

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Autofererát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Karolína Adamcová

VLIV KOUŘENÍ MATKY NA HOMEOSTÁZU FETOPLACENTÁRNÍ JEDNOTKY

The effect of maternal smoking on the homeostasis of the fetoplacental unit

Praha, 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF UK a VFN v Praze

Školitel: prof. MUDr. Antonín Pařízek, CSc.

Konzultant: As. MUDr. Michaela Dušková, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1 ÚVOD	6
2 HYPOTÉZA A CÍLE PROJEKTU	8
2.1 Hypotéza	8
2.2 Cíle projektu	8
3 METODY	9
3.1 1. část studie	9
3.1.1 Charakteristika souboru	9
3.1.2 Stanovení vzorků	10
3.1.3 Statistické zpracování dat	11
3.2 2. část studie	11
3.2.1 Charakteristika souboru	11
3.2.2 Stanovení vzorků	12
3.2.3 Statistické zpracování dat	12
4 VÝSLEDKY	13
4.1 1. část studie	13
4.2 2. část studie	15
5 DISKUZE	20
6 ZÁVĚR	22
7 SHRNUÍ ZÁVĚRŮ	23
8 ZDROJE	24
9 Seznam publikací	26
9.1 Publikace, které jsou podkladem disertace s impact faktorem	26
9.2 Publikace, které jsou podkladem disertace bez impact faktoru	26
9.3 Publikace bez vztahu k tématu disertace s impact faktorem	26
9.4 Publikace bez vztahu k tématu disertace bez impact faktoru	27

ABSTRAKT

Kouření ženy v těhotenství představuje závažné zdravotní riziko pro matku a zejména pro její dítě. Kouření cigaret vyvolává u žen komplexní změny steroidogeneze v průběhu celého života. Ke sledování vlivu kouření na fetoplacentární jednotku se zaměřením na steroidní hormony bylo nutné nejprve zmapovat změny vybraných steroidů kolem porodu.

První část práce je zaměřená na sledování vybraných steroidních hormonů v peripartálním období (37. týden těhotenství, I. doba porodní u matek a smíšená pupečnicková krev jejich novorozenců) a hledání vztahů k věku matky, nárůstu tělesné hmotnosti během těhotenství, typu porodu a pohlaví plodu.

Zajímavé bylo porovnání steroidů ve vztahu k typu porodu: vaginální porod versus plánovaný císařský řez. U žen nekuřáček, které čekaly hoča a rodily spontánně byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny 17-OH-pregnenolonu, progesteronu, kortizolu, kortikosteronu a signifikantně nižší hladiny estradiolu oproti nekuřáčkám, které čekaly hoča a rodily plánovaným císařským řezem. V mateřské krvi ve 37. týdnu těhotenství byly podle pohlaví plodu zjištěny rozdíly mezi steroidy, což se neprokázalo u novorozenců. Věk matky, nárůst tělesné hmotnosti a porodní hmotnost novorozence neměly vztah k žádnému ze sledovaných steroidů. Byla vytvořena referenční rozmezí pro sledované steroidy měřené LC-MS/MS.

Ve druhé části práce jsme sledovali změny tvorby steroidních hormonů u těhotných kuřáček. Tato část byla zaměřena na změny steroidogeneze v krvi matek ve 37. týdnu těhotenství a ve smíšené pupečnickové krvi jejich novorozenců.

Ve skupině žen, které čekaly hoča, byly u kuřáček ve 37. týdnu těhotenství proti nekuřáčkám vyšší sérové hladiny kortizonu, DHEA, 7 α -OH-DHEA, 17-OH-pregnenolonu, testosteronu a androstendionu. Ve skupině žen, které čekaly děvče, byly u kuřáček ve 37. týdnu těhotenství nižší sérové hladiny 7 β -OH-DHEA a vyšší hladiny androstendionu. U novorozených hochů byly zjištěny u potomků kuřáček vyšší hladiny testosteronu. U novorozených děvčat byly u kuřáček nižší hladiny 7 α -OH-DHEA. Kouření v těhotenství vyvolává změny v tvorbě steroidů, jak u těhotných žen, tak u jejich potomků.

Výsledky prezentované v této práci mohou přispět k lepšímu pochopení fyziologických změn steroidních hormonů v peripartálním období a k ozřejnění důsledků kouření v těhotenství na možné patofyziologické změny v celkovém nastavení steroidní osy.

ABSTRACT

Maternal smoking causes serious health danger for a mother but especially for a baby. Cigarette smoking produces complex steroidogenesis changes during the whole life of a woman. To study the influence of smoking on fetoplacental unit focusing on steroid hormones it was important first to concentrate on changes of the chosen steroids around the delivery.

The first part of the thesis is dedicated to observe some chosen steroid hormones in peripartal period (37th week of the pregnancy, first stage of labor of mothers and mixed umbilical blood of their neonates) and to look for relations to the age of mother, the increase of the weight during the pregnancy, the type of the delivery and the sex of the baby.

It was interesting to compare steroids in the relation to the type of the delivery: vaginal delivery versus planned caesarean section. Non-smoking women who delivered a boy spontaneously had significantly higher level of 17-OH-pregnenolone, progesterone, cortisol, corticosterone and significantly lower level of estradiol in comparison with non-smoking women who delivered a boy by a planned Caesarean section. In the maternal blood in the 37th week of the pregnancy there were found differences between steroids in accordance to the sex of the fetus but they were not found in the neonates' case. The age of mother, the increase of the human weight and the birth weight of the neonate didn't have any relation to any of the observed steroids. There were created reference ranges for observed steroids measured by LC-MS/MS.

In the second part my thesis was monitoring changes of the creation of steroid hormones of smoking mothers. This part was focused on changes of steroidogenesis in blood of mothers in the 37th week of their pregnancy and in mixed umbilical blood of their neonates.

In the group of women who were expecting a boy there were smoking women in the 37th week who had higher serum levels of cortisone, DHEA, 7 α -OH-DHEA, 17-OH-pregnenolone, testosterone and androstenedione in comparison with non-smoking women. In the group of women who were expecting a girl there were smoking women in the 37th week who had lower serum levels of 7 β -OH-DHEA and higher levels of androstenedione. There were detected higher levels of testosterone at the boys of smoking mothers. But at the girls of smoking mothers there were detected lower levels of 7 α -OH-DHEA. Smoking during pregnancy causes changes in the creation of steroids not only in the case of pregnant women but also in the case of their children.

The results shown in this thesis can help to understand better physiological changes of steroid hormones in peripartal period and to clarify impacts of smoking in pregnancy on possible pathophysiological changes in overall setting of steroid axis.

1 ÚVOD

Cigaretový kouř, obsahující tisíce škodlivých látek, představuje nejrozšířenější reprodukční škodlivinu současnosti. Kouření během těhotenství postihuje zdraví matky i organismus vyvíjejícího se dítěte. Počet žen kouřících v těhotenství představuje závažný faktor pro riziko rozvoje zdravotních komplikací v celospolečenském rozměru. Spolu s výzkumem obecných důsledků kouření na člověka se mnohé studie soustředí nejen na specifický negativní vliv kouření na reprodukční schopnosti žen i mužů, ale i na vliv na prenatální a postnatální vývoj dítěte.

Hormonální interakce mezi plodem, placentou a matkou jsou nezbytné pro vznik a vývoj těhotenství, vývoj plodu, i adekvátní nástup porodu. Záhy poté, co žena otěhotní, plod, placenta a matka zahájí a udržují komunikaci prostřednictvím komplexního systému působků. V endokrinním prostředí těhotné dominují placentární hormony, jejichž hlavní funkcí je modifikovat fyziologii těhotné tak, aby zahrnovala nároky na výživu rostoucího plodu. Fetální homeostázu v těhotenství reguluje především placenta. Nicméně fetální neuroendokrinní systém se musí stát funkčně kompetentním, aby byl novorozenec schopný extrauterinního života nezávisle na placentě (Strauss a Berbieri, 2004).

V průběhu těhotenství dochází k tvorbě velkého množství pohlavních steroidů, estrogenů a progesteronu. Pro syntézu steroidů je nezbytná konstantní interakce mezi plodem, placentou a matkou. Placenta samotná není, na rozdíl od dospělých nadledvin, varlat a vaječnicků, schopna produkovat steroidní hormony *de novo* a je tak závislá na přísunu prekurzorů z fetálního nebo mateřského kompartmentu. Tento jedinečný a závislý vztah mezi plodem, placentou a matkou je základem pojmu fetoplacentární jednotky (Diczfalusy et al., 1965, Strauss a Berbieri, 2004).

Fetoplacentární endokrinní systém se vyvíjí a funguje nezávisle na matce. Většinu mateřských hormonů je zabráněno vstupovat do fetálního kompartmentu. Naopak plod a placenta produkují a vylučují řadu steroidů a peptidů do mateřské cirkulace (Morel et al., 2016).

Tvorba a účinky steroidních hormonů v těhotenství mají svá specifika. Jejich syntéza a metabolismus jsou výsledkem komplexních metabolických cest zahrnujících děje v plodu, placentě a u matky. Některé základní enzymy steroidogeneze chybí u plodu (např. 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza, 5-ene – 4-ene isomeráza, aromatáza) nebo v placentě (např. C17-C20 desmoláza). V plodu je velmi aktivní konverze acetátu na cholesterol, dále přeměna pregnenu na androsteny a 16-hydroxylace dehydroepiandrosteron (DHEA), která je nezbytná pro tvorbu estriolu (E3). Všechny tyto transformace chybí v placentě, která dokáže metabolizovat cholesterol na C21-steroidy, konvertovat 5-ene na 4-ene steroidy a má velkou kapacitu pro aromatizaci C19 prekurzorů. Takto dohromady dokáže plod a placenta vytvořit všechny potřebné steroidní hormony (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Tvorba některých steroidních hormonů v průběhu těhotenství významně roste. Kromě změn steroidů daných průběhem těhotenství, jsou zvažovány různé faktory, které ovlivňují jejich hladiny (věk, kouření, těhotenské komplikace, podávání glukokortikoidů atd.), což je pak zmiňováno ve vztahu k rozvoji celé řady onemocnění u dětí nejen intrauterinně, ale i v jejich pozdějším životě (Kuijper et al., 2015).

Kouření má zásadní vliv na endokrinní systém. Ovlivňuje hypofyzární, tyreoidální, adrenální, testikulární i ovariální funkce, kalciový metabolismus a působení inzulínu (Stárka et al., 2005). Kouření vede ke změnám hladin endogenních steroidních hormonů. Zvyšuje hladiny kortizolu v plazmě, kdy jeho hladina je přímo úměrná počtu vykouřených cigaret během dne (Kirschbaum et al., 1992). Ve studiích jsou popisovány vyšší hladiny 17-hydroxyprogesteronu, androstendionu, DHEA a jeho sulfátu dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEAS) u kuřáků. Zvýšená sekrece těchto adrenálních steroidů může být způsobena blokem 21- nebo 11 β -hydroxylázy (Baron et al., 1995; Hautanen et al., 1993; Salvini et al., 1992).

Mnoho studií se zabývá vlivem kouření na ženský reprodukční systém, včetně vlivu na hladiny ženských pohlavních hormonů. Kouření žen může způsobit změny v menstruačním cyklu, poruchy fertility, patologie těhotenství, včetně ohrožení zdraví plodu, a může vést i k dřívější menopauze. U kuřáček je popisována vyšší hladina testosteronu v průběhu celého života (Manjer et al., 2005; Sowers et al., 2001; Friedman et al., 1987), a jeho hladina stoupá s počtem vykouřených cigaret za den (Manjer et al., 2005). U kouřících žen dochází také ke snížení biologické dostupnosti estrogenů (Michnovicz et al., 1986).

Ve své práci se věnuji vlivu kouření na fetoplacentární jednotku se zaměřením na steroidní hormony. Jedním z cílů mé práce bylo zmapovat metabolismus steroidů kolem porodu, aby bylo následně možné vyhodnotit změny vyvolané kouřením. Proto se v první části úvodu věnuji této problematice obecně a druhá část je zaměřená na změny vyvolané kouřením.

2 HYPOTÉZA A CÍLE PROJEKTU

2.1 Hypotéza

Kouření vyvolává u žen komplexní změny steroidogeneze v průběhu celého života, a to i po přerušení kouření. Kouření žen během těhotenství dokáže vyvolat změny steroidogeneze v celém komplexu fetoplacentární jednotky a tyto změny jsou prokazatelné i u jejich potomků.

2.2 Cíle projektu

1. zmapovat steroidogenezi hlavních a méně běžných steroidů v peripartálním období a věnovat se změnám souvisejícím s věkem matky, nárůstem tělesné hmotnosti v těhotenství, typem porodu, pohlavím plodu.

2. vyhodnotit vliv kouření matky na změny steroidogeneze hlavních a méně běžných steroidů v peripartálním období včetně změn u novorozenců s respektem ke změnám v rámci fyziologie.

3 METODY

3.1 1. část studie

3.1.1 Charakteristika souboru

Ve studii bylo vyšetřeno celkem 142 zdravých těhotných žen s nízkorizikovým těhotenstvím. Všechny ženy byly české národnosti. Vylučujícími kritérii byla závislost v anamnéze (včetně kouření), užívání léků ovlivňujících steroidogenezi, diabetes mellitus, hypertenze, thyreopatie, těhotenské komplikace (hyperemesis, krvácení, kontrakce dělohy), intrauterinní růstová restrikce plodu, vícečetné těhotenství. Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (číslo protokolu: 114/15) a byla provedena v souladu se zásadami Helsinské deklarace Světové lékařské asociace revidované v roce 2008. Po prostudování informací pro pacientky podepsala každá ze zúčastněných žen písemný informovaný souhlas se studií.

Ženy byly vyšetřeny ve 37. týdnu těhotenství, kdy vyplnily anonymně standardizovaný dotazník (viz příloha), který sledoval věk, výšku, váhu, paritu, těhotenské komplikace, socioekonomický status. Při porodu bylo zaznamenáno pohlaví dítěte a typ porodu. Porody jsme rozdělili na spontánní a porody císařským řezem

Ve 37. týdnu těhotenství byl proveden odběr venózní krve matky z kubitální žíly v dopoledních hodinách mezi 8-10 hodinou. Při porodu byla odebrána krev matky v I. době porodní a smíšená pupečnicková krev dítěte. Vzhledem k jedné technické náročnosti separovaných odběrů pupečnickové arterie a vény, dále k výsledkům porovnání separovaných odběrů, které publikovala naše pracovní skupina (Pašková et al., 2014), jsme zvolili odběr smíšené pupečnickové krve. Krev byla odebírána do dvou zkumavek Vacuette 4 ml (typ: plastová zkumavka pro odběr srážlivé žilní krve s aktivátorem srážení a separačním gelem). Sérum bylo získáno centrifugací po dobu 5 minut při 2000 g v 4 °C a bylo uchováno při -20 °C.

Pro výpočet referenčního rozmezí byly využity všechny vzorky ze 37. týdne těhotenství, to znamená od 81 žen, které čekaly děvče, a od 61 žen, které čekaly hochy. Vzorky z I. doby porodní byly pouze u žen, které rodily spontánně, stejně jako vzorky od novorozenců, kteří se narodili spontánně (59 dívek/45 hochů). Vzorků z plánovaných a akutních císařských řezů bylo málo, proto z nich referenční rozmezí nemohla být vytvořena. Tyto vzorky byly použity pouze pro porovnání steroidů mezi spontánními porody (45 vzorků) a plánovanými císařským řezem (12 vzorků), pro tuto analýzu byly počty dostatečné ve skupině žen, které čekaly hochy. Odběrů z akutních císařských řezů bylo ve studii málo, proto pro analýzu nebyly využity vůbec. Stejně jako vzorků z porodů císařským řezem (plánovaným i akutním) ve skupině žen, které čekaly děvče. Při porodu se nepovedlo z technických důvodů, nikoli pro

zdravotní komplikace, odebrat venózní krev u osmi žen, které čekaly děvče, a u jedné ženy, která čekala hochu. Odběry u těchto porodů neproběhly ani u novorozenců.

Charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1 a tabulce 2.

	Věk matky (průměr ± SD) (roky)	n	Hmotnost před těhotenstvím (průměr ± SD) (kg)	BMI před těhotenstvím (průměr ± SD)	Hmotnost ve 37. týdnu těhotenství (průměr ± SD) (kg)	BMI ve 37. týdnu těhotenství (průměr ± SD)	Váhový přírůstek v těhotenství (průměr ± SD) (kg)	Týden porodu (průměr ± SD)
Ženy, které čekaly děvče	31,82 ± 3,69	81	63,26 ± 9,45	23,15 ± 3,32	78,24 ± 11,55	27,88 ± 3,92	15,25 ± 4,84	39,55 ± 1
Ženy, které čekaly hochu	32,27 ± 4,75	61	64,48 ± 11,92	21,66 ± 2,38	77,37 ± 8	27,05 ± 2,78	15,59 ± 5,12	39,57 ± 0,96

Tabulka 1. Charakteristika souboru: matky

	Porodní hmotnost (průměr ± SD) (g)	n	Apgar 1 min.	Apgar 5 min.	Apgar 10 min.
Novorozenec - děvče	3462,41 ± 449,65	59	9,48 ± 1,04	9,93 ± 0,25	10 ± 0
Novorozenec - hoch	3529,7 ± 480,4	45	8,97 ± 1,55	9,88 ± 0,33	10 ± 0

Tabulka 2. Charakteristika souboru: novorozenci

3.1.2 Stanovení vzorků

Estron (E1), estradiol (E2) a estriol (E3) byly kvantifikovány pomocí již dříve publikované metody LC-MS/MS (Vítků et al., 2015). Všechny ostatní steroidy (kortizol, kortizon, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron (7 α -OH-DHEA), 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosteron (7 β -OH-DHEA), 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA), pregnenolon, 17 α -hydroxy-pregnenolon (17-OH-pregnenolon), testosteron, androstendion, progesteron, 17-hydroxy-progesteron (17-OH-progesteron), kortikosteron) byly stanoveny pomocí jiné validované metody LC-MS/MS (Sosvorová et al., 2015a; Sosvorová et al., 2015b; Vítků et al., 2016). Vzhledem k odběru dvou vzorků od každé pacientky byla provedena opakovaná analýza, aby bylo možné provést korelaci přesnosti stanovení.

3.1.3 *Statistické zpracování dat*

K porovnání průměrných hodnot sérových steroidů žen očekávajících mužský a ženský plod ve 37. týdnu těhotenství a během I. doby porodní byl za předpokladu šikmosti a špičatosti dat v očekávaném rozmezí (± 2) použit t-test. Stejně tomu bylo také v případě porovnání hladin sérových steroidů při vaginálním porodu a císařském řezu u žen s mužským plodem během I. doby porodní a z pupečnickové krve. V případě, že šikmost a špičatost dat nebyly v očekávaném rozmezí (± 2), byl ke zjištění výše zmíněných porovnání použit neparametrický analog t-testu - Kolmogorovův-Smirnovův test. Pro otestování správnosti opakovaného měření byla použita lineární regrese. Referenční meze byly kalkulovány jako 2,5 – 97,5 percentil naměřených dat. Pro výše zmíněné zpracování dat byl použit statistický software Statgraphics Centurion XVI od firmy Statpoint Inc. (Warrenton, VA, USA). Parciální korelace mezi věkem matky, přírůstkem tělesné hmotnosti během těhotenství, porodní váhou dítěte a hladinami steroidů byly zpracovány v programu NCCS 2007 (Kaysville, UT, USA).

3.2 2. část studie

3.2.1 *Charakteristika souboru*

Do studie bylo zařazeno celkem 88 zdravých těhotných žen s nízkorizikovým těhotenstvím, z toho bylo 17 aktivních kuřaček a 71 nekuřaček. Všechny ženy byly české národnosti a porodily spontánně. Do studie nebyly zařazeny exkuřačky ani pasivní kuřačky. Vylučujícími kritérii byla jiná závislost v anamnéze, užívání léků ovlivňujících steroidogenezi, gestační diabetes, hypertenze, thyreopatie, těhotenské komplikace (hyperemesis, krvácení, dráždivá děloha, hrozící předčasný porod), intrauterinní růstová restrikce plodu, císařský řez. Do studie byla zařazena pouze jednočetná těhotenství. Všechny účastnice podepsaly informovaný souhlas o tom, že byly poučeny o studii. Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (číslo protokolu: 114/15).

Ženy byly vyšetřeny ve 37. týdnu těhotenství, kdy vyplnily anonymně standardizovaný dotazník (viz příloha), který sledoval věk, výšku, váhu, graviditu/paritu, těhotenské komplikace, socioekonomický status, kuřáckou anamnézu, informovanost o škodlivosti kouření v těhotenství a míru nikotinové závislosti. Při porodu bylo zaznamenáno pohlaví dítěte.

Odběr venózní krve matky z kubitální žíly byl proveden v dopoledních hodinách mezi 8-10 hodinou ve 37. týdnu těhotenství. Při porodu byla odebrána smíšená pupečnicková krev. Krev byla odebírána do zkumavek Vacuette (typ: plastová zkumavka pro odběr srážlivé žilní krve s aktivátorem srážení a separačním gelem). Sérum bylo získáno centrifugací po dobu 5 minut při 2000 g v 4 °C a bylo uchováno při –20 °C. Pro tuto část studie byly zvoleny pouze odběry ve 37. týdnu těhotenství u matek,

aby bylo možné lépe diferencovat změny vyvolané kouřením. V době porodu mohou být změny vyvolané kouřením již překryty velkými změnami v souvislosti s porodem.

Charakteristika souboru je uvedena v tabulce 3.

	Počet žen	Věk matek (průměr ± SD) (roky)	Nárůst hmotnosti matek (průměr ± SD) (kg)	Porodní hmotnost plodu (průměr ± SD) (g)	Počet cigaret za den před těhotenstvím (průměr ± SD)	Počet cigaret za den v těhotenství (průměr ± SD)	Doba kouření (průměr ± SD) (roky)
Nekuřačky: narozený hoch	34	32,25 ± 4,95	14,71 ± 4,90	3587,5 ± 465,70	0	0	0
Nekuřačky: narozené děvče	37	31,22 ± 3,16	14 ± 3,71	3348,33 ± 322,04	0	0	0
Kuřačky: narozený hoch	8	29,25 ± 3,70	18,88 ± 4,59	3286,25 ± 433,60	17,14 ± 7,95	6,14 ± 2,53	10 ± 2,88
Kuřačky: narozené děvče	9	31,55 ± 4,14	18,11 ± 5,80	3104,44 ± 396,71	25,88 ± 16,67	6,11 ± 5,42	14,25 ± 5,61

Tabulka 3. Charakteristika souboru

3.2.2 Stanovení vzorků

Steroidní hormony (kortizol, kortizon, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron (7 α -OH-DHEA), 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosteron (7 β -OH-DHEA), 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA), pregnenolon, 17 α -hydroxy-pregnenolon (17-OH-pregnenolon), testosteron, androstendion, progesteron, 17-hydroxy-progesteron (17-OH-progesteron), kortikosteron, estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3)) byly stanoveny LC-MS/MS postupem popsáním detailně jinde (Sosvorová et al., 2015a; Sosvorová et al., 2015b; Vítku et al., 2015; Vítků et al., 2016).

3.2.3 Statistické zpracování dat

Vzhledem k nenormálnímu rozdělení a heteroscedasticitě u všech proměnných, byla data transformována Box-Coxovou transformací. K porovnání hladin sérových steroidů u kuřaček a nekuřaček byla použita ANOVA s opakováním. Ke zpracování dat byl použit statistický software Statgraphics Centurion, version XVI od firmy Statpoint Inc. (Warrenton, VA, USA).

4 VÝSLEDKY

4.1 1. část studie

Ve studii jsme se zaměřili na 16 steroidů, které jsme sledovali u matek ve 37. týdnu těhotenství, v I. době porodní a u novorozenců v pupečnickové krvi. Z naměřených hodnot jsme sestavili referenční rozmezí pro jednotlivé steroidy při stanovení pomocí naší nové metodiky na LC-MS/MS (tabulka 4). Analýzy z I. doby porodní a u novorozenců jsou pouze u spontánních porodů, aby byl dostatečný počet pro vytvoření referenčních rozmezí. Bylo provedeno opakované stanovení vzorků, při jejich porovnání bylo dosaženo výborných korelačních koeficientů (mezi 81 % - 99 %), což ukazuje na přesnost metody stanovení pro všechny analyzované steroidy.

Steroid (nmol/l)	Ženy v 37. týdnu těhotenství		Ženy v I. době porodní		Pupečnicková krev	
	Plod - děvče	Plod - hoch	Plod - děvče	Plod - hoch	Plod - děvče	Plod - hoch
17-OH-pregnenolon	0,29 - 5,47	0,59 - 5,68	10,4 - 36,1	2,0 - 38,5	1,8 - 41,7	1,6 - 26,4
17-OH-progesteron	22,9 - 72,6	17,05 - 81,2	9,0 - 65,4	7,5 - 51,8	33,0 - 193,8	35,6 - 198,7
7-oxo-DHEA	0,09 - 0,88	0,03 - 1,30	0,11 - 2,24	0,11 - 3,01	0,07 - 1,69	0,22 - 1,81
7 α -OH-DHEA	0,02 - 1,59	0,01 - 1,21	0,30 - 3,19	0,44 - 2,56	0,81 - 8,82	0,81 - 10,06
7 β -OH-DHEA	0,17 - 0,44	0,13 - 0,56	0,20 - 1,13	0,12 - 1,00	0,25 - 0,97	0,22 - 1,08
Androstendion	1,58 - 6,04	1,16 - 6,42	1,11 - 6,22	0,75 - 7,19	2,06 - 9,07	2,61 - 13,90
DHEA	0,99 - 20,65	1,28 - 14,0	2,4 - 49,3	2,7 - 58,6	1,8 - 31,9	1,1 - 17,0
Estradiol	49,7 - 129,9	42,8 - 120,8	3,6 - 105,4	7,2 - 92,2	7,9 - 56,2	6,4 - 70,1
Estriol	24,8 - 76,6	25,9 - 69,0	2,7 - 48,2	0,6 - 63,8	140,1 - 394,4	149,1 - 438,9
Estron	13,4 - 193,7	15,8 - 208,7	18,9 - 119,8	25,1 - 119,5	38,8 - 418,7	42,1 - 239,0
Kortikosteron	20,4 - 60,7	14,7 - 87,5	10,2 - 248,1	19,9 - 216,6	17,4 - 70,2	9,8 - 91,0
Kortizol	497,8 - 1361,1	534,6 - 1214,0	911,1 - 2731,5	698,5 - 2396,5	15,8 - 509,2	40,3 - 450,0
Kortizon	173,9 - 347,8	184,1 - 394,2	89,7 - 319,3	46,9 - 422,0	185,2 - 982,8	187,9 - 896,7
Pregnenolon	57,6 - 170,2	47,4 - 178,7	52,8 - 254,6	32,3 - 292,2	58,2 - 332,1	59,5 - 297,1
Progesteron	172,5 - 502,9	138,5 - 531,5	26,0 - 436,0	18,1 - 269,3	282,6 - 1372,5	316,4 - 1541,0
Testosteron	0,85 - 5,07	0,76 - 5,81	0,14 - 6,87	0,76 - 7,08	0,04 - 0,69	0,09 - 1,71

Tabulka 4. Referenční rozmezí pro jednotlivé steroidy při stanovení pomocí naší nové metodiky na LC-MS/MS.

Dále jsme analyzovali vztahy sledovaných steroidů k vybraným parametrům, které jsou v následujícím textu podrobně vypsány včetně signifikancí, ale nejsou prezentovány v tabulce. Neprokázali jsme, že by věk matky měl vztah k některému ze sledovaných steroidů. Nárůst tělesné hmotnosti, jak do 37. týdne těhotenství, tak za celé těhotenství, nekoreloval s žádným ze sledovaných steroidů. Stejně tak porodní hmotnost novorozence neměla vztah k hladinám steroidů u nízkorizikových porodů.

Ve 37. týdnu těhotenství jsme v mateřské krvi našli signifikantní rozdíly mezi steroidy ve vztahu k pohlaví plodu. Kortizol, byl vyšší u matek, které čekaly hochu ($p=0.03$), dále 17-OH-pregnenolon byl vyšší u matek, které čekaly děvče ($p=0.0038$). Progesteron byl nesignifikantně vyšší u žen, které čekaly děvče ($p=0.082$). U novorozenců jsme nenalezli signifikantní rozdíly mezi sledovanými steroidy a pohlavím. Analyzovali jsme výsledky pouze u spontánních porodů, aby byl dostatečný počet probandů pro porovnání.

Provedli jsme porovnání steroidů ve vztahu k typu porodu: spontánní porod versus plánovaný císařský řez. Bohužel z akutních císařských řezů nebylo dost odběrů. Tato analýza byla provedena pouze ve skupině žen, které čekaly hochu. Ve skupině žen, které čekaly děvče, nebyl dostatečný počet odběrů u císařských řezů. V analyzované skupině žen, které čekaly hochu, jsme našli u spontánních porodů oproti plánovaným císařským řezům signifikantně vyšší hladiny 17-OH-pregnenolonu ($p=0.012$), progesteronu ($p=0.022$), kortizolu ($p=0.0022$), kortikosteronu ($p=0.0078$), nesignifikantně vyšší 17-OH-progesteron ($p=0.068$) a signifikantně nižší hladiny estradiolu ($p=0.0017$). U novorozenech hochů jsme v pupečnickové krvi nenalezli signifikantní rozdíly mezi dětmi narozenými spontánně nebo císařským řezem, byly pouze hraniční rozdíly u progesteronu ($p=0.057$) a androstendionu ($p=0.065$).

4.2 2. část studie

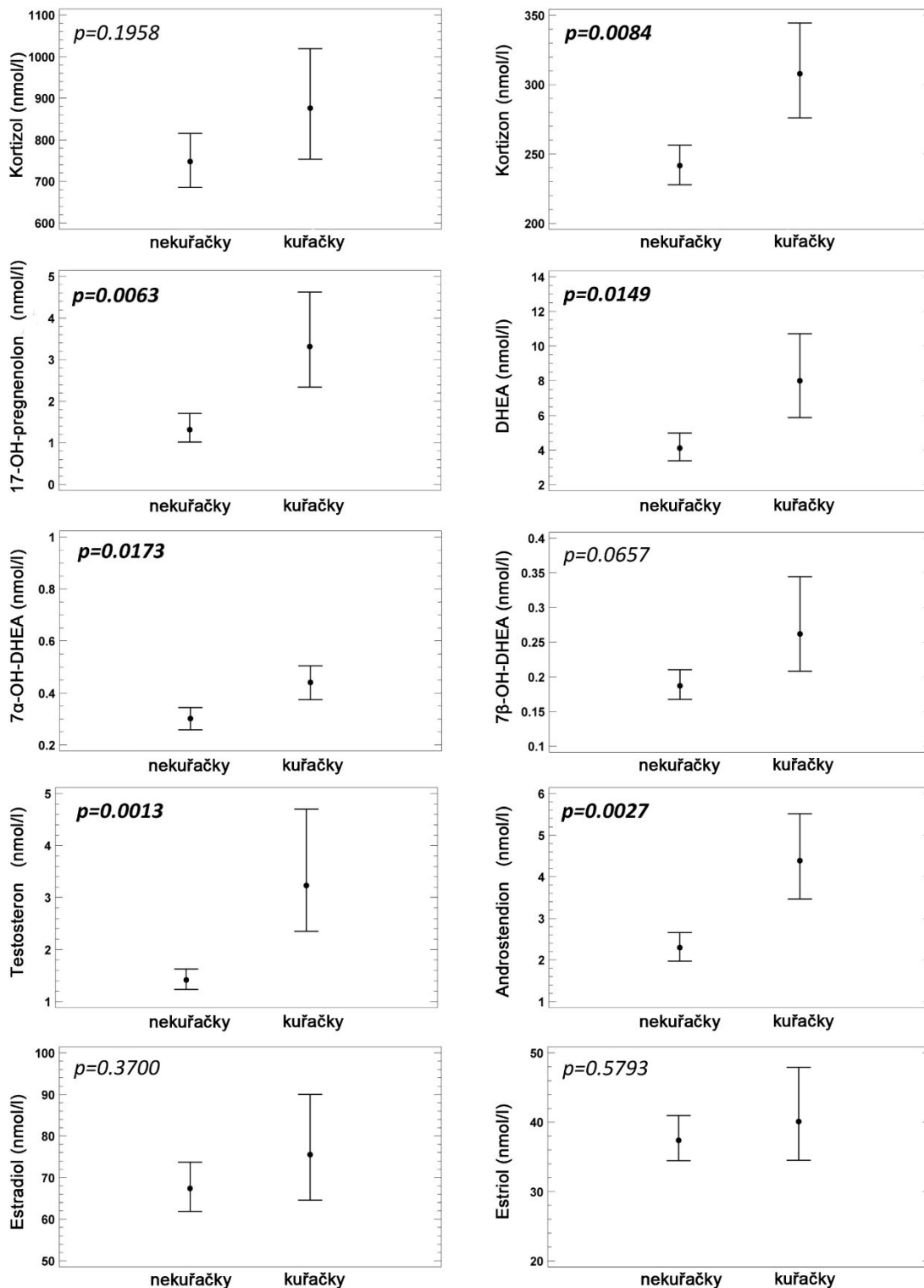
Jak uvádí tabulka 3, kuřačky a nekuřačky se nelišily ve věku. Kuřačky měly vyšší přírůstek tělesné hmotnosti v těhotenství, a to v průměru o 4 kg. Naopak porodní hmotnost dětí matek kuřaček byla nižší, a to v průměru o 300 g. Sledovaný soubor žen jsme rozdělili podle pohlaví novorozence a hormonální změny ve vztahu ke kouření jsme analyzovali odděleně.

Ve skupině žen, které čekaly hochy, jsme našli u kuřaček ve 37. týdnu oproti nekuřačkám signifikantně vyšší hladiny kortizonu, DHEA, 7 α -OH-DHEA, 17-OH-pregnenolonu, testosteronu a androstendionu. Ostatní sledované steroidy (kortizol, 7 β -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, pregnenolon, progesteron, 17-OH-progesteron, kortikosteron, estron, estradiol a estriol) se u kuřaček a nekuřaček nelišily (obrázek 2).

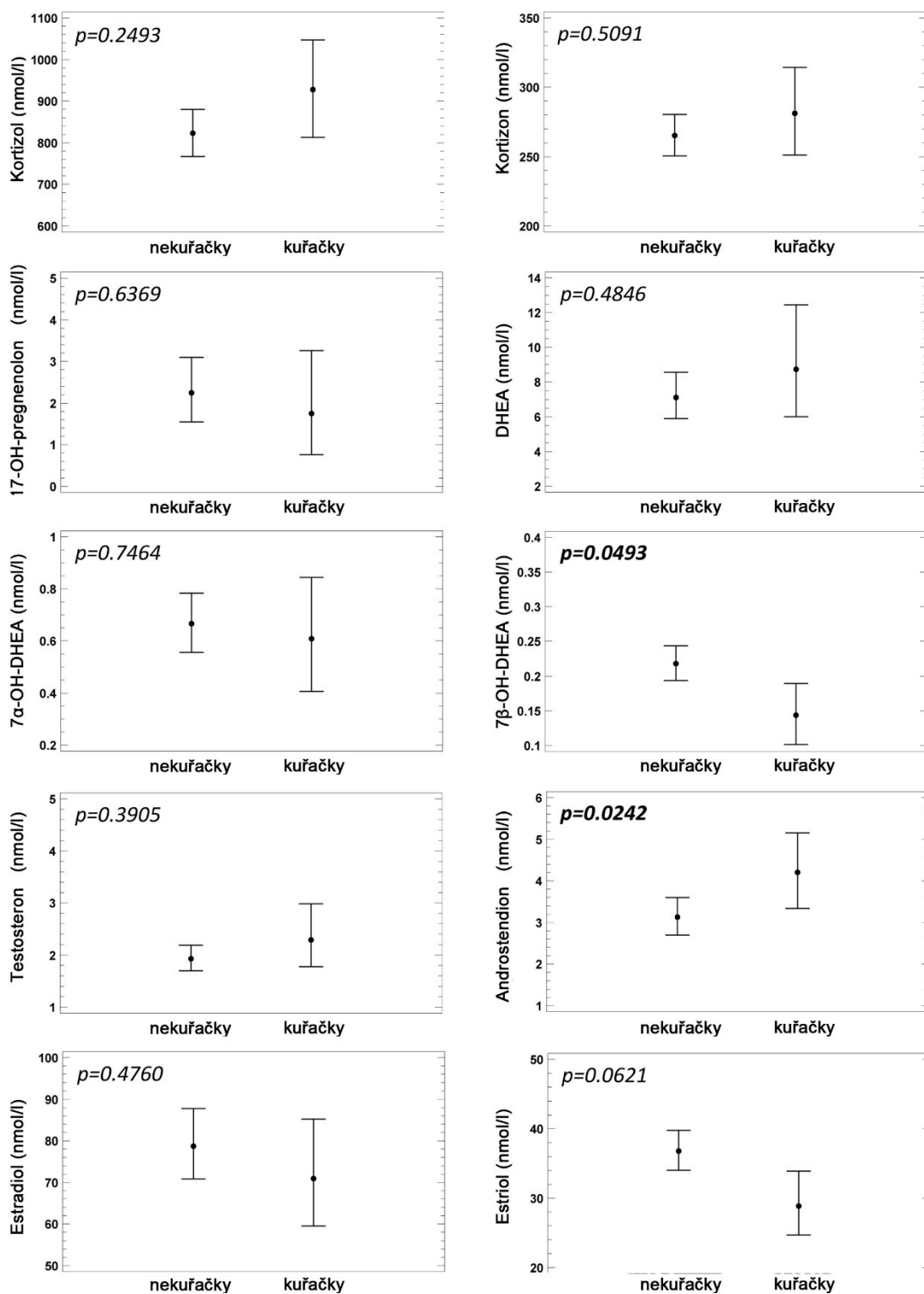
Ve skupině žen, které čekaly děvče, jsme našli u kuřaček ve 37. týdnu těhotenství signifikantně nižší hladiny 7 β -OH-DHEA a vyšší hladiny androstendionu. Dále kuřačky měly hraničně nižší E3, výsledek však nebyl statisticky signifikantní. Ostatní sledované steroidy (kortizol, kortizon, DHEA, 7 β -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, testosteron, progesteron, 17-OH-progesteron, kortikosteron, E1, E2) se u kuřaček nelišily, ale měly mnohem větší rozptyl hodnot, než měly nekuřačky (obrázek 3).

U novorozenech hochů jsme u potomků kuřaček našli signifikantně vyšší hladiny testosteronu oproti hochům nekuřaček. Ostatní sledované steroidy měly u potomků kuřaček velký rozptyl, ale signifikantní změny jsme neprokázali (obrázek 4).

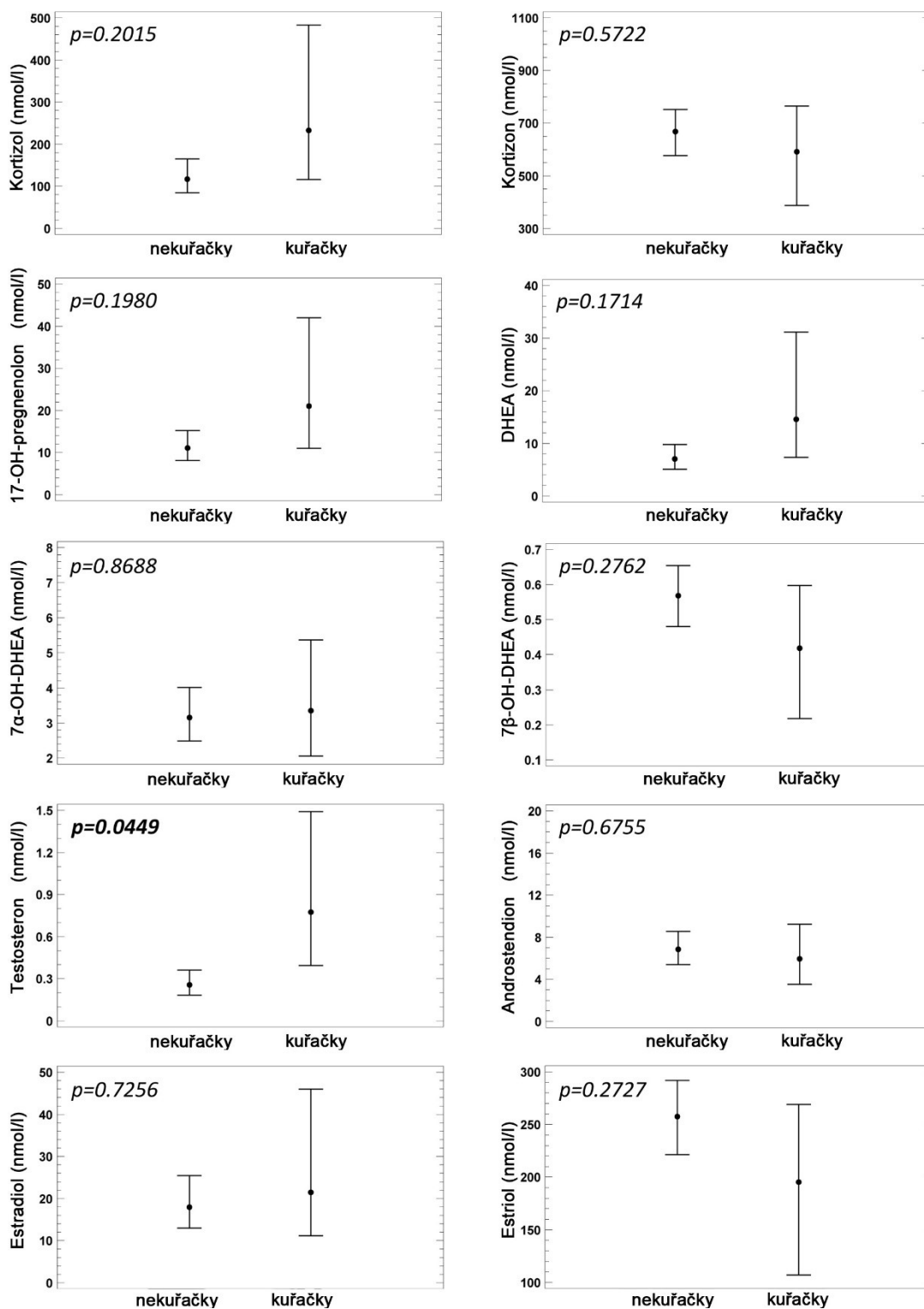
U novorozenech děvčat jsme u potomků kuřaček našli signifikantně nižší 7 α -OH-DHEA. V ostatních sledovaných hormonech jsme signifikantní změny neprokázali, pouze u potomků kuřaček byl velký rozptyl hodnot (obrázek 5).



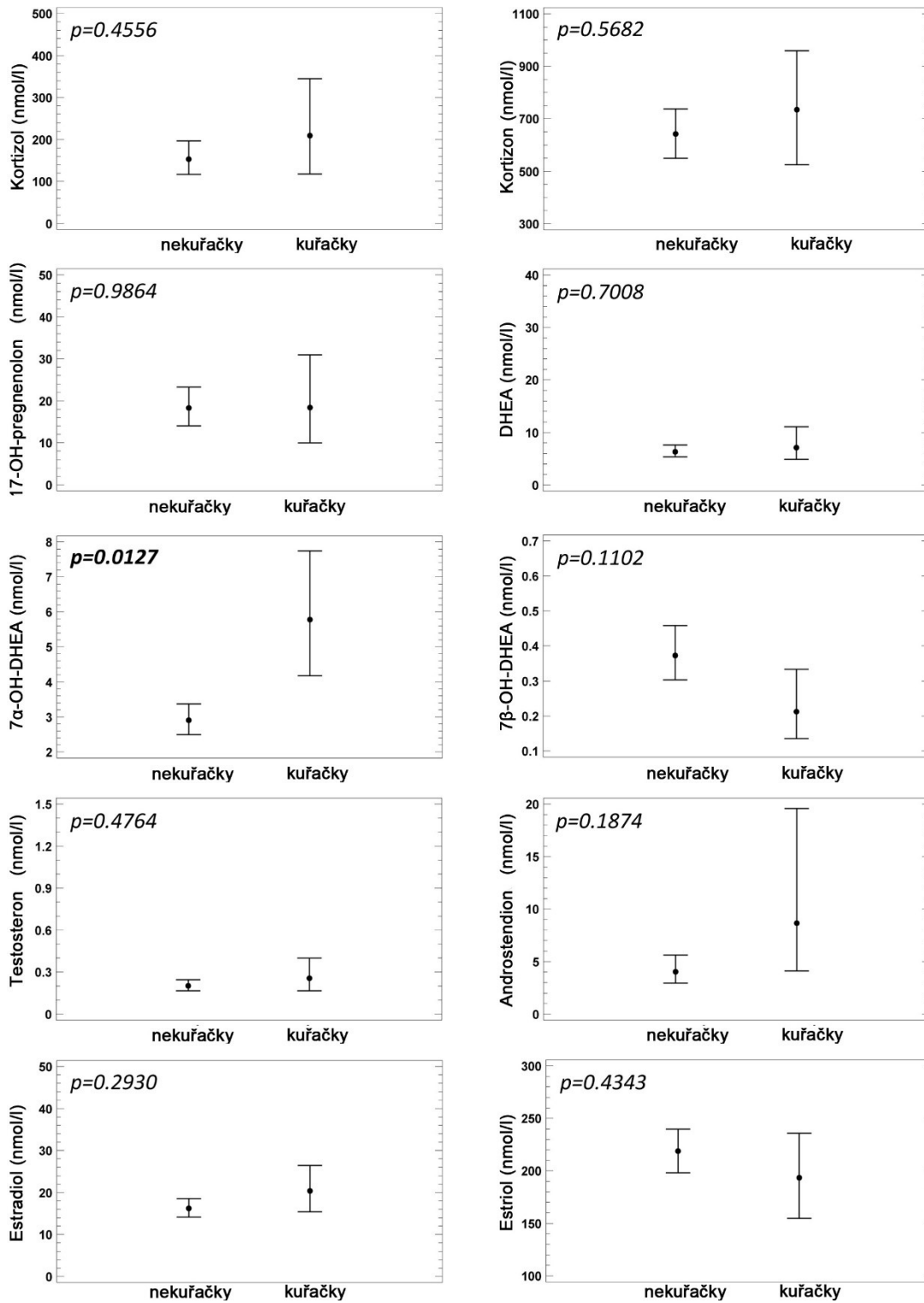
Obrázek 2. Ženy ve 37. týdnu těhotenství, které čekaly hocha. U kuřaček jsme našli signifikantně vyšší hladiny kortizonu, DHEA, 7α-OH-DHEA, 17-OH-pregnenolonu, testosteronu a androstendionu. Ostatní sledované steroidy se nelišily u kuřaček a nekuřaček.



Obrázek 3. Ženy ve 37. týdnu těhotenství, které čekaly děvče. U kuřaček jsme našli signifikantně nižší hladiny 7β-OH-DHEA a vyšší hladiny androstendionu. Dále kuřačky měly hraničně nižší E3, výsledek však nebyl statisticky signifikantní. Ostatní sledované steroidy se u kuřaček nelišily, ale měly mnohem větší rozptyl hodnot, než měly nekuřačky.



Obrázek 4. Novorozenci hoši. U potomků kuřaček jsme našli signifikantně vyšší hladiny testosteronu oproti hochům nekuřaček. Ostatní sledované steroidy měly u potomků kuřaček velký rozptyl, ale signifikantní změny jsme neprokázali.



Obrázek 5. Novorozenci děvčata. U potomků kuřaček jsme našli signifikantně nižší 7α-OH-DHEA. V ostatních sledovaných hormonech jsme signifikantní změny neprokázali, pouze u potomků kuřaček byl velký rozptyl hodnot.

5 DISKUZE

V těhotenství, od implantace do porodu, mají progesteron, estrogeny, androgeny a glukokortikoidy své nezastupitelné role. Základem pro sledování vztahů steroidních hormonů je určení jejich fyziologických hladin. Vzhledem k úskalím při stanovení steroidních hormonů, které vyplývá ze složitosti jejich analytiky (Dušková et al., 2018), je vhodné při zavádění nové metody vždy vytvořit referenční rozmezí pro danou metodu. Z dat nashromážděných ve studii jsme pro tuto metodu vytvořili referenční rozmezí. Výsledky měly výbornou opakovatelnost a jsou v souladu s literárními daty (Adamcová et al., 2018).

Sledování vztahů hladin steroidů přineslo zajímavé výsledky. Věnovali jsme se rozdílům daným pohlavím plodu. Tyto rozdíly jsou v literatuře popisovány odlišně jako žádné, snížení nebo zvýšení (Kuijper et al., 2015). Ve studii jsme našli signifikantní rozdíly pouze u matek ve 37. týdnu těhotenství, a to u kortizolu a 17-OH-pregnenolonu. Velmi zajímavé jsou rozdíly u steroidů mezi typem porodu. Hladiny steroidů u plánovaných císařských řezů de facto tvoří obraz steroidního spektra na konci těhotenství, zatímco spontánní porody ukazují na změny v souvislosti s porodem. Očekávaně u matek při plánovaném císařském řezu byl nižší kortizol (a kortikosteron), což má vztah nejen ke stresové reakci, ale i k mechanismu iniciace porodu. Při spontánním porodu byl nižší estradiol, naopak vyšší progesteron a 17-OH-pregnenolon. Překvapivě u novorozenců signifikantní rozdíly nebyly nalezeny (Adamcová et al., 2018).

Kouření ženy v těhotenství představuje závažné zdravotní riziko jak pro matku, tak pro její dítě, u kterého je zvýšené riziko jak perinatologických komplikací, tak vyšší riziko rozvoje některých onemocnění v pozdějším věku. Z hlediska matek je zajímavá otázka přírůstku tělesné hmotnosti v těhotenství. Naše výsledky jsou v plné shodě se studií Rodeho et al. (2013). Z našich výsledků vyplývá, že kuřačky měly přírůstek tělesné hmotnosti vyšší v průměru o 4 kg oproti nekuřačkám. Kromě obecně známých účinků, jako je nižší porodní hmotnost plodu (Ingvarsson et al., 2007), což jsme potvrdili i v naší studii, má kouření těhotné ženy také vliv na hormonální homeostázu jak matky, tak plodu.

U nízkorizikových těhotných existují rozdílné hladiny steroidních hormonů podle pohlaví plodů, stejně tak jako rozdíly ve steroidech u novorozenců podle pohlaví, i když výsledky jsou v literatuře nejednotné (Kuijper et al., 2013). Zároveň změny tvorby steroidních hormonů vyvolané kouřením jsou odlišné u mužů a u žen (Dušková et al., 2012; Jandíková et al., 2017), což bylo i potvrzeno v experimentálních modelech u prenatální expozice nikotinu (Cross et al., 2017). Toto vytváří nutnost analyzovat změny vyvolané kouřením žen v těhotenství odděleně podle pohlaví jejich dětí.

Změnám estrogenů vlivem kouření v těhotenství se věnuje několik prací. Autoři našli nižší hladiny estradiolu jak u těhotných kuřaček, tak u novorozenců matek kuřaček (Andersen et al. 1984;

Varvarigou et al. 2009). V naší studii jsme našli pouze nesignifikantně nižší hladiny estriolu u kuřaček ve 37. týdnu těhotenství, které čekaly děvče (Adamcová et al., 2017).

Vlivu kouření matek na mužské potomky se věnuje několik studií. Byl zkoumán především vztah k poruše reprodukčních funkcí synů v dospělosti, na které ukazovaly zvířecí modely. To se však u lidí dosud neprokázalo (Ratcliffe et al., 1992). V další studii, která také neprokázala vliv na reprodukční schopnost, byl nalezen vyšší poměr volného testosteronu/volného estradiolu u potomků kuřaček. Tato data by mohla ukazovat na posun v nastavení osy hypotalamus-hypofýza-pohlavní žlázy ve smyslu vyšší androgenicity (Ramlau-Hansen et al., 2008). V souladu s těmito výsledky jsme prokázali vyšší hladiny testosteronu u novorozenech hochů matek kuřaček (Adamcová et al., 2017).

V modelu na zvířeti byla nalezena vyšší hladina volného testosteronu u dospělých samic vystavených účinku nikotinu během intrauterinního života (Smith et al., 2003). Literatura se věnuje i hladinám testosteronu těhotných kuřaček a vztahu ke kouření potomků v dospělosti. Zajímavým nálezem je vztah vyšší hladiny testosteronu u matek kuřaček ke kouření jejich dcer. Vyšší hladina testosteronu u kuřaček v těhotenství korelovala s kuřáctvím dcer. Hladina testosteronu matek kuřaček je zřejmě rizikovým faktorem pro kuřáctví dcer (Kandel et al., 1999). Tyto nálezy však nepotvrdila studie Stroud et al. (2014), která neprokázala asociaci mezi hladinou mateřského testosteronu ve III. trimestru těhotenství a závislostí na tabáku jejich dcer v dospělosti. Naopak prokázala asociaci s hladinou mateřského kortizolu ve III. trimestru těhotenství. V naší studii jsme neprokázali změny testosteronu u těhotných kuřaček, které očekávaly děvče ani u novorozenech děvčat matek kuřaček. Nalezli jsme pouze velký rozptyl hladin testosteronu, u některých žen byla hladina testosteronu opravdu výrazně zvýšená. U žen kuřaček ve 37. týdnu těhotenství, které čekaly děvče, jsme prokázali signifikantně vyšší hladiny jeho prekurzoru androstendionu (Adamcová et al., 2017).

Řada studií zkoumala na zvířecích modelech dlouhodobé následky prenatální expozice nikotinu, ale jen málo z nich zohlednilo rozdílnost následků s přihlédnutím k pohlaví plodu. Ukázalo se, že ačkoli prenatální expozice nikotinu vyvolává řadu změn ve struktuře a funkci mozku dítěte, tak více nežádoucích následků mají potomci mužského pohlaví. Expozice nikotinu *in utero* zvyšuje u potomků mužského pohlaví riziko rozvoje nikotinové závislosti v budoucnosti, ale pro potomky ženského pohlaví to neplatí. V naší studii jsme také našli změny u těhotných kuřaček, které čekaly plody mužského pohlaví. U novorozenech hochů jsme také prokázali vyšší hladiny testosteronu, což je v souladu s daty z experimentálních modelů, kde se ukazuje, že plody mužského pohlaví jsou ke změnám steroidů vyvolaným kouřením citlivější (Adamcová et al., 2017).

6 ZÁVĚR

- Byla vytvořena referenční rozmezí pro sledované steroidy ve 37. týdnu těhotenství, v I. době porodní a po porodu.
- Ve 37. týdnu těhotenství byl v mateřské krvi vyšší kortizol u matek, které čekaly hocha ($p=0.03$), 17-OH-pregnenolon byl vyšší u matek, které čekaly děvče ($p=0.0038$), progesteron byl nesignifikantně vyšší u žen, které čekaly děvče ($p=0.082$).
- U novorozenců nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi sledovanými steroidy a pohlavím.
- Ve skupině žen, které čekaly hocha, byly nalezeny u spontánních porodů proti plánovaným císařským řezům signifikantně vyšší hladiny 17-OH-pregnenolonu ($p=0.012$), progesteronu ($p=0.022$), kortizolu ($p=0.0022$), kortikosteronu ($p=0.0078$), nesignifikantně vyšší 17-OH-progesteron ($p=0.068$) a signifikantně nižší hladiny estradiolu ($p=0.0017$).
- U novorozených hochů nebyly v pupečnickové krvi prokázány signifikantní rozdíly mezi dětmi narozenými spontánně nebo císařským řezem, byly zde pouze hraniční rozdíly u progesteronu ($p=0.057$) a androstendionu ($p=0.065$).
- Věk matky neměl vztah k některému ze sledovaných steroidů.
- Nárůst tělesné hmotnosti, jak do 37. týdne těhotenství, tak za celé těhotenství, nekoreloval s žádným ze sledovaných steroidů.
- Porodní hmotnost novorozence neměla vztah k hladinám steroidů u fyziologických porodů.

- Kuřačky měly přírůstek tělesné hmotnosti vyšší v průměru o 4 kg oproti nekuřačkám.
- Byla potvrzena nižší porodní hmotnost novorozence u žen kuřaček.
- U novorozených hochů matek kuřaček byly prokázány vyšší hladiny testosteronu.
- U těhotných kuřaček, které čekaly hocha, a také u novorozených hochů, byly nalezeny vyšší hladiny testosteronu, což je v souladu s daty z experimentálních modelů, kde se ukazuje, že plody mužského pohlaví jsou ke změnám vyvolaným kouřením citlivější.
- Ve 37. týdnu těhotenství byly nalezeny vyšší hladiny kortizonu u těhotných kuřaček, které čekaly hocha, u novorozenců tyto změny nebyly prokázány.
- Hladiny kortizolu i kortizonu ve 37. týdnu těhotenství měly velký rozptyl, jak u hochů, tak u děvčat, jejichž matky v těhotenství kouřily oproti potomkům nekuřaček.

7 SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ

Tato práce se věnovala ověření hypotézy, že kouření ženy ovlivňuje tvorbu steroidních hormonů i v těhotenství. Tato hypotéza vycházela z dřívějších pozorování, která opakovaně prokázala změny ve steroidogenezi vyvolané kouřením v průběhu celého života ženy. V těhotenství ženy kouření sice omezí, ale úplně přestat se celé řadě kuřáček nepovede, proto bylo zajímavé se věnovat i tomuto vlivu. K ověření hypotézy byly zvoleny dva cíle, které se podařilo splnit.

Prvním z nich bylo popsání fyziologických změn širšího spektra steroidů v peripartálním období, protože základem pro hledání abnormalit steroidogeneze je znalost a respektování fyziologie. Byly prokázány rozdíly v hladinách steroidů u matek ve vztahu k typu porodu. Byla také potvrzena nutnost rozdělovat sledování změn steroidů ve vztahu k pohlaví plodu. Tyto výsledky jsou zajímavé i pro další studie do budoucna a odpověděly na některé otázky, které jsou v literatuře popisované rozporuplně. Navíc se povedlo vytvořit referenční rozmezí pro danou metodu stanovení steroidních hormonů, což bude mít využití v klinické praxi, kdy tato metoda nyní začíná být postupně zaváděna do rutinní praxe.

Druhým cílem bylo vyhodnocení vlivu kouření matek během těhotenství. U žen bylo nalezeno zvýšení androgenů, což je pro kuřáčky typické. Studie potvrdila vliv kouření matky nejen na nastavení její steroidogeneze, ale i vliv na novorozence. Tyto změny jsou odlišné podle pohlaví plodu, kde výraznější změny jsou u kuřáček, které čekají hochy, a také u novorozených hochů.

Oba cíle práce byly splněny a díky tomu se hypotézu podařilo potvrdit. Kouření žen v těhotenství vyvolává změny v tvorbě steroidů, jak u těhotných žen, tak u jejich potomků.

8 ZDROJE

1. Adamcová K, Kolátorová L, Škodová T, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Changes to fetal steroidogenesis caused by maternal smoking. *Physiol Res*, 2017, sv. 66 (Suppl.3), s. 375–386.
2. Adamcová K, Kolátorová L, Škodová T, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Steroid hormone levels in the peripartum period – differences caused by fetal sex and delivery type. *Physiol Res*. 67, (Suppl. 3), 2018, 489–497.
3. Andersen AN, Rønn B, Tjønneland A, Djursing H, Schiøler V. Low maternal but normal fetal prolactin levels in cigarette smoking pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1984; 63(3):237-9.
4. Baron JA, Comi RJ, Cryns V, Brinck-Johnsen T, Mercer NG. The effect of cigarette smoking on adrenal cortical hormones. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 272(1):151-5.
5. Cross J, Linker E, Leslie M. Sex-Dependent Effects of Nicotine on the Developing Brain. *J Neurosci Res*. 2017 Jan; 95(1-2):422-436.
6. Diczfaluzi E, Pion R, Schwers J. Steroid biogenesis and metabolism in the human foeto-placental unit at midpregnancy. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, 1965 Jan-Mar; 54:67-83.
7. Dušková M, Kolátorová L, Stárka L. Androgens in women - critical evaluation of the methods for their determination in diagnostics of endocrine disorders. *Physiol Res*. 67 (Suppl 3), 2018, 379-390.
8. Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Kazihnitková H, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Salátová M, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L, Pařízek A: Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and neuroactive steroids in premenopausal women, *Physiol Res*, 2012; 61(1):97-111.
9. Friedman AJ, Ravnikar VA, Barbieri RL. Serum steroid hormone profiles in postmenopausal smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*, 1987, 47(3):398-401.
10. Hautanen A, Adlercreutz H. Hyperinsulinaemia, dyslipidaemia and exaggerated adrenal androgen response to adrenocorticotropin in male smokers. *Diabetologia*, 1993,36(12):1275-81.
11. Ingvarsson RF, Bjarnason AO, Dagbjartsson A, Hardardottir H, Haraldsson A, Thorkelsson T. The effects of smoking in pregnancy on factors influencing fetal growth. *Acta Paediatr*, 2007; 96(3):383-6.
12. Jandíková H, Dušková M, Stárka L. Influence of smoking and smoking cessation on human reproductive hormonal balance. *Physiol Res*, 2017, Sep 26; 66(Suppl 3):323-331.
13. Kandel DB, Udry JR. Prenatal effects of maternal smoking on daughters' smoking: nicotine or testosterone exposure? *Am J Public Health*, 1999, 89(9), 1377–1383.
14. Kirschbaum C, Wüst S, Strasburger CJ. 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sci*. 1992,50(6):435-42.
15. Kuijper EA, Ket JC, Caanen MR, Lambalk CB. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online*, 2013 Jul; 27(1):33-63.
16. Kuijper EA, Twisk JW, Korsen T, Caanen MR, Kushnir MM, Rockwood AL, Meikle AW, Hompes PG, Wit JM, Lambalk CB. Mid-pregnancy, perinatal, and neonatal reproductive endocrinology: a prospective cohort study in twins and singleton control subjects. *Fertil Steril*. 2015; 104(6):1527-34.
17. Manjer J, Johansson R, Lenner P. Smoking as a determinant for plasma levels of testosterone, androstenedione, and DHEAs in postmenopausal women. *Eur J Epidemiol*, 2005,20(4): 331-7.
18. Michnovicz JJ, Hershcopf RJ, Naganuma H, Bradlow HL, Fishman J. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N Engl J Med*, 1986, 315(21):1305-9.
19. Morel Y, Roucher F, Plotton I, Goursaud C, Tardy V, Mallet D. Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. *Ann Endocrinol*. 2016 Jun;77(2):82-9.

20. Pašková A, Pařízek A, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Dušková M, Adamcová K, Koucký M, Šimják P, Černý A, Stárka L. Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res* 63, 2014: 115-126.
21. Pasqualini JR, Chetrite GS. The formation and transformation of hormones in maternal, placental and fetal compartments: biological implications. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2016; 27(1):11-28.
22. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Olsen J, Ernst E, Andersen CY, Bonde JP. Maternal smoking in pregnancy and reproductive hormones in adult sons. *Int J Androl*, 2008; 31(6):565-72.
23. Ratcliffe JM, Gladen BC, Wilcox AJ, Herbst AL. Does early exposure to maternal smoking affect future fertility in adult males? *Reprod Toxicol*, 1992; 6(4):297-307.
24. Rode L., Kjærgaard H., Damm P., et al. Effect of Smoking Cessation on Gestational and Postpartum Weight Gain and Neonatal Birth Weight. *Obstet Gynecol*, 2013 Sep; 122(3):618-25.
25. Salvini S, Stampfer MJ, Barbieri RL, Hennekens CH. Effects of age, smoking and vitamins on plasma DHEAS levels: a cross-sectional study in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992,74(1):139-43.
26. Smith LM, Cloak CC, Poland RE, Torday J, Ross MG. Prenatal nicotine increases testosterone levels in the fetus and female offspring. *Nicotine Tob Res*, 2003; 5(3):369-74.
27. Sosvorová L, Vítků J, Chlupáčová T, Mohapl M, Hampl R. Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS. *Steroids* 98, 2015a: 1-8.
28. Sosvorová L, Hill M, Mohapl M, Vítků J, Hampl R. Steroid hormones in prediction of normal pressure hydrocephalus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015b, 152:124-32.
29. Sowers MF, Beebe JL, McConnell D, Randolph J, Jannausch M. Testosterone concentrations in women aged 25-50 years: associations with lifestyle, body composition, and ovarian status. *Am J Epidemiol*, 2001,153(3):256-64.
30. Stárka L., Hill M., Králíková E. Kouření a endokrinní systém. *DMEV*, 2005 8: 180-186.
31. Strauss JF, Barbieri RB. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. 5th Edition, 2004, 340.
32. Stroud LR, Papandonatos GD, Shenassa E, Rodriguez D, Niaura R, LeWinn KZ, Lipsitt LP, Buka SL. Prenatal glucocorticoids and maternal smoking during pregnancy independently program adult nicotine dependence in daughters: a 40-year prospective study. *Biol Psychiatry*, 2014; 75(1):47-55.
33. Varvarigou AA, Liatsis SG, Vassilakos P, Decavalas G, Beratis NG. Effect of maternal smoking on cord blood estriol, placental lactogen, chorionic gonadotropin, FSH, LH, and cortisol. *J Perinat Med*, 2009; 37(4):364-9.
34. Vítků J, Chlupáčová T, Sosvorová L, Hampl R, Hill M, Heráček J, Biciková M, Stárka L. Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Atlanta*, 2015, 140: 62-67.
35. Vítků J, Heráček J, Sosvorová L, Hampl R, Chlupáčová T, Hill M, Sobotka V, Biciková M, Stárka L. Associations of bisphenol A and polychlorinated biphenyls with spermatogenesis and steroidogenesis in two biological fluids from men attending an infertility clinic. *Environ Int*, 2016, 89-90: 166-173.

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertace s impact faktorem

Adamcová K, Dušková M, Pařízek A. Smoking in pregnancy-negative impact on mother and child. Opinions on nicotine substitution. Ceska Gynekol. 2015 Aug; 80(4):264-70. IF 0.31.

Adamcová K, Kolátorová L, Škodová T, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Changes to fetal steroidogenesis caused by maternal smoking. Physiol Res 66 (Suppl.3), 2017, 375–386. IF 1.324.

Adamcová K, Kolátorová L, Škodová T, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Steroid hormone levels in the peripartum period – differences caused by fetal sex and delivery type. Physiol Res 67, (Suppl. 3), 2018, 489–497. IF 1.701.

9.2 Publikace, které jsou podkladem disertace bez impact faktoru

Adamcová K. Kouření v těhotenství – vliv na matku a dítě, možnosti léčby závislosti na tabáku. Časopis lékařů českých, 2017 Winter; 156, 9–12.

9.3 Publikace bez vztahu k tématu disertace s impact faktorem

Fartáková Z, Šimják P, Vítek L, **Adamcová K**, Horáková V, Koucký M, Hill M, Dušková M, Pařízek A. 2013. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. Ceska Gynekol, 2013 Jun; 78(3):276-80. IF 0.20.

Hill M, Hána V Jr, Velíková M, Pařízek A, Kolátorová L, Vítků J, Škodová T, Šimková M, Šimják P, Kancheva R, Koucký M, Kokrdová Z, **Adamcová K**, Černý A, Hájek Z, Dušková M, Bulant J, Stárka L. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Physiol Res, 2019, Apr 30; 68(2):179-207. IF 1.701.

Hill M, Pašková A, Kančeva R, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, **Adamcová K**, Mikešová M, Žižka Z, Koucký M, Saraoatková H, Kačer V, Matucha P, Meloun M, Pařízek A. Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014 Jan; 139: 201–22. IF 4.049.

Kolátorová L, Vítků J, Hampl R, **Adamcová K**, Škodová T, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Exposure to bisphenols and parabens during pregnancy and relations to steroid changes. Environ Res., 2018, sv. 163, 115–122. IF 3.835.

Kolátorová L, Vítků J, Vavrouš A, Hampl R, **Adamcová K**, Šimková M, Pařízek A, Stárka L, Dušková M. Phthalate Metabolites in Maternal and Cord Plasma and Their Relations to Other Selected Endocrine Disruptors and Steroids. Physiol Res 67 (Suppl. 3), 2018, 473-487. IF 1.701.

Pařízek A, Dušková M, Vítek L, Šrámková M, Hill M, **Adamcová K**, Šimják P, Černý A, Kokrdová Z, Vráblíková H, Boudová B, Koucký M, Malíčková K, Stárka L. 2015. The Role of Steroid Hormones in the Development of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. Physiol Res 64 (Suppl 2): 203-9.

Pařízek A, Dušková M, Vítek L, Šrámková M, Hill M, **Adamcová K**, Šimják P, Černý A, Kokrdová Z, Vráblíková H, Boudová B, Koucký M, Malíčková K, Stárka L. The Role of Steroid Hormones in the Development of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. Physiol Res 64 (Suppl. 2), 2015, 203-209. IF 1.643.

Pařízek A, Hill M, Dušková M, Vítek L, Velíková M, Kancheva R, Šimják P, Koucký M, Kokrdová Z, **Adamcová K**, Černý A, Hájek Z, Stárka L. A Comprehensive Evaluation of Steroid Metabolism in Women with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *PLoS One*, 2016 Aug 5; 11(8). IF 2.806.

Pařízek A, Mikešová M, Jirák R, Hill M, Koucký M, Pašková A, Velíková M, **Adamcová K**, Šrámková M, Jandíková H, Dušková M, Stárka L. Steroid hormones in the development of postpartum depression. *Physiol Res (Suppl 2)*, 2014; 63 277-82. IF 1.293

Pařízek A, Hill M, Dušková M, Vítek L, Velíková M, Kancheva R, Šimják P, Koucký M, Kokrdová Z, **Adamcová K**, Černý A, Hájek Z, Stárka L. 2016. A Comprehensive Evaluation of Steroid Metabolism in Women with Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *PLoS One*. 2016 Aug5;11(8): e0159203.

Pašková A, Jirák R, Mikešová M, **Adamcová K**, Fartáková Z, Horáková V, Koucký M, Hill M, Hruškovice H, Stárka L, Dušková M, Pařízek A. The role of steroids in the development of post-partum mental disorders. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014 Sep;158(3):361-4. IF 0.990.

Pašková A, Pařízek A, Hill M, Velíková M, Kubatová J, Dušková M, **Adamcová K**, Koucký M, Šimják P, Černý A, Stárka L. Steroid Metabolome in the Umbilical Cord: Is It Necessary to Differentiate between Arterial and Venous Blood? *Physiol Res*, 2014, 63 (1): 115–26.

Pašková A, Pařízek A, Hill M, Velíková M, Kubatová J, Dušková M, **Adamcová K**, Koucký M, Šimják P, Černý A, Stárka L. Steroid metabolome in the umbilical cord: is it necessary to differentiate between arterial and venous blood? *Physiol Res*, 2014 Mar 25; 63(1):115-26. IF 1.293.

Sláma J, **Adamcová K**, Dušek L, Sosna O, Cibula D. Umbilication is a strong predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*, 2013 Jul; 17(3):303-7. IF 1.110.

Šimják P, Hill M, Pařízek A, Vítek L, Velíková M, Dušková M, Kancheva R, Bulant J, Koucký M, Kokrdová Z, **Adamcová K**, Černý A, Hájek Z, Stárka L. 2018. May Circulating Steroids Reveal a Predisposition to Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy in Non-Pregnant Women? *Physiol Res* 67 (Suppl 3): S499–510.

Šimják P, Pařízek A, Vítek L, Černý A, **Adamcová K**, Koucký M, Hill M, Dušková M, Stárka L. Fetal Complications Due to Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, 2015, 43 (2): 133–39.

9.4 Publikace bez vztahu k tématu disertace bez impact faktoru

Adamcová K, Calda P. Možnosti ultrazvukového vyšetření v průběhu porodu. *Moderní gynekologie a porodnictví* 23, 2015, č.1, 28-32.