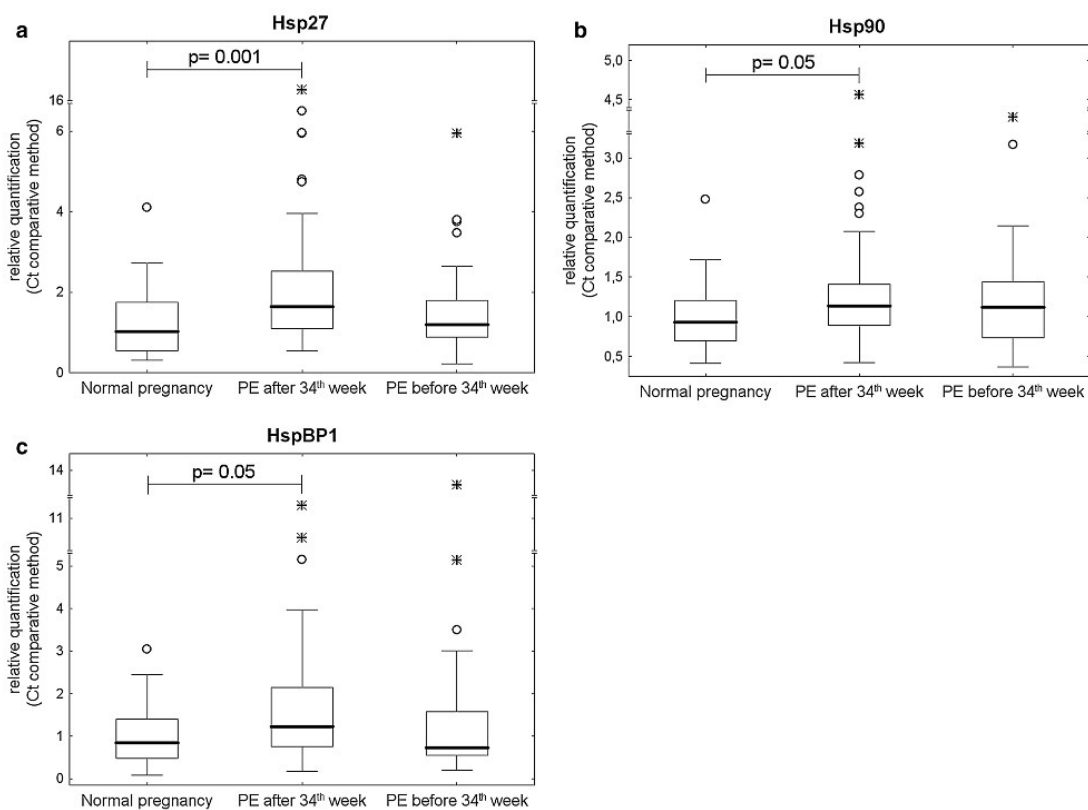


Fig. 3 Hsp27, Hsp90 and HspBP1 upregulation in the central cotyledon zone of placental tissue in pregnancies complicated with preeclampsia or w/o FGR delivering after 34 week of gestation

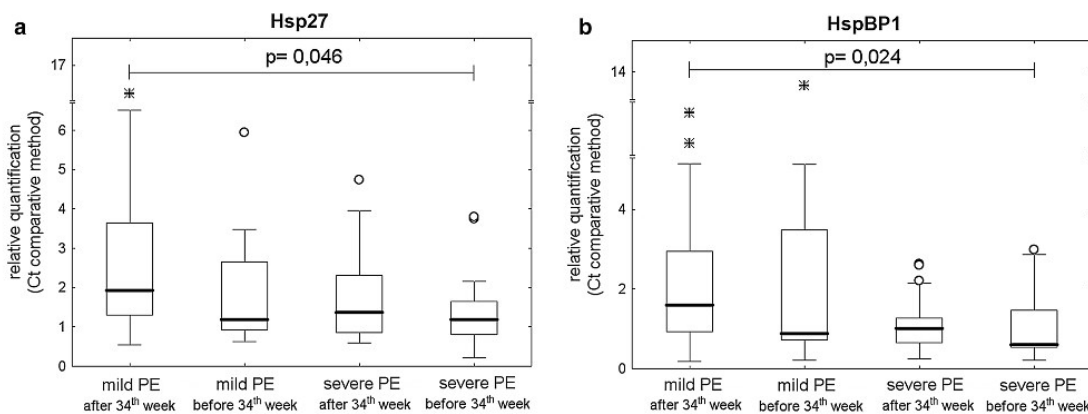


Fig. 4 Increased mRNA levels of Hsp27 and HspBP1 in the central cotyledon zone of placental tissue in patients with mild preeclampsia delivering after 34 week of gestation compared to patients with severe preeclampsia requiring the delivery before 34 week of gestation

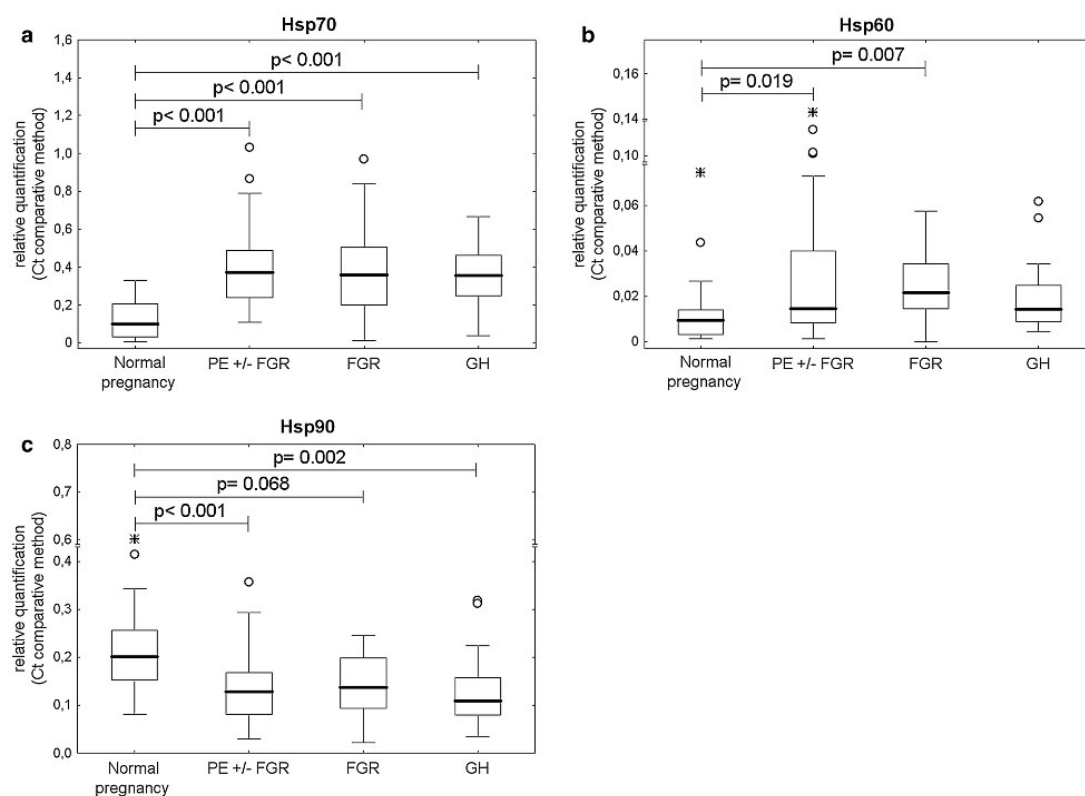


Fig. 5 Hsp mRNA levels in maternal whole peripheral blood in patients with pregnancy related complications

Hsp90, $p = 0.372$; HspBP1, $p = 0.340$) and the cerebroplacental ratio (Hsp27, $p = 0.249$; Hsp70, $p = 0.506$; Hsp90, $p = 0.355$; HspBP1, $p = 0.957$) on hsp mRNA levels in maternal whole peripheral blood was observed.

Discussion

It seems that either, maternal hypertension nor fetal growth failure have any impact on hsp mRNA levels in the central cotyledon zone of placental tissue. Serious pregnancy related complications such as severe preeclampsia that requires immediate termination of gestation via Caesarean section did not also affect hsp mRNA levels in placenta in close proximity to the cord insertion point. Aberrant Hsp mRNA levels may be observed in central cotyledon just in case of mild preeclampsia, that enable further continuation of gestation, when regularly monitored and properly treated. Our study showed that placental tissue responded to long-term deteriorated conditions (insufficient supply of maternal blood associated with a lowered

delivery of oxygen and nutrients to the fetus) by upregulation of Hsp27, Hsp90 and HspBP1 (Table 4). The results of the present study cannot be unfortunately compared with those ones presented by Liu et al., since different regions of the placenta and the severity of the disease may substantially influence hsp expression at both protein and mRNA levels. Liu et al. [27] observed Hsp70 overexpression in placental tissue (the area, which was a subject of interest, is not specified) and in purified microvascular endothelial cells in the overall group of 28 patients with placental insufficiency related disorders (preeclampsia with or without IUGR, and IUGR). The experimental data gained by Liu et al. were not also analyzed to evaluate the association with the severity of the disease with respect to clinical signs and requirements for the delivery.

The discrepancy in Hsp27 expression results between our work and Abdulsid et al. [20] study might be explained by a low number of patients involved in Abdulsid et al. study. Although, Abdulsid et al. [20] compared Hsp27 mRNA levels between control and preeclampsia groups in different regions of placenta with respect to the cord

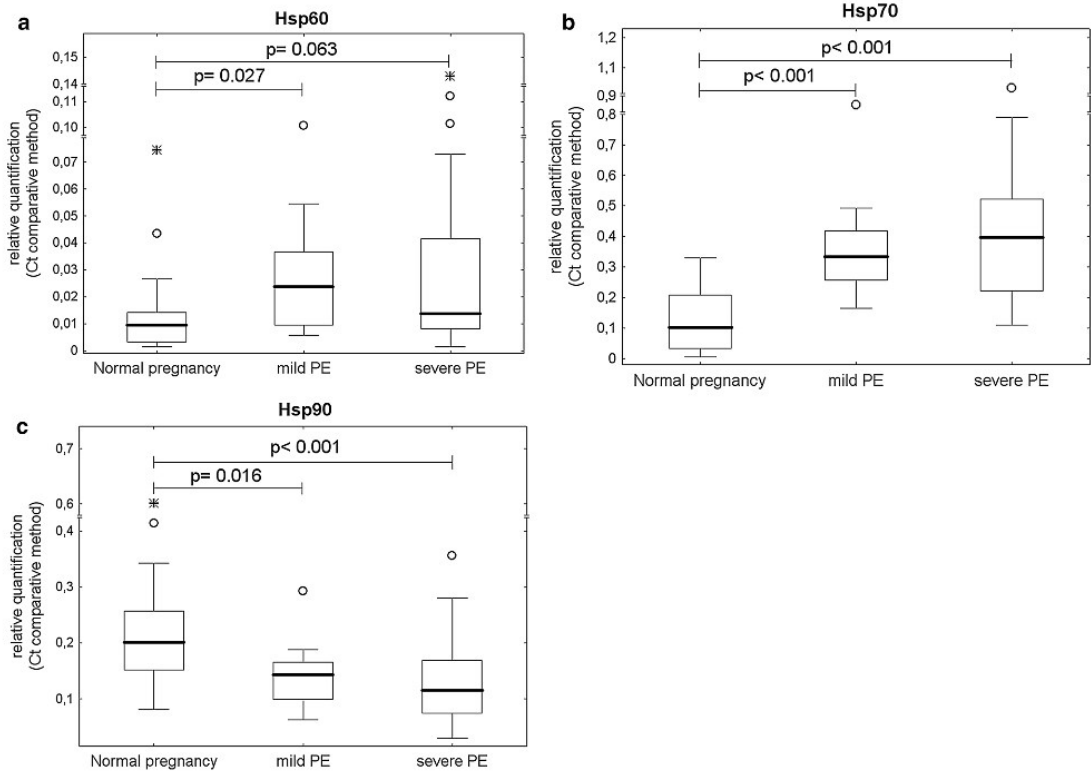


Fig. 6 Hsp60 and Hsp70 upregulation and Hsp90 downregulation in maternal whole peripheral blood in patients with mild and severe preeclampsia

insertion point distance, each group involved only 6 patients altogether. Such a low number of patients is insufficient to achieve a statistical significance.

Nevertheless, it is obvious that maternal circulation reacts in many cases to pathologic events in short order. Maternal circulation was able to reflect both maternal and fetal pathologic conditions. Maternal hypertension (gestational hypertension), preeclampsia and fetal growth restriction have always induced upregulation of Hsp70 and downregulation of Hsp90 in maternal whole peripheral blood. Hsp70 and Hsp90 dysregulation appeared in maternal circulation irrespective of the severity of the disease. It was present during the onset of mild or severe preeclampsia, as well as in pregnancies delivering before and after critical period for fetal development (the 34th week of gestation). The present genomics study performed on maternal whole peripheral blood supports the findings of previous proteomics studies that reported significantly increased levels of inducible Hsp70 in patients with transient hypertension of pregnancy and preeclampsia. However, these studies investigated just Hsp70 at protein level,

and not at Hsp70 mRNA level, in serum or plasma maternal samples.

On the other hand, Hsp60 mRNA levels in maternal whole peripheral blood differentiated between particular complications. While maternal hypertension did not have any influence on Hsp60 mRNA levels, the occurrence of preeclampsia and/or fetal growth restriction showed the increase of Hsp60 mRNA levels in maternal circulation. Hsp60 mRNA levels were increased in maternal circulation during the onset of mild preeclampsia, severe preeclampsia, and fetal growth restriction irrespective of the time of clinical symptoms manifestation (before and after 34th week of gestation). Nevertheless, the highest maternal stress response (the highest levels of Hsp60 mRNA) was observed in pregnancies with signs of the centralization of the fetal circulation, which is highly associated with the presence of fetal hypoxia [39, 40]. Centralization of the fetal circulation represents a protective reaction of the fetus against hypoxia that manifests itself in redistribution of the circulation in the brain, liver and heart at the expense of the flow reduction in the periphery [41, 42].

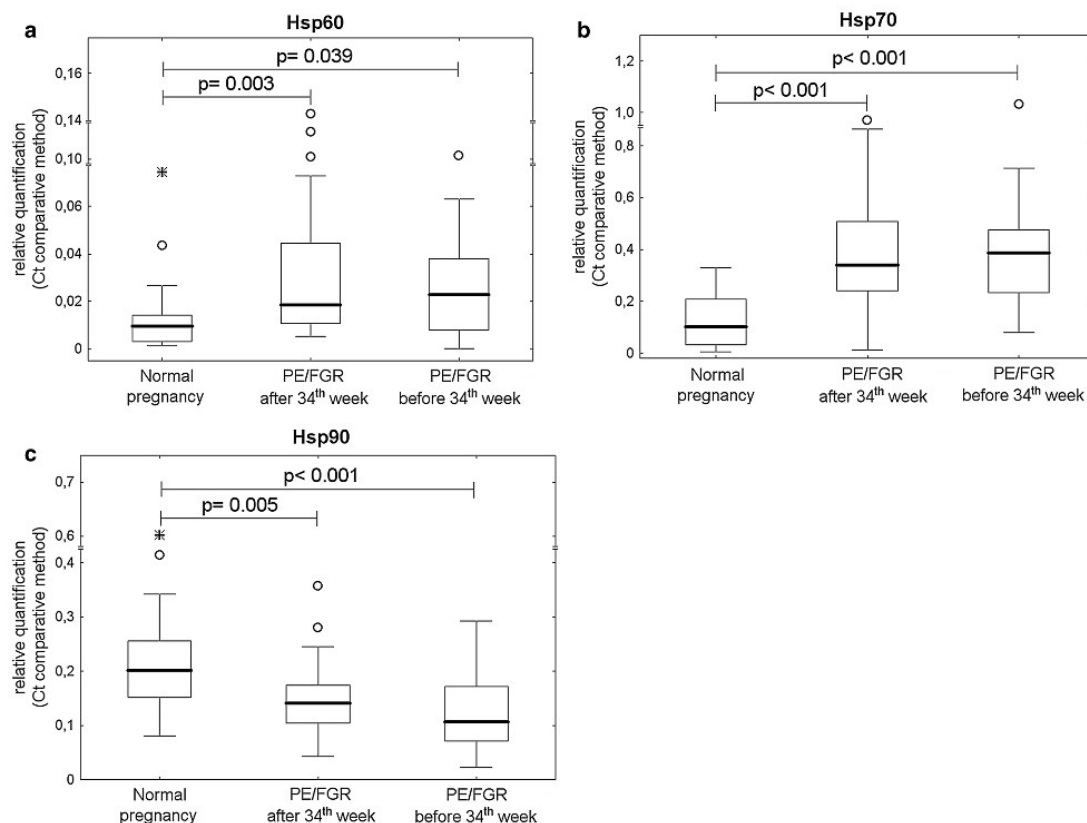


Fig. 7 Hsp60 and Hsp70 upregulation and Hsp90 downregulation in maternal whole peripheral blood in pregnancies complicated with preeclampsia and/or FGR delivering before and after 34 week of gestation

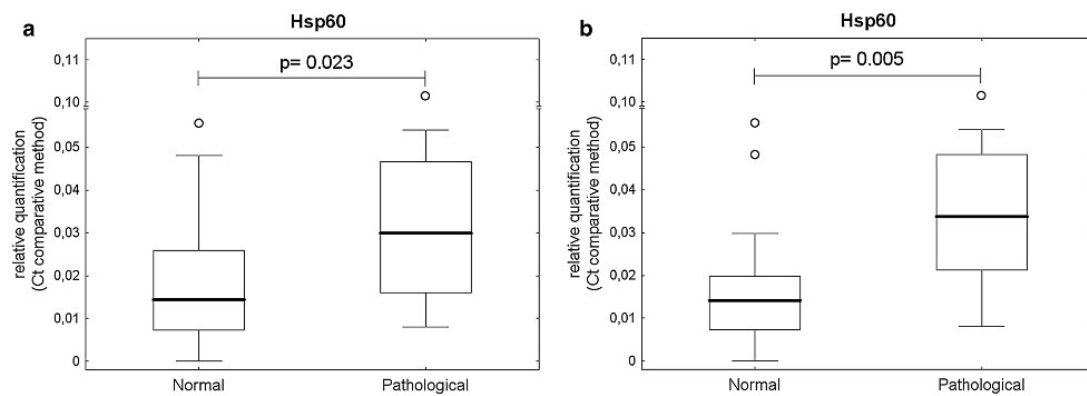


Fig. 8 Increased Hsp60 mRNA levels in patients with preeclampsia and/or fetal growth restriction with abnormal values of flow rates in the middle cerebral artery (a) and the cerebroplacental ratio (b) compared to patients with normal values of flow rates

Table 4 Hsp gene expression in the central cotyledon zone of placental tissue and in maternal whole peripheral blood in patients with pregnancy related complications

	Placental tissue, the area of central cotyledon	Maternal whole peripheral blood
Hsp27	↑ mild PEP ↑ PEP after 34th week of gestation	–
Hsp60	–	↑ mild PEP, ↑ severe PEP, ↑ FGR ↑ PEP after 34th week of gestation, ↑ PEP before 34th week of gestation ↑ abnormal PI a. cerebri media, ↑ abnormal CPR
Hsp70	–	↑ mild PEP, ↑ severe PEP, ↑ FGR, ↑ hypertension ↑ PEP after 34th week of gestation, ↑ PEP before 34th week of gestation
Hsp90	↑ mild PEP ↑ PEP after 34th week of gestation	↓ mild PEP, ↓ severe PEP, ↓ FGR ↓ hypertension ↓ PEP after 34th week of gestation, ↓ PEP before 34th week of gestation
HspBP1	↑ mild PEP ↑ PEP after 34th week of gestation	–

Conclusions

The placental tissue does not respond to pregnancy induced hypertension, fetal growth restriction and short-term severe preeclampsia that requires immediate termination of gestation. Upregulation of Hsp27, Hsp90 and HspBP1 appears just in case of long-term deteriorated conditions (usually in mild preeclampsia, that enable further continuation of gestation, when properly treated).

On the other hand, maternal circulation is able to reflect both maternal and fetal pathologic conditions. While pregnancy related complications always induce upregulation of Hsp70 and downregulation of Hsp90 in maternal whole peripheral blood, the increase of Hsp60 mRNA levels occurs entirely in patients with preeclampsia and/or fetal growth restriction. Hsp60, Hsp70 and Hsp90 are dysregulated in maternal circulation irrespective of the severity of the disease (in both mild and severe

preeclampsia) and the requirements for the delivery (before and after 34th week of gestation). Nevertheless, the highest Hsp60 mRNA levels may be observed in pregnancies with signs of the centralization of the fetal circulation associated with fetal hypoxia.

These data strongly support the need for a more detailed exploration of hsp60, hsp70 and hsp90 mRNA levels in maternal circulation with the view toward routine assessment into everyday practice, and recognition as potential non-invasive biomarkers for pregnancy related complications.

Acknowledgments The work was supported by the Charles University research program PRVOUK P32.

Conflict of interests The authors report no conflict of interests.

References

- Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (1999) Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol* 277:L1026–L1033
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56:273–279
- Mehlen P, Hickey E, Weber LA, Arrigo AP (1997) Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* 241:187–192
- Ranford JC, Coates AR, Henderson B (2000) Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2:1–17
- Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH (2006) Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. *Clin Exp Immunol* 145:183–189
- Alard JE, Dueymes M, Youinou P, Jamin C (2007) Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 6:438–443
- Frydman J, Nimmesgern E, Ohtsuka K, Hartl FU (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370:111–117
- Young JC (2010) Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol* 88:291–300
- McDonough H, Patterson C (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8:303–308
- Raynes DA, Guerriero V (1998) Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem* 273:32883–32888
- Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P (1994) A role for Hsp90 in cell cycle control: wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J* 13:6099–6106
- Hahn JS (2009) The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep* 42:623–630
- WHO (1988) World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158:80–83
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986) Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies

- complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93:1049–1059
15. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL (1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180:499–506
 16. Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A (2010) Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol* 47:1500–1506
 17. Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A (2010) Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 11:59
 18. Geisler JP, Manahan KJ, Geisler HE, Tammela JE, Rose SL, Hiatt AK, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z (2004) Heat shock protein 27 in the placentas of women with and without severe preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 31:12–14
 19. Shin JK, Baek JC, Kang MY, Park JK, Lee SA, Lee JH, Choi WS, Paik WY (2011) Proteomic analysis reveals an elevated expression of heat shock protein 27 in preeclamptic placentas. *Gynecol Obstet Invest* 71:151–157
 20. Abdulsid A, Lyall F (2013) Heat shock protein 27 expression is spatially distributed in human placenta and selectively regulated during preeclampsia. *J Reprod Immunol* doi: 10.1016/j.jri.2013.09.002
 21. Divers MJ, Bulmer JN, Miller D, Lilford RJ (1995) Placental heat shock proteins: no immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour. *Gynecol Obstet Invest* 40:236–243
 22. Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Härtig W (1999) Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7:180–185
 23. Hnat MD, Meadows JW, Brockman DE, Pitzer B, Lyall F, Myatt L (2005) Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 193:836–840
 24. Padmini E, Geetha B (2008) Placental heat shock protein 70 overexpression confers resistance against oxidative stress in preeclampsia. *Turk J Med Sci* 38:27–34
 25. Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, Harma MI, Ozdamar SO (2010) Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract* 206:651–656
 26. Padmini E, Uthra V, Lavanya S (2012) Effect of HSP70 and 90 in modulation of JNK, ERK expression in preeclamptic placental endothelial cell. *Cell Biochem Biophys* 64:187–195
 27. Liu Y, Li N, You L, Liu X, Li H, Wang X (2008) HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Mol Med* 14:561–566
 28. Abdulsid A, Hanretty K, Lyall F (2013) Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia. *PLoS ONE* 8:e54540
 29. Wataba K, Saito T, Takeuchi M, Nakayama M, Suehara N, Kudo R (2004) Changed expression of heat shock proteins in various pathological findings in placentas with intrauterine fetal growth restriction. *Med Electron Microsc* 37:170–176
 30. Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Tempfer C, Knöfler M, Husslein P, Zeisler H (2002) Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: a pilot-study. *Wien Klin Wochenschr* 114:730–732
 31. Fukushima A, Kawahara H, Isurugi C, Syoji T, Oyama R, Sugiyama T, Horiuchi S (2005) Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 31:72–77
 32. Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J (2006) Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens* 20:780–786
 33. Molvarec A, Rigó J, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z (2009) Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 14:151–159
 34. Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, Rudge MV, Witkin SS, Peraçoli MT (2013) High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol* 100:129–134
 35. Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J Jr (2007) Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol* 73:172–179
 36. Molvarec A, Tamási L, Losonczy G, Madách K, Prohászka Z, Rigó J Jr (2010) Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones* 15:237–247
 37. Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr (2011) Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. *Clin Chim Acta* 412:1957–1962
 38. Madách K, Molvarec A, Rigó J Jr, Nagy B, Péntes I, Karádi I, Prohászka Z (2008) Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 139:133–138
 39. Johnson GN, Palahniuk RJ, Tweed WA, Jones MV, Wade JG (1979) Regional cerebral blood flow changes during severe fetal asphyxia produced by slow partial umbilical cord compression. *Am J Obstet Gynecol* 135:48–52
 40. Di Renzo GC, Luzzi G, Cucchia GC, Caserta G, Fusaro P, Perdikaris A, Cosmi EV (1992) The role of Doppler technology in the evaluation of fetal hypoxia. *Early Hum Dev* 29:259–267
 41. Vyas S, Nicolaides KH, Bower S, Campbell S (1990) Middle cerebral artery flow velocity waveforms in fetal hypoxaemia. *Br J Obstet Gynaecol* 97:797–803
 42. Cohn HE, Sacks EJ, Heymann MA, Rudolph AM (1974) Cardiovascular responses to hypoxemia and acidemia in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 120:817–824

Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction

Iлона Hromadnikova¹, Lenka Dvorakova¹, Katerina Kotlabova¹, Andrea Kestlerova², Lucie Hympanova^{1,2}, Veronika Novotna², Jindrich Doucha³ & Ladislav Krofta²

¹Department of Molecular Biology & Cell Pathology, The Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, 100 00 Prague, ²The Third Faculty of Medicine, Institute for the Care of the Mother & Child, Charles University, Podolske Nabrezi 157/36, 147 00 Prague, ³Clinic of Obstetrics & Gynecology, The Second Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic

Received April 1, 2014

Background & objectives: Heat shock proteins (Hsp) are ubiquitously distributed phylogenetically conserved molecules that regulate cellular homeostasis and maintain the integrity and function of cellular proteins. Increased levels of Hsp in maternal circulation have been shown to be associated with increased risk of pregnancy related complications. The objective of this study was to explore extracellular Hsp mRNA levels in maternal circulation and quantified Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp70 binding protein 1 (HspBPI) mRNAs in maternal plasma samples using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

Methods: Pregnancies with gestational hypertension (GH) (n = 33), pre-eclampsia (PE) with or without foetal growth restriction (FGR) (n = 78) and FGR (n = 25) were involved in the study. Hsp gene expression was analysed in relation to the severity of the disease with respect to the degree of clinical signs, requirements for the delivery and Doppler ultrasound parameters.

Results: Upregulation of Hsp70 was observed in patients with mild and severe PE ($P = 0.004$ and $P = 0.005$, respectively) and in pregnancies complicated with PE delivering before and after 34 wk of gestation regardless of the degree of clinical signs ($P = 0.015$ and $P = 0.009$, respectively). No difference in the expression of other Hsp genes among the studied groups was observed. No association between Hsp gene expression and Doppler ultrasonography parameters was found.

Interpretation & conclusions: These data support that maternal circulation can reflect both maternal and foetal pathologic conditions. Hsp70 represents the sole plasmatic marker, and increased Hsp70 mRNA levels reflect maternal and placental stress response to pregnancy-related complications such as GH and PE, irrespective of the severity of the disease.

Key words Foetal growth restriction - gestational hypertension - heat shock protein - maternal circulation - pre-eclampsia

Pre-eclampsia (PE) and foetal growth restriction (FGR) is the major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality in 2-10 per cent of pregnant women^{1,2}. PE is characterized by gestational

hypertension (GH) combined with proteinuria after 20 wk of gestation³. FGR is defined as foetal growth less than the 10th percentile for appropriate gestational age. The causes of PE and FGR remain unknown. It is believed that PE results mainly from defective placentation and insufficient maternal spiral artery remodelling that elicit inadequate uteroplacental blood perfusion, ischaemia and finally generalized maternal systemic inflammatory response⁴⁻⁶. Elevated amounts of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules in the maternal circulation have been shown to play a central role in the excessive systemic inflammatory response and in the generalized endothelial dysfunction characteristics of PE⁷. Moreover, pre-eclamptic patients have been demonstrated to have significantly higher levels of C-reactive protein and particular complement components including terminal complement complex SC5b9⁸.

Heat shock proteins (Hsps) are ubiquitously distributed phylogenetically conserved molecules present in the cells of all living organisms. Under physiological conditions, the stress proteins are expressed in low concentrations as the constitutive proteins, regulating cellular homeostasis and maintaining the integrity and function of other cellular proteins^{9,10}. Human Hsps are categorized under distinct families based on their functions in the cells, their homologies in the primary structures and their approximate molecular weight, measured in kDa. These families are as follows: a family of small Hsps, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp110¹¹.

Elevated circulating Hsp70 concentrations reflecting systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury were found to be associated with an increased risk of several pregnancy-related complications including transient hypertension of pregnancy, PE, haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet syndrome and pre-term delivery¹²⁻¹⁷. Elevation of circulating Hsp70 levels was also observed in pregnant asthmatic women compared to healthy pregnant women¹⁸.

Since most investigators studied Hsp expression at protein level in placental tissues¹⁹⁻²² and maternal circulation (serum or plasma samples)¹²⁻¹⁸, we focused on the examination of Hsp expression at mRNA level. Among differentially expressed proteins, previous studies identified Hsp27 and Hsp70 to be upregulated in placental tissues derived from patients with PE¹⁹⁻²².

Several researchers pointed to the fact that the expression of various Hsps might vary in different placental zones. Although the protein levels of total Hsp60 and Hsp90 did not differ in placental and decidual tissues between normal and complicated pregnancies^{23,24}, the expression of Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90 was shown to be higher in the thrombus and lower in the infarction than in control samples²⁵. A novel Hsp70 co-chaperone called Hsp70 binding protein 1 (HspBP1) was included in the study since this intracellular protein abundant in tissues, was found to inhibit substantially antiapoptotic function of Hsp70²⁶.

There is a lack of information on *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* and *HspBP1* gene expression in patients affected with PE and/or FGR. We therefore, undertook this study to evaluate *Hsp* mRNA levels as also Hsp BP1 level in plasma samples from pregnant women with GH.

Material & Methods

This study was designed in a retrospective consecutive manner within the period ranging from January 2011 to January 2014. Samples of maternal peripheral blood from complicated pregnancies were collected at the Institute for the Care of the Mother and Child (Prague, Czech Republic), mostly during the hospital admission. Samples from pregnancies with the normal course of gestation were collected during regular check-up in the 36th wk of gestation in the Clinic of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Motol (Prague, Czech Republic). The study included 78 pregnant women with clinically established PE with or without FGR, 25 pregnancies complicated by FGR, 33 with GH and 39 normal pregnancies. Of the 78 patients with PE, 27 had symptoms of mild PE and 51 women were diagnosed with severe PE. Thirty pre-eclamptic women required the delivery before 34 wk of gestation and 48 women delivered after 34 wk of gestation. PE occurred both in previously normotensive patients (56 cases) and in a form superimposed on previous hypertension (22 cases). Seven growth-retarded fetuses were delivered before 34 wk of gestation and 18 after 34 wk of gestation. Oligohydramnios or anhydramnios was present in nine growth-restricted fetuses. The examination of the flow of blood vessels (Doppler ultrasonography) showed an abnormal pulsatility index (PI) in the umbilical artery (abnormal values above the 95th percentile detected in 12 pre-eclamptic and 14 FGR cases) and/or in the middle cerebral artery (abnormal values below the

5th percentile detected in 9 pre-eclamptic and 5 FGR cases). Cerebroplacental ratio (CPR), expressed as a ratio between middle cerebral artery and umbilical artery PI, was below the 5th percentile in 17 cases (8 pre-eclamptic and 9 FGR cases). Absent or reversed end-diastolic velocity waveforms in the umbilical artery occurred in four cases (2 pre-eclamptic and 2 FGR cases).

Women with normal pregnancies were defined as those without medical, obstetrical or surgical complications at the time of the study and who subsequently delivered full-term, singleton, healthy infants weighing >2500 g after 37 completed wk of gestation. PE was defined as blood pressure >140/90 mmHg in two determinations four hours apart that was associated with proteinuria >300 mg/24 h after 20 wk of gestation³. Severe PE was diagnosed by the presence of one or more of the following findings: (i) systolic blood pressure >160 mmHg or diastolic blood pressure >110 mmHg, (ii) proteinuria >5 g of protein in a 24 h sample, (iii) very low urine output (<500 ml in 24 h), (iv) signs of respiratory problems (pulmonary oedema or cyanosis), (v) impairment of liver function, (vi) signs of central nervous system problems (severe headache and visual disturbances), (vii) pain in the epigastric area or right upper quadrant, (viii) thrombocytopenia, and (ix) presence of severe FGR³. FGR was diagnosed when the estimated foetal weight, calculated using the Hadlock formula (Astraia Software GmbH), was below the 10th percentile for the evaluated gestational age, adjustments were made for the appropriate population standards of the Czech Republic. The clinical characteristics of the normal and complicated pregnancies are shown

in Table I. All patients who participated in this study provided written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

Processing of samples and total RNA isolation: Peripheral blood (9 ml) was collected into ethylenediaminetetraacetic acid tubes and centrifuged twice at 1200 g for 10 min at room temperature. Plasma samples were stored at -80°C until further processing. Total RNA was extracted from one ml of maternal plasma using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. To minimize DNA contamination, the eluted RNA was treated with five µl of deoxyribonuclease I (DNase I, Fermentas International, Ontario, Canada) for 30 min at 37°C.

Analysis of relative Hsp gene expression using real-time RT (reverse transcriptase)-PCR: All PCR reactions were performed using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) as previously described²⁷. Human *Hsp* and *β-actin* primers and probes were designed using Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, USA). The primer/probe sequences and concentrations used for the amplification of the target and reference genes were as follows (5'→3'):

Hsp27, HSPB1: forward primer 5'-TCCCCTGGATGTCAACCACTTC-3' (900 nmol/l); reverse primer 5'-TCTCCACCACGCCATCCT-3' (900 nmol/l); probe 5'-(FAM) CCCCAGACGAGCTGACGGTC (TAMRA)-3' (300 nmol/l).

Table I. Clinical characteristics of women with normal and complicated pregnancies

Characteristics	Healthy pregnant women (n=39)	Pre-eclamptic patients (n=78)	Pregnant women with FGR (n=25)	Pregnant women with GH (n=33)
Age (yr)	33 (30-35)	34 (29-37)	32 (28-36)	30 (29-33)
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	120 (112-128)	156 (150-163)	127 (115-139)	155 (150-165)
Diastolic	76 (70-80)	100 (90-103)	80 (75-86)	100 (93-100)
Proteinuria (g/24 h)	None	1.23 (0.55-3.4)	None	None
Gestational age at delivery (wk)	40 (39-40)	36 (31-38)	36 (34-38)	39 (37-39)
Mode of delivery (%)				
Vaginal	28 (71.8)	13 (16.7)	9 (36)	19 (57.6)
Caesarean section	11 (28.2)	65 (83.3)	16 (64)	14 (42.4)
Foetal birth weight (g)	3380 (3142-3645)	2450 (1442-3220)	2160 (1925-2610)	3210 (2880-3620)

Data are presented as median (25-75 percentile) for continuous variables and as n (%) for categorical variables. FGR, foetal growth restriction; GH, gestational hypertension

Hsp60, *HSPD1*: forward primer 5'-GATGTTGATGGAGAAGCTCTAAGTACA-3' (900 nmol/l); reverse primer 5'-TGCCACAACCTGAAGACCAA-3' (900 nmol/l); probe 5'-(FAM) TCGTCTTGAATAGGCTAAAG (MGB)-3' (200 nmol/l).

Hsp70, *HSPA1A*: forward primer 5'-ACCAAGCAGACGCAGATCTTC-3' (300 nmol/l); reverse primer 5'-GCCCTCGTACACCTGGATCA-3' (300 nmol/l); probe 5'-(FAM) CCTACTCCGACAACCAACCCGGG (TAMRA)-3' (200 nmol/l).

Hsp90 α , *HSP90A1*: forward primer 5'-TGCGGTCACTTAGCCAAGATG-3' (300 nmol/l); reverse primer 5'-GAAAGGCGAACGTCTCAACCT-3' (300 nmol/l); probe 5'-(FAM) CCCAGACCCAAGACCAACCGATGG (TAMRA)-3' (200 nmol/l).

HspBP1, *HSPBP1*: forward primer 5'-TGGCCGACCTGTGTGAGA-3' (700 nmol/l); reverse primer 5'-GCAGGTGCATGCCAGACA-3' (700 nmol/l); probe 5'-(FAM) CATGGACAATGCCG (MGB)-3' (200 nmol/l).

β -actin, *ACTB*: forward primer 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' (300 nmol/l for *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90 α* and 200 nmol/l for *HspBP1*); reverse primer 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' (300 nmol/l for *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90 α* and 200 nmol/l for *HspBP1*); probe 5'-(VIC) ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC (TAMRA)-3' (200 nmol/l for *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90 α* and 100 nmol/l for *HspBP1*).

To perform one-step duplex quantitative RT-PCR assay²⁷, the *Hsp* gene and endogenous control *β -actin* were amplified in the same tube in a reaction volume of 25 μ l consisting of 1 \times TaqMan One-step RT-PCR Master Mix, TaqMan and/or MGB probes, forward and reverse primers (*Hsp* and *β -actin* primers and probe; Applied Biosystems, USA). Ten nanogram of extracted total RNA from maternal plasma was used for the detection of *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* and *HspBP1*. Each sample was analysed in duplicate. The thermal profile for one-step real-time RT-PCR included reverse transcription at 48°C for 30 min, denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of PCR with denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 60°C for one

minute. For the analysis of relative changes in gene expression, the comparative C_T method²⁸ was used to interpret the data. The difference (ΔC_T) between the C_T values of the *Hsp* and the endogenous control was calculated for each sample. RNA isolated from a randomly selected placenta derived from gestation of normal course was chosen as the reference for each comparison. The comparative $\Delta\Delta C_T$ calculation involved finding the difference between each sample's ΔC_T and the reference's ΔC_T . Finally, $\Delta\Delta C_T$ values were transformed to absolute values using the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Statistical analysis: Tests of normality of the population distribution of random characteristics (patients' age, systolic and diastolic blood pressure, gestational age at delivery and foetal birth weight) together with the tests of normality of observed data (*Hsp* gene expression in maternal plasma samples) were performed using Shapiro–Wilk test. Half of the clinical characteristics in groups of normal and complicated pregnancies did not show a normal distribution. Further, all experimental data did not follow a normal distribution (Table II). Therefore, *Hsp* mRNA levels were compared between groups by non-parametric tests (Mann–Whitney U-test for the comparison between two groups and Kruskal–Wallis test for the comparison among multiple groups) using Statistica software (version 9.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Odds ratio (OR), the likelihood that the outcome occurred in the exposure/intervention group as compared to the control group, was calculated using MedCalc MedCalc Software bvba, Microsoft Partner, Silver Application Development, Ostend, Belgium).

Results

Given that *HspBP1* was not detectable in maternal plasma samples and *Hsp60* showed positive amplification in a limited number of maternal plasma samples, it was decided to exclude them from further analyses. Subsequently, it was determined whether plasma concentrations of *Hsp27*, *Hsp70* and *Hsp90* mRNAs were related to pregnancy complications.

***Hsp* gene expression in maternal plasma samples in patients with pregnancy-related complications:** Overall, significantly increased expression was observed only for *Hsp70* ($P < 0.001$) in women with pregnancy-related complications (GH, PE and/or FGR) compared to pregnancies with normal course of gestation. Kruskal–Wallis analysis revealed *Hsp70* overexpression in the group of patients with PE with

Table II. Shapiro–Wilk test - assumptions of normal distribution

Patients group	Tests for the normality of data									
	Clinical characteristics									
	Maternal age		Systolic blood pressure		Diastolic blood pressure		Gestational age at delivery		Foetal birth weight	
	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>
Healthy pregnant women	0.90824	0.00383	0.98340	0.83309	0.95862	0.17108	0.92828	0.01765	0.98826	0.95474
Pre-eclamptic patients	0.96520	0.03145	0.97581	0.24053	0.97639	0.24826	0.91434	0.00008	0.95384	0.01158
Patients with FGR	0.94958	0.24537	0.87791	0.00626	0.94379	0.18097	0.81635	0.00043	0.90262	0.02864
Patients with GH	0.93330	0.04265	0.97521	0.75956	0.94766	0.20433	0.93330	0.04349	0.96289	0.57621

Patients group	<i>Hsp</i> gene expression in maternal plasma					
	Hsp27		Hsp70		Hsp90	
	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>P</i>
Healthy pregnant women	0.30623	<0.001	0.55332	<0.001	0.78146	<0.001
Pre-eclamptic patients	0.54569	<0.001	0.46940	<0.001	0.63143	<0.001
Patients with FGR	0.55156	<0.001	0.78182	<0.001	0.79048	<0.001
Patients with GH	0.47074	<0.001	0.35162	<0.001	0.69470	<0.001

FGR, foetal growth restriction; GH, gestational hypertension

or without FGR ($P = 0.002$) and GH ($P = 0.003$), but not in the group of patients with FGR. Plasma levels of *Hsp70* mRNA between the groups of patients with PE with or without FGR and GH did not differ (Fig. 1). The odds of having *Hsp70* mRNA levels above cut-off (median plus standard deviation of normal pregnancies) was similar between the groups of patients with PE with or without FGR [$P < 0.001$; OR: 8.31; 95% confidence interval (CI): 2.69-25.62] and GH ($P < 0.001$; OR: 8.23; 95% CI: 2.38-28.44). The expression of Hsp27 and Hsp90 did not differ between the control group and pregnancies affected with GH, PE with or without FGR and FGR.

Association of Hsp gene expression in maternal plasma samples and severity of disease with respect to clinical signs, requirements for the delivery and Doppler ultrasonography monitoring: *Hsp* gene expression was analysed in relation to the severity of the disease with respect to the degree of clinical signs (mild and severe PE) and requirements for the delivery (before and after 34 wk of gestation). When compared to normal pregnancies, significant upregulation of *Hsp70* was observed in patients with mild and severe PE ($P = 0.004$ and $P = 0.005$, respectively, Fig. 2) and in pregnancies complicated with PE with or without FGR delivering before and after 34 wk of gestation regardless of the degree of clinical signs ($P = 0.015$ and $P = 0.009$,

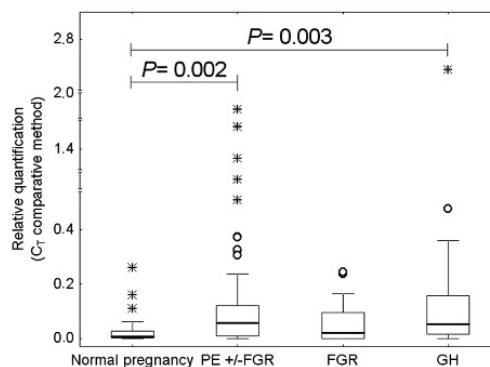


Fig. 1. Heat shock protein 70 (*Hsp70*) overexpression in maternal plasma samples derived from patients with gestational hypertension (GH) and pre-eclampsia (PE) with or without foetal growth restriction (FGR).

respectively, Fig. 3). However, *Hsp70* mRNA levels did not differ between the patients with mild and severe PE (Fig. 2) and between those who delivered before and after 34 wk of gestation (Fig. 3). The highest estimated odd ratios of having *Hsp70* mRNA levels above cut-off (median plus standard deviation of normal pregnancies) were detected in patients with severe PE ($P < 0.001$; OR: 9.84; 95% CI: 3.05-31.77) and those who delivered

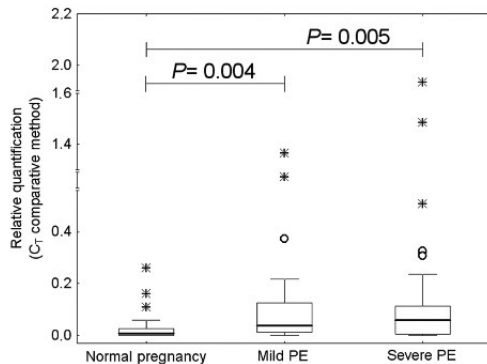


Fig. 2. Increased circulating heat shock protein 70 (*Hsp70*) mRNA levels in patients with mild and severe pre-eclampsia (PE).

before 34 wk of gestation ($P < 0.001$; OR: 11.44; 95% CI: 3.24-40.4) when compared with the group of patients with mild PE ($P = 0.003$; OR: 7.0; 95% CI: 1.94-25.25) and those who delivered after 34 wk of gestation ($P < 0.001$; OR: 8.05; 95% CI: 2.47-26.18).

No difference in *Hsp* gene expression between the groups of patients with mild or severe PE and controls was found. Similarly, *Hsp* mRNA levels did not differ between pre-eclamptic pregnancies with requirements for the delivery before and after 34 wk of gestation and controls. In addition, the association between *Hsp* gene expression and the occurrence of previous hypertension in the group of patients with PE was determined. The analyses revealed no difference between the group of PE superposed on chronic hypertension and/or GH and the group of patients with unexpected onset of PE.

The association between *Hsp* gene expression in maternal plasma and Doppler ultrasonography parameters was analysed in the pregnancies complicated with PE and/or FGR. The difference within the group of complicated pregnancies with normal and abnormal values of flow rates was assessed. The analysis showed no effect of the PI in the umbilical artery, the PI in the middle cerebral artery and the CPR on *Hsp* mRNA levels in maternal circulation. Summary of data resulting from statistical analyses is shown in Table III.

Discussion

Circulating nucleic acids such as DNA, mRNA and microRNAs present in maternal plasma or serum samples are increasingly being used as biomarkers for monitoring of pregnancy-related complications.

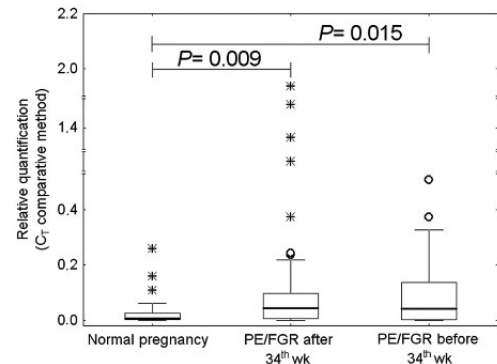


Fig. 3. Increased circulating heat shock protein 70 (*Hsp70*) mRNA levels in pregnancies complicated with pre-eclampsia (PE) with or without foetal growth restriction (FGR) delivering before and after 34 wk of gestation.

Extracellular nucleic acids present in maternal circulation are predominantly haematopoietic in origin²⁹. Placental insufficiency-related pregnancy complications have been shown to be associated with an excessive placental trophoblast apoptosis and shedding of placenta debris^{4,5}. The Redman hypothesis proposes that release of a continuous stream of placental debris into the maternal circulation provokes a systemic inflammatory response in all women, which is exaggerated, if the burden of the debris is abnormally high (when the placenta is oxidatively stressed secondary to spiral artery disease) or if the woman responds excessively to the process^{4,5}. PE usually appears when the inflammatory responses begin to decompensate. The problem with the placenta is generally considered to be an inadequate uteroplacental circulation leading to placental hypoxia, oxidative stress and, in the most severe cases, infarction. Two abnormalities, affecting the spiral arteries, are known to predispose to PE: the arteries may be either too small because of deficient placentation, or obstructed because of acute atherosclerosis or both^{4,5}.

We hypothesize that maternal circulation can reflect both maternal and placental pathologic conditions through the mediation of diverse *Hsp* gene expression profiles. Since *Hsp60* and *HspBP1* mRNA are not detectable in maternal plasma samples and *Hsp27* and *Hsp90* mRNA show comparable levels regardless of the course of gestation, *Hsp70* represents the sole plasmatic marker. Increased *Hsp70* mRNA levels reflect maternal and placental stress response to

pregnancy-related complications such as GH and PE. Our data supported the finding of other investigators who reported significantly higher protein levels of total Hsp70, constitutive and induced forms of Hsp70 in PE along with oxidative stress in placental tissues²⁰⁻²². Our finding was in compliance with the results of other studies demonstrating elevated circulating Hsp70 concentrations in pregnancy-related complications including transient hypertension of pregnancy and PE¹²⁻¹⁷. Hsp70 represents an antioxidative stress marker. The overexpression of Hsp70 and the heat shock transcription factor (Hsf1) seen in the pre-eclamptic endothelial cells suggests its possible protective role as stress-specific natural adaptive response against the generated stress³⁰. As proposed by Molvarec *et al*¹⁵, we hypothesise that haemodynamic stress, oxidative stress (placental or systemic), placental ischaemia, ischaemia of other organs as well as maternal systemic inflammatory

response may contribute to the overexpression of Hsp70, resulting in elevated circulating Hsp70 levels. The possible cause of *Hsp70* mRNA overexpression in the maternal circulation of women with PE may be a compilation of several events: the activation of circulating maternal leucocytes, mainly monocytes, as a response to placental hypoxia and excessive amount of placental debris in maternal circulation. Both activated maternal leucocytes and placental debris released into maternal circulation may be a source of high circulating *Hsp70* mRNA levels.

Former studies evaluating the relationship between PE or intrauterine growth restriction and expression of total Hsp60 and Hsp90 revealed that a stress response in placental and decidual tissues, as determined by immunohistochemical and immunofluorescence analyses, was not associated with pregnancy outcome^{23,24}. Most likely, there will be very low levels of *Hsp60* mRNA inside placental

Table III. Summary results on association of *Hsp* gene expression and Doppler ultrasonography parameters

Group comparison	<i>Hsp27</i>	<i>Hsp70</i>	<i>Hsp90</i>
	$H(3, n=173)=3.280897$ $P=0.350$	$H(3, n=174)=16.93786$ $P<0.001$	$H(3, n=173)=4.386463$ $P=0.223$
Controls/PE ± FGR (<i>P</i>)	1.0	0.002	0.271
Controls/FGR (<i>P</i>)	1.0	0.996	1.0
Controls/GH (<i>P</i>)	1.0	0.003	1.0
PE/GH (<i>P</i>)	1.0	1.0	1.0
	$H(2, n=116)=3.04827$ $P=0.218$	$H(2, n=116)=13.68146$ $P=0.001$	$H(2, n=116)=4.770630$ $P=0.092$
Controls/mild PE (<i>P</i>)	0.246	0.004	0.114
Controls/severe PE (<i>P</i>)	1.0	0.005	0.335
mild PE/severe PE (<i>P</i>)	0.686	1.0	1.0
	$H(2, n=141)=5.827881$ $P=0.054$	$H(2, n=141)=10.75257$ $P=0.005$	$H(2, n=141)=4.237187$ $P=0.120$
Controls/PE ± FGR delivery before 34 wk (<i>P</i>)	1.0	0.015	0.118
Controls/PE ± FGR delivery after 34 wk (<i>P</i>)	0.183	0.009	0.348
PE ± FGR delivery before versus after 34 wk (<i>P</i>)	0.241	1.0	1.0
Superposed PE/unsuperposed PE (<i>P</i>)	0.842	0.761	0.937
PI in the umbilical artery (<i>P</i>)			
Normal versus abnormal values of the flow rate	0.126	0.872	0.199
PI in the middle cerebral artery (<i>P</i>)			
Normal versus abnormal values of the flow rate	0.465	0.392	0.465
Cerebroplacental ratio (<i>P</i>)			
Normal versus abnormal values of the flow rate	0.145	0.379	0.065

Hsp mRNA levels were compared between groups by non-parametric tests (Mann–Whitney U-test for the comparison between two groups and Kruskal–Wallis test for the comparison among multiple groups). PE, pre-eclamptic pregnancies; GH, pregnancies with gestational hypertension; FGR, foetal growth restriction; Hsp, heat shock protein; PI, pulsatility index

debris released into maternal circulation throughout gestation. Our unpublished data also revealed very low levels of *Hsp60* mRNA in maternal whole peripheral blood samples derived from women with normal and complicated pregnancies. That could be the reason for rarely detectable circulating *Hsp60* mRNA in maternal plasma samples.

We presumed that very low (hardly detectable) *HspBP1* mRNA circulating levels were closely related to the high *Hsp70* mRNA extracellular levels. *Hsp70* directly inhibits apoptosis. *HspBP1* binds to the ATPase domain of *Hsp70* and inhibits its ability to refold denatured proteins²⁶. Molar ratio of *HspBP1* to *Hsp70* in cells is an important determinant of the function of the resulting complex. The excess of *HspBP1* enhances the proapoptotic effect in all cells and *vice versa*, the lack of *HspBP1* enables *Hsp70* to carry out cytoprotective properties through its antiapoptotic function.

In conclusion, our findings support that women with pregnancy-related complications may benefit from the exploration of extracellular *Hsp70* mRNA levels in maternal circulation.

Acknowledgment

This work was supported by the Charles University research programme PRVOUK P32, Czech Republic.

Conflicts of Interest: None.

References

- Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International collaborative study of hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158 : 80-3.
- Bamfo JE, Odibo AO. Diagnosis and management of fetal growth restriction. *J Pregnancy* 2011; 2011 : 640715.
- ACOG Committee on Practice Bulletins – Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 2002; 99 : 159-67.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180 (2 Pt 1) : 499-506.
- Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol* 2004; 24 : 565-70.
- Khong TY, De Wolf E, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93 : 1049-59.
- Szarka A, Rigó J Jr., Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11 : 59.
- Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr., Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol* 2010; 47 : 1500-6.
- Nover L. Heat shock response of eukaryotic cells. Berlin: Springer-Verlag; 1984. p. 7-10.
- Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. The stress response, function of the proteins, and perspectives. In: Stress Proteins in Biology and Medicine. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990. p. 1-37.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14 : 105-11.
- Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Tempfer C, Knöfler M, Husslein P, Zeisler H. Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: a pilot-study. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114 : 730-2.
- Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, Karádi I, et al. Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens* 2006; 20 : 780-6.
- Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Füst G, et al. Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol* 2007; 73 : 172-9.
- Molvarec A, Rigó J Jr., Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, et al. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14 : 151-9.
- Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, et al. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2013; 100 : 129-34.
- Madách K, Molvarec A, Rigó J Jr., Nagy B, Péntes I, Karádi I, et al. Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 139 : 133-8.
- Tamási L, Bohács A, Tamási V, Stenczer B, Prohászka Z, Rigó J Jr., et al. Increased circulating heat shock protein 70 levels in pregnant asthmatics. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15 : 295-300.
- Geisler JP, Manahan KJ, Geisler HE, Tammela JE, Rose SL, Hiatt AK, et al. Heat shock protein 27 in the placentas of women with and without severe preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004; 31 : 12-4.
- Padmini E, Geetha B. Placental heat shock protein 70 overexpression confers resistance against oxidative stress in preeclampsia. *Turk J Med Sci* 2008; 38 : 27-34.
- Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, et al. Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract* 2010; 206 : 651-6.

22. Padmini E, Uthra V, Lavanya S. Effect of HSP70 and 90 in modulation of JNK, ERK expression in preeclamptic placental endothelial cell. *Cell Biochem Biophys* 2012; 64 : 187-95.
23. Divers MJ, Bulmer JN, Miller D, Lilford RJ. Placental heat shock proteins: No immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40 : 236-43.
24. Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Härtig W. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7 : 180-5.
25. Wataba K, Saito T, Takeuchi M, Nakayama M, Suehara N, Kudo R. Changed expression of heat shock proteins in various pathological findings in placentas with intrauterine fetal growth restriction. *Med Electron Microsc* 2004; 37 : 170-6.
26. Raynes DA, Guerriero V. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem* 1998; 273 : 32883-8.
27. Sedlackova L, Spacek M, Holler E, Imryskova Z, Hromadnikova I. Heat-shock protein expression in leukemia. *Tumour Biol* 2011; 32 : 33-44.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25 : 402-8.
29. Zheng YW, Chan KC, Sun H, Jiang P, Su X, Chen EZ, *et al*. Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model. *Clin Chem* 2012; 58 : 549-58.
30. Padmini E, Lavanya S. Over expression of HSP70 and HSF1 in endothelial cells during preeclamptic placental stress. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011; 51 : 47-52.

Reprint requests: Dr Hromadnikova Ilona, Department of Molecular Biology & Cell Pathology,
The Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic
e-mail: ilona.hromadnikova@lf3.cuni.cz