

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



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

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Antonín Pařízek, CSc.

Školitel-konzultant: as. MUDr. Michaela Dušková, PhD.

Praha, 2021

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, 8. 4. 2021

MUDr. Karolína Adamcová

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi svými návrhy, radami, připomínkami a odbornými materiály pomohli k vypracování disertační práce. Děkuji mému školiteli panu prof. MUDr. Antonínu Pařízkovi, CSc. za cenné rady, konzultace, trpělivost a snahu mi pomoci nejen při řešení mé disertační práce, ale také po celou dobu mého doktorského studia. Ráda bych poděkovala své konzultantce MUDr. Michaele Duškové, Ph.D. za mnoho cenných rad a připomínek, za ochotu, vstřícný přístup a trpělivost, kterou mi věnovala. Paní PharmDr. Lucii Kolátorové, PhD. z Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu děkuji za analýzu a statistické zpracování dat. Panu prof. MUDr. RNDr. Luboslavovi Stárkovi, Dr.Sc. děkuji za cenné připomínky. Upřímné poděkování patří za podporu a ochotu spolupracovníkům a vedení Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, zvláště pak panu prof. MUDr. Aloisi Martanovi, Dr.Sc. Velké poděkování za trpělivost a nekončící podporu patří také celé mé rodině.

Disertační práce byla podporována grantem GAUK č. 542216.

Identifikační záznam:

ADAMCOVÁ, Karolína. *Vliv kouření matky na homeostázu fetoplacentární jednotky.* [The effect of maternal smoking on the homeostasis of the fetoplacental unit]. Praha, 2021. 85 s., 3 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika 1.LF UK a VFN v Praze. Školitel Pařízek, Antonín, školitel-konzultant Dušková, Michaela.

Obsah

ABSTRAKT	8
ABSTRACT	10
SEZNAM ZKRATEK	12
1 ÚVOD	15
1.1 Hormonální změny v těhotenství	15
1.2 Faktory vedoucí k iniciaci porodu	17
1.3 Steroidní hormony	19
1.4 Vývoj steroidů během těhotenství – mateřská, placentární a fetální syntéza	21
1.4.1 Cholesterol	22
1.4.2 Pregnenolon a progesteron	22
1.4.3 Estrogeny	23
1.4.4 Androgeny	25
1.4.5 Glukokortikoidy	26
1.5 Změny steroidů specifické v těhotenství	27
1.6 Kouření a těhotenství	28
1.7 Vliv kouření na ženy	29
1.8 Vliv kouření na plod a dítě	30
1.9 Pozdní následky kouření na dítě	32
1.10 Pasivní kouření	35
1.11 Vliv kouření na endokrinní systém	35
2 HYPOTÉZA A CÍLE PROJEKTU	38
2.1 Hypotéza	38
2.2 Cíle projektu	38

3	METODY.....	39
3.1	1. část studie.....	39
3.1.1	Charakteristika souboru.....	39
3.1.2	Stanovení vzorků	41
3.1.3	Statistické zpracování dat	41
3.2	2. část studie.....	42
3.2.1	Charakteristika souboru.....	42
3.2.2	Stanovení vzorků	43
3.2.3	Statistické zpracování dat	43
4	VÝSLEDKY	44
4.1	1. část studie.....	44
4.2	2. část studie.....	46
5	DISKUZE	51
5.1	1. část studie.....	51
5.2	2. část studie.....	54
6	ZÁVĚR	59
7	SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ	60
8	ZDROJE.....	61
9	PŘÍLOHY	74
9.1	Seznam publikovaných článků a abstrakt	74
9.1.1	Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace	74
9.1.2	Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace	74
9.1.3	Abstrakta přednášek/posterů se vztahem k tématu disertace	74
9.1.4	Publikace v časopisech s IF bez vztahu k tématu disertace	75
9.1.5	Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace	77

9.2 Přílohy	78
9.2.1 Informovaný souhlas	78
9.2.2 Dotazník pro pacientku	80
9.3 Separáty publikací v impaktovaných vědeckých časopisech	85

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 ozřejmění 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 7α -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.

SEZNAM ZKRATEK

3 β -HSD - 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázou

7-oxo-DHEA - 7-oxo-dehydroepiandrosteron

7 α -OH-DHEA - 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron

7 β -OH-DHEA - 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosteron

11 β -HSD1 - 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 1

16 α -hydroxy-DHEA - 16 α -hydroxy- dehydroepiandrosteron

16 α -hydroxy-DHEA-sulfát - 16 α -hydroxy- dehydroepiandrosteron sulfát

17-OH-progesteron – 17-hydroxy-progesteron

17 α -OH-pregnenolonu – 17 α -hydroxy-pregnenolon

ACTH – adrenokortikotropní hormon

ANOVA – Analysis of Variance

BMI – body mass index

CBG - kortikosteroidy vázající globulin

CRH - kortikotropin-releasing hormon

CYP11A1 - Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1

CYP11B1 - Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1

CYP11B2 - Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2

CYP17 - Cytochrom P450 17A1

CYP21 – Cytochrom P450 21

DHEA – dehydroepiandrosteron

DHEAS – dehydroepiandrosteron sulfát

DHT – dihydrotestosteron

E1 - estron

E2 - estradiol

E3 – estriol

FSH – folikulostimulační hormon

hCG - lidský choriový gonadotropin

HDL – high density lipoprotein

HPA - hypotalamo-hypofyzo-adrenokortikální osa

HSD3B1 - 3-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1

IVF – in vitro fertilizace

LC-MS/MS - kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

LDL-cholesterol – low density lipoprotein cholesterol

LH - luteotropní hormon

mRNA – messenger ribonukleová kyselina

NCSS - Number Cruncher Statistical System

P450_{SCC} - cytochrom-P-450-postranní řetězec odštěpující enzym

SD – směrodatná odchylka

SHBG - sexuální hormony vázající globulin

SIDS - syndrom náhlého úmrtí kojence

StAR - steroidogenic acute regulatory protein

TSH – thyreotropní hormon

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. V České republice je každoročně okolo 100 000 těhotných žen. V roce 2012 byly publikovány výsledky analýzy dat Národního registru rodiček a Národního registru novorozenců spravovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky České republiky, a to z let 2000–2009. Analýza byla zaměřena na užívání alkoholu, tabáku a nelegálních drog u žen, které byly hospitalizovány v souvislosti s porodem nebo šestinedělím. V tomto období bylo evidováno 60 502 kuřáček z celkem 1 008 821 rodiček. To znamená, že přibližně 6,5 % žen na konci těhotenství uvedlo, že kouří cigarety (Nechanská et al., 2012).

Rizika kouření během těhotenství jsou dobře známa. Studie, které se této problematice věnují, mají počátky již v 50. letech 20. století. 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. Kouření cigaret je rizikem pro lidskou reprodukci ještě předtím, než žena zjistí, že je těhotná.

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.

1.1 Hormonální změny v těhotenství

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 endokrinním prostředí lidského těhotenství dominují placentární hormony. Placenta je nezbytná nejen pro výživu plodu, výměnu plynů a vylučování plodu, ale je také hlavním endokrinním orgánem, produkujícím velké množství proteinů (včetně cytokinů a růstových faktorů). Placenta produkuje také steroidní hormony, které jsou ve velkém množství vylučovány do mateřské cirkulace. Většina hormonů produkovaných placentou je obdobná jako hormony produkované u netěhotných žen (Waddel, 1993).

Placentární hormony mohou být vázané na mateřské hormonální receptory a mohou být považovány za alokrinní faktor, např. hormony produkované plodem mohou působit na mateřských hormonálních receptorech. Placentární hormony modifikují homeostatické mechanismy matky k uspokojení nutričních, metabolických a fyzických požadavků rychle rostoucího plodu. Mateřský organismus nemůže rozlišovat mezi hormony placentárního a mateřského původu. Placentární hormony jsou tedy analogy hormonů přítomných u netěhotných žen a mohou snadno výrazně ovlivnit endokrinní aktivitu matky (Strauss a Berbieri, 2004).

Většina placentárních hormonů je ve velkém množství vylučována do mateřského oběhu. Anatomické uspořádání lidské placenty je pro tento účel ideální. Naproti tomu placentární trofoblastová vrstva brání vstupu mateřských hormonů do fetálního kompartmentu. Fetoplacentární endokrinní systém se dále vyvíjí, aby mohl fungovat nezávisle na matce (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 vaječníků, 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).

Po implantaci embrya dochází k mnoha endokrinním a metabolickým změnám. Správné načasování těchto změn u plodu, v placentě a u matky jsou zvláště důležité pro iniciaci a udržování

těhotenství, pro fetální růst a vývoj, i v období porodu. Pokroky v posledních desetiletích umožnily lepší porozumění mnoha složitým biologickým a hormonálním dějům, které regulují proces reprodukce. Lidský choriový gonadotropin (hCG) produkovaný placentou umožňuje udržování corpus luteum a řídí placentální steroidogenezi. Zpočátku jsou placentální gonadotropiny luteotropní a umožňují kontinuální sekreci progesteronu a estrogenů v corpus luteum. Později přebírá celý steroidogenní potenciál placenta a corpus luteum již není k dokončení vývoje plodu potřebné. K udržení normálního těhotenství až do porodu je nezbytná řada dalších hormonů, stejně tak jako jejich vazebných proteinů a receptorů (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Je zřejmé, že biologická aktivita různých hormonů hraje klíčovou roli v iniciaci a vývoji těhotenství. Fetální syntéza hormonů začíná již v časném stadiu těhotenství. Pokud jde o steroidní hormony, kůra nadledvin je schopna produkovat mineralokortikoidy a glukokortikoidy, DHEA, DHEAS, 16 α -hydroxy-DHEA a jeho sulfát, a varlata mohou produkovat testosteron. Steroidogeneze je regulována hypothalamo-hypofyzární osou. Placenta produkuje progesteron a estrogeny. Mezi placentou a fetálním kompartmentem existuje komplementární aktivita mezi enzymy zapojenými v syntéze a transformaci steroidů (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Plod postrádá některé enzymy, které jsou nezbytné pro steroidogenezi (např. 3 β -HSD, 5-ene \leftrightarrow 4-ene isomeráza, aromatáza), zatímco jiné enzymy jsou přítomné v plodu (např. C17–C20 desmoláza, hydroláza) a naopak chybí v placentě. Plod je velmi aktivní v konverzi acetátu na cholesterol a v transformaci pregnanů na androstany působením 16-hydroxylázy, což je nezbytné pro syntézu estriolu. Všechny tyto transformace chybí v placentě. Placentální kompartment může transformovat cholesterol na C21-steroidy, konvertovat 5-ene na 4-ene steroidy a má velkou kapacitu k aromatizaci C19 prekurzorů. Tak můžou plod a placenta společně zpracovávat všechny steroidní hormony (Pasqualini a Chetrite, 2016).

1.2 Faktory vedoucí k iniciaci porodu

Porod je proces výrazně druhově specifický a u člověka jedinečný. Právě pro druhovou specificitu pokusy na laboratorních zvířatech nemohou plně objasnit mechanismus porodu u člověka. Přes množství publikovaných hypotéz není sled událostí, které vedou ke spuštění porodu,

dosud zcela jasný. Existuje řada faktorů, které mohou být do iniciace porodu zapojeny. Mechanická distenze dělohy na konci gravidity, hormonální autokrinní a parakrinní signalizace mezi fetoplacentární jednotkou a matkou a další změny, vedou ke ztrátě klidového stavu dělohy a umožňuje nástup kontrakcí (Ravanos et al., 2015). Hlavní faktory regulující počátek porodu, a to pokles hladiny progesteronu a současné zvýšení estradiolu, působení CRH na buňky myometria, osa hypothalamus-hypofýza-nadledvina plodu a její vliv na hladiny estradiolu a kortizolu a odpověď plodových obalů na hormonální změny, jsou rozvedeny v následujícím textu (Ravanos et al., 2015).

Teorie o odnětí progesteronu byla založena na experimentálních studiích provedených na kozách a ovčích. U těchto druhů dochází před nástupem porodu k poklesu progesteronu a vzestupu estradiolu. Řada vědců se snažila ověřit tuto teorii u lidí, ale nebyla nalezena žádná změna hodnot sérového progesteronu předcházející porodu (Blanks a Brosens, 2012). Byly však popsány funkční změny progesteronového receptoru v období blížím se termínu porodu (Mesiano et al., 2011). Progesteron navíc působí protizánětlivě inhibicí produkce chemokinů a potlačením transkripce genů podporujících kontraktilitu dělohy. Funkční změny progesteronového receptoru mohou vést ke snížení transkripce genů potlačujících kontraktilitu a ke zvýšení senzitivity myometria k uterotoním agens (Ravanos et al., 2015).

Mateřský CRH je produkován placentou, jeho hodnoty v mateřské krvi se s postupem těhotenství zvyšují a nejvyšších hodnot dosahují před porodem (McLean et al., 1995). Hladina CRH-binding proteinu v mateřské krvi se v termínu porodu snižuje a dochází tak ke zvýšení biologické aktivity CRH. Je popisováno, že vzestup CRH v průběhu porodu může podporovat účinek oxytocinu a prostaglandinu F_{2α} usnadňující uterinní kontraktilitu (Linton et al., 2001). Zdá se, že existuje pozitivní zpětná vazba mezi cirkulujícími glukokortikoidy a produkcí placentárního CRH. Vyšší hodnoty mateřského CRH zvyšují produkci hypofyzárního kortikotropinu, která vede k produkci kortizolu a DHEAS v nadledvinách a dochází k syntéze CRH-mRNA a produkci estrogenů v placentě (Emanuel et al., 1994). Kortizol stimuluje maturaci plic plodu ve III. trimestru indukci produkce surfaktantu, která může být vyvolávajícím stimulem v iniciaci porodu (Mendelson, 2009).

Placentální CRH vstupuje do fetální cirkulace, působí na fetální hypofýzu přes CRH-receptory a může tak aktivovat fetální osu hypothalamus-hypofýza-nadledvina (Nodwell et al., 1999). To způsobuje uvolnění ACTH, které působí na fetální nadledviny a vede k produkci vyššího množství

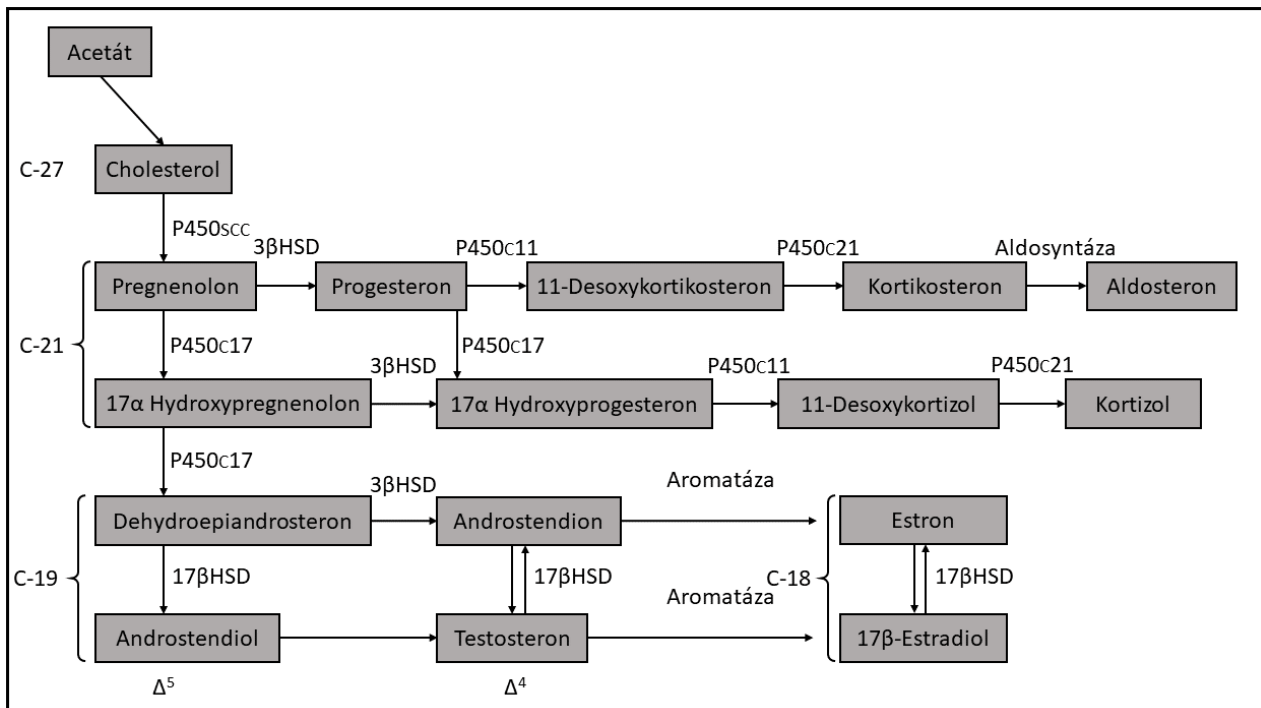
kortizolu a DHEAS. DHEAS pak slouží jako hlavní molekula pro produkci estrogenů a na straně placenty (Smith et al., 2003). Estrogeny samotné nemohou způsobit kontrakce, ale podporují a regulují produkci proteinů, které mohou ovlivnit uterinní kontraktilitu a tím mohou vést ke zlepšení koordinace a posílení kontrakcí (Ravanos et al., 2015).

Obaly plodu jsou v přímém kontaktu s plodovou vodou a slouží nejen jako ochranná bariéra pro vyvíjející se plod, ale také jako mediátor výměny signálů mezi matkou a plodem (Sun et al., 2006). Zdá se, že plodové obaly jsou hlavním místem syntézy a metabolismu kortizolu a progesteronu. Ke zvýšení hladiny kortizolu ve fetální cirkulaci a v plodové vodě dochází částečně zvýšením produkce fetálními nadledvinami, ale také díky potlačené aktivitě 11 β -HSD1, který reguluje metabolismus a transport kortizolu a kortizonu mezi mateřskou a fetální cirkulací (Alfaidy et al., 2003). Vysoké koncentrace kortizolu podporují maturaci fetálních plic, placentální expresi CRH, prostaglandinů a oxytocinu ve snaze překonat progesteronový inhibiční účinek na uterinní kontraktilitu (Ravanos et al., 2015).

1.3 Steroidní hormony

Steroidy jsou hormony lipofilní povahy, které vznikají z cholesterolu procesem steroidogeneze. Nejsou ukládány do zásoby, ale v případě potřeby se zvyšuje jejich syntéza. V cílové tkáni působí cestou nitrobuněčných receptorů. Místem syntézy jsou endokrinní buňky kůry nadledvin, Leydigovy buňky varlat, folikulární buňky ovarií, placenta, corpus luteum a další. Základním krokem je zkrácení postranního řetězce cholesterolu o 6 uhlíků a tvorba pregnenolonu, což katalyzuje mitochondriální enzym desmolasa (= cytochrom-P-450 - postranní řetězec odštěpující enzym, P450_{scc}).

Z pregnenolonu se následně syntetizují všechny steroidní hormony (Obr. 1).



Obrázek 1. Schéma steroidogeneze (Strauss a Barbieri, 2004)

Steroidní hormony jsou produkčními žlázami secernovány většinou v nekonjugované formě. Jejich vazba na kyselinu sírovou, glukuronovou nebo na další kyseliny vede k tvorbě tzv. konjugátů. Konjugované steroidy jsou ve vodě lépe rozpustné, což umožňuje jejich vylučování do moči.

V krvi jsou steroidy vázány na proteiny, pouze jejich malá část je volná, ta je považovaná za biologicky aktivní. Nekonjugované steroidy jsou většinou vázány na albumin. C19 a C18-steroidy, které mají 17-hydroxyskupinu (testosteron, estradiol, androstendiol), se navíc váží i na sexuální hormony vázající globulin (SHBG), což je glykoprotein zajišťující transport těchto steroidů krevním řečištěm. SHBG má vysokou vazebnou afinitu a steroid na něj vázaný je biologicky neaktivní, slouží jako rezerva hormonu. Naproti tomu albumin má k molekulám steroidů nízkou vazebnou afinitu, může být snadno vyvázán, a tudíž je tato frakce považována za biologicky dostupnou pro ostatní tkáň. Úhrn volného a na albumin vázaného steroidu se označuje někdy jako biologicky dostupný.

Pro vazbu kortizolu a některých dalších C21-steroidů je určen kortikosteroidy vázající globulin (CBG), což je glykoprotein syntetizovaný převážně v játrech. CBG má vysokou afinitu ke kortikoidům. Afinita se mění v závislosti na tělesné teplotě a pH, což má význam v regulaci dostupnosti kortizolu pro tkáň v závislosti jednak na metabolické aktivitě orgánu a také na změně

tělesné teploty např. při infekci nebo při expozici organismu extrémně vysoké teplotě (Šimůnková a Marek, 2012).

Při hodnocení steroidních hormonů je nutná znalost charakteru steroidního metabolomu ve specifických situacích. Referenční rozmezí v takových situacích jsou pak odlišná. Příkladem takového stavu je především těhotenství, u žen znalost fáze cyklu, vývojové fáze jako puberta, menopauza, andropauza a stárnutí, dále poruchy jaterních a renálních funkcí, užívání některých látek včetně farmakoterapie nebo dopingů.

Objasnění některých poruch biosyntézy steroidních hormonů a pokrok v měření v odlišných kompartmentech fetoplacentární jednotky u těhotných žen z velké části přispěla k lepšímu porozumění biosyntéze a metabolismu steroidních hormonů. K měření steroidů je rutinně využívána imunoanalýza. Steroidy mohou být měřeny v mateřské plazmě, moči, plodové vodě a v pupečnickové plazmě. Vzhledem k problémům (např. zkřížená reaktivita) při stanovení jsou postupně více využívány chromatografické metody, které doposud byly vyhrazeny spíše pro výzkumné účely. Výhodou plynové nebo kapalinové spektrometrie s hmotnostní chromatografií oproti imunoanalýze je možnost měření více steroidů najednou (Morel et al., 2016).

1.4 Vývoj steroidů během těhotenství – mateřská, placentární a fetální syntéza

Iniciace, udržování a ukončení těhotenství je do značné míry závislé na hormonálních faktorech. Progesteron, estrogeny, androgeny a glukokortikoidy jsou zapojeny v těhotenství od implanace až po porod. Jejich syntéza a metabolismus jsou výsledkem řady složitých dějů zahrnujících plod, placentu a matku. Fetoplacentární endokrinní systém se vyvíjí a funguje nezávisle na matce. Většinou 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. 3β -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 DHEA, která je nezbytná pro tvorbu estriolu. 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 steroidů u lidských plodů je lokalizována v nadledvině, přičemž primitivní adrenokortikální buňky se objevují ve čtvrtém týdnu gestace. Odlišení dvou zón je možné již v osmém týdnu, a to fetální zóny a definitivní zóny. Fetální nadledvina roste velmi rychle, na konci těhotenství mají obě nadledviny hmotnost asi 6-8 g, z toho 80 % tvoří fetální zóna, která se ztrácí během několika měsíců po porodu, a definitivní zóna se diferencuje v dobře známé oblasti: fasciculata-reticularis-glomerulosa (Pasqualini a Chetrite, 2016).

V následujícím textu je postupně prezentována tvorba a transformace hlavních steroidních hormonů důležitých pro udržení těhotenství.

1.4.1 *Cholesterol*

V rámci experimentu fetální perfúze ¹⁴C-acetátu umožnila sledovat jeho konverzi na cholesterol a následně na různé 5-ene-steroidy jako pregnenolon, pregnenolon sulfát, DHEA a jeho sulfát (Archer et al., 1971). Předpokládá se, že cholesterol produkovaný fetálními nadledvinami je hlavním zdrojem v biosyntéze steroidů (Carr a Simpson, 1982). Zároveň bylo prokázáno, že de novo syntéza cholesterolu je stimulována ACTH (Carr a Simpson, 1981).

Biosyntéza cholesterolu v placentě je velmi limitována. Placenta využívá cholesterol získaný z fetálního a mateřského kompartmentu. V placentě je hydrolyzován na 20 α , 22R-dihydroxycholesterol a působením desmolázy konvertován na pregnenolon. Cytochrome P450 postranní řetězec odštěpující enzym (P450sc) (CYP11A1) konvertuje cholesterol na pregnenolon k zahájení steroidogeneze. P450sc a jeho mRNA jsou ve velmi vysokém množství exprimovány ve fetálních nadledvinách, varlatech a v placentě (Pezzi, 2003).

1.4.2 *Pregnenolon a progesteron*

Pregnenolon je konvertován na pregnenolon sulfát působením sulfotransferázy zejména ve fetálních nadledvinách. Pregnenolon sulfát může být transformován na 17 α -hydroxypregnenolon sulfát a konvertován aktivitou C17–C20 desmolázy na DHEA-sulfát, který je nejhojnějším steroidem

v organismu plodu a hlavním prekurzorem pro tvorbu placentálních estrogenů (Klak et al., 2003). Pregnenolon může být ve fetálním kompartmentu konvertován také na 21-hydroxy-pregnenolon, klíčový meziprodukt v biosyntéze kortikosteroidů (Pasqualini et al., 1985).

V placentě je pregnenolon transformován na progesteron působením 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázou (3 β -HSD) typu 1. 3 β -HSD může působit již v časném stadiu těhotenství, jak bylo prokázáno v placentě v 9. týdnu těhotenství (Meeker et al., 1971). Konverze pregnenolonu na progesteron je stimulována hCG (Guichard et al., 1975). Po implantaci embrya se hCG tvořené trofoblastem objevuje v mateřské cirkulaci osm dní po LH peaku a zabraňuje regresi corpus luteum. Proto progresivní zvýšení mateřského plazmatického progesteronu a estrogenů odráží aktivitu corpus luteum. K luteo-placentálnímu posunu dochází mezi 6.-8. týdnem těhotenství (Morel et al., 2016).

Syntéza progesteronu placentou vyžaduje dva kroky. Prvním krokem je konverze cholesterolu na pregnenolon pomocí P450_{scc} (CYP11A1) v mitochondriích. Biosyntéza cholesterolu v placentě je velmi limitovaná. Cholesterol pochází především z LDL-cholesterolu matky, ale také z plodu. Druhým krokem je konverze pregnenolonu na progesteron působením 3-hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1 (HSD3B1) vázané na mitochondriích (Morel et al., 2016).

Ve III. trimestru těhotenství dosahuje produkce progesteronu 250 – 350mg/24hod, z nichž je 80-90 % syntetizováno v placentě a vylučováno do fetálního a mateřského kompartmentu. Progesteron je z velké části transformován ve fetálním i placentálním kompartmentu působením reduktázy, hydroxylázy, dehydrogenázy a C17-C20 desmolázy (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Progesteron má přímý vliv na redukci kontraktility myometria a je tak nezbytný k udržení těhotenství. Jeho mateřská plazmatická koncentrace se v průběhu těhotenství progresivně zvyšuje a nejvyšších koncentrací (až 130 ng/ml, tj. 413,4 nmol/l) dosahuje ve III. trimestru. Jeho produkce je přibližně 250 mg/den.

1.4.3 Estrogeny

Estrogeny jsou tvořeny především v placentě za využití fetálních a mateřských prekurzorů. Produkce v průběhu těhotenství kontinuálně stoupá a dosahuje hodnot 100 – 120mg/24hod, což představuje 60–70 % celkových estrogenů (Pasqualini, 2005). Hladina estrogenů je u těhotných žen

300 - 500x vyšší než u netěhotných žen. Fetální a mateřské prekurzory jsou pro syntézu estradiolu a estronu využívány přibližně ve stejných poměrech, avšak pro syntézu estriolu jsou v 90 % využívány fetální prekurzory (Pasqualini a Chetrite, 2016). Fetoplacentární jednotka, fetální játra a placenta, se stává primárním místem produkce estrogenů v průběhu těhotenství.

Estrogeny jsou tvořeny hlavně v placentě za využití mateřských a fetálních androgenů a následně přecházejí do mateřského a fetálního kompartmentu. Syntéza začíná v 8. týdnu těhotenství od chvíle, kdy jsou funkční fetální nadledviny a játra. V mateřské plazmě množství estrogenů kontinuálně roste a dosahuje hodnot 0,07 - 16ng/ml, tj. 0,257 – 43,582nmol/l na konci těhotenství (De Hertogh et al., 1976).

Nejdříve je velké množství DHEA a DHEAS produkované fetálními nadledvinami 16α -hydroxylováno v játrech a následně metabolizováno ke získání estriolu – hlavního placentálního estrogenu (Pasqualini, 2005). V játrech plodu některé enzymy chybí, a proto syntéza estrogenů zde může probíhat pouze konverzí fetálního testosteronu. Podobně probíhá syntéza estrogenů v placentě, která je závislá na přísunu cirkulujících C19 steroidů (Voutilainen et al., 1986). Fetální játra produkují velké množství alfa-fetoproteinu a SHBG, který působí tak, že váže cirkulující estrogeny a snižuje množství bioaktivních estrogenů. Tím fetální játra chrání plod před nadměrnou expozicí estrogenům (Bader et al., 2004).

V placentě probíhá syntéza estrogenů ve třech hlavních krocích. Nejdříve dochází k hydrolyze 5-ene-C19 steroidních sulfátů působením sulfatázy, následně je 3β -hydroxy-5-ene struktura transformována na 3-oxo-4-ene skupinu působením 3β -HSD, 5-ene \Rightarrow 4-ene isomerázy a nakonec je steroidní kruh A v několika krocích aromatizován (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Syntéza estriolu ve fetoplacentární jednotce je vyvrcholením vzájemného vztahu mezi fetální adrenální sekrecí DHEAS, transformací na 16α -hydroxy-DHEAS (hlavně ve fetálních játrech) a jeho přenosem do placenty s následnou aromatizací. Placentální koncentrace estriolu dosahuje >60mg/24hod v průběhu III. trimestru těhotenství. Nízké hladiny estriolu obvykle korelují se sníženou uteroplacentární perfuzí jsou asociovány s rizikem intrauterinního úmrtí plodu. Obecně mohou být nízké hladiny estriolu v mateřské cirkulaci považovány za marker určitých vývojových abnormalit (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Placentální kapacita pro aromatizaci androgenů se s postupujícím těhotenstvím zvyšuje. LH a hCG proces aromatizace stimulují. Ke konci těhotenství se koncentrace estrogenů v placentálním syncytiotrofoblastu zvyšuje, umožňuje přechod z klidového nastavení myometria do kontraktálního a připravuje tak tělo na porod. S tímto cílem glukokortikoidy (kortizol) také indukují produkci estrogenů (Pasqualini et al., 1985).

1.4.4 Androgeny

V průběhu těhotenství je syntéza testosteronu a jeho konverze na dihydrotestosteron (DHT) nezbytná pro správný vývoj mužského pohlaví. Biosyntéza testosteronu začíná okolo 9. týdne těhotenství v Leydigových buňkách a umožňuje ukončení vývoje varlat (Fluck a Pandey, 2014). Klasická cesta biosyntézy z cholesterolu na testosteron přes DHEA a 4-androstendion v testes a následná konverze testosteronu na DHT v cílových tkáních je dobře známá. Nadbytek fetálních androgenů nevede k virilizaci, protože placentální aromatáza přeměňuje androgeny na estrogenery. Navíc jsou těhotné ženy chráněny proti hyperandrogenismu pomocí vysokých hladin SHBG a progesteronu (Morel et al., 2016).

Koncentrace DHEA a 16 α -hydroxy-DHEA a jejich sulfátů jsou vyšší v umbilikální arterii než v umbilikální žíle, což nasvědčuje tomu, že androgeny jsou produkovány hlavně ve fetálním kompartmentu. V termínu porodu dosahuje produkce DHEA-sulfátu 200 - 220mg/24hod a 90–95 % je produkováno plodem. DHEA je syntetizován především ve fetálních nadledvinách a játrech ze tří hlavních prekurzorů: pregnenolon, 17-hydroxypregnenolon a 17,21-dihydroxypregnenolon. Fetální nadledviny mají vysokou sulfotransferázovou aktivitu a většina DHEA je zde konvertována na odpovídající sulfáty. Sulfatázová aktivita pro DHEA sulfát a většinu dalších steroidních sulfátů je v různých fetálních tkáních nízká nebo dokonce chybí (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Testosteron je syntetizován v testes plodu za využití progesteronu a pregnenolonu jako prekurzorů. K sekreci testosteronu v plodu dochází těsně před nástupem mužské diferenciací urogenitálního traktu (70-90 dní gestace). Ten je konvertován 5 α -reduktázou na velmi aktivní androgen 5 α -dihydrotestosteron (Pasqualini a Chetrite, 2016).

DHEA-sulfát a 16 α -hydroxy-DHEA-sulfát jsou secernovány z plodu do placenty, kde jsou hydrolyzovány působením sulfatázy. Nekonjugované steroidy jsou konvertovány aktivitou 3 β -HSD

typu 1 na androstendion a 16α -hydroxy-androstendion, které jsou důležitými prekurzory estrogenů (Pasqualini a Chetrite, 2016).

1.4.5 Glukokortikoidy

Kůra nadledvin byla detekována u lidských embryí pomocí hematoxylin-eosinu již 33 dní po koncepci. Rozlišení fetální a definitivní zóny je pak možné od 52. dne po koncepci. Vyvíjející se cévy jsou možné pozorovat od 41. dne po koncepci. StAR, CYP11A1, CYP17 a CYP21 jsou exprimovány ve fetální zóně od 50. dne po koncepci a dále v průběhu celého I. trimestru (Goto et al., 2002). V zevní definitivní zóně byla pozorována slabá aktivita StAR, CYP11A, CYP11B1, CYP11B2. ACTH bylo pomocí imunohistochemických metod detekováno již v 8. týdnu těhotenství v předním laloku hypofýzy (Begeot et al., 1978).

Produkce glukokortikoidů a mineralokortikoidů ve fetálních nadledvinách je nezbytná jednak pro podporu embryonálních funkcí, jednak pro následnou adaptaci na extrauterinní život.

V lidském plodu se primitivní adrenokortikální buňky objevují již po 4. týdnu gestace. Dvě odlišné zóny jsou diferencovány v 8. týdnu těhotenství – vnitřní zóna nazývaná „fetální“ a vnější zóna nazývaná „definitivní“. Fetální nadledviny rostou velmi rychle, dohromady váží 100 mg v 10. týdnu, 2 g ve 20. týdnu a 6-8 g na konci těhotenství. Fetální zóna, která představuje 80 % hmotnosti nadledvin mizí několik měsíců po porodu a definitivní zóna se diferencuje v dobře známé tři zóny: fasciculata, reticularis a glomerulosa (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Kortizol je syntetizován ve fetálních nadledvinách dvěma možnými způsoby: **4-ene cesta**, která využívá jako prekurzor progesteron, který je konvertován přes 17-hydroxyprogesterone a 17,21-dihydroxyprogesterone na kortizol;

5-ene cesta, který využívá jako prekurzor pregnenolon, který je konvertován na hydroxypregnenolon a 17,21-dihydroxypregnenolon na kortizol.

Existence obou cest je prokázána řadou studií. Vysoké hladiny progesteronu vylučovaného z placenty do plodu a výrazná konverze progesteronu na 17-hydroxyprogesteron naznačuje, že tato cesta by mohla být významnější, což potvrdila řada studií (Pasqualini et al., 1985).

Ve fetálním kompartmentu jsou kortizol a kortizon konvertovány na odpovídající 21-sulfáty. Kortizol je syntetizován ve fetálních nadledvinách, především v definitivní zóně, od časného stadia embryonálního vývoje. Ten je konvertován na kortizon, který je hlavní cirkulující formou tohoto hormonu. Na konci těhotenství se situace obrací a kortizol dominuje, což objasňuje jeho důležitou biologickou roli v perinatálním období (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Deoxykortikosteron a kortikosteron mohou být syntetizovány oběma 4-ene i 5-ene cestami. Tyto dva kortikosteroidy jsou převážně transformovány ve většině fetálních tkání na odpovídající 21-sulfáty. Aktivita sulfotransferázy pokračuje po určitou dobu i po porodu. Kortikosteron může být transformován v různých fetálních tkáních na 20 β -dihydrokortikosteron, 6 β -hydroxykortikosteron a 11 β -dehydrokortikosteron (Pasqualini et al., 1985).

Dehydrokortikosteron může být syntetizován v placentě, kam jsou jeho prekurzory (21-hydroxy-pregenolon a jeho sulfát) transferovány z fetálního kompartmentu (Pasqualini a Chetrite, 2016).

Aldosteron, nejsilnější mineralokortikoid, je syntetizován ve fetálních nadledvinách od časného stadia těhotenství. Následně je z velké části konvertován na jeho tetrahydroderivát a jeho 21-sulfát, především ve fetálních játrech (Pasqualini et al., 1985).

1.5 Změny steroidů specifické v těhotenství

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). Popisované role změn hladin steroidů ve vztahu k některým onemocněním vycházejí z experimentálních modelů na zvířatech, která však ve vztahu k těhotenství jsou pro přenos poznatků na člověka vyloženě nevhodná, jak krásně ukazuje studie Heusnnerova et al. (2016). Změny ve vztahu k negativním dopadům expozice glukokortikoidům *in utero* na metabolická a kardiovaskulární onemocnění jsou v literatuře popisovány u experimentálních modelů na hlodavcích. Autoři se věnovali rozdílům mezi aktivitou placentárních enzymů (11 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy typ 1 a 2), které chrání plod před expozicí vysokým hladinám mateřských

glukokortikoidů, v lidské a krysí placentě, kde jejich účinky byly opačné (Heusnner et al., 2016). Druhové rozdíly brání přenosu dat a výsledky jsou vždy určeny pouze pro daný živočišný druh (Dušková et al., 2020).

Druhým zdrojem pro hledání vztahů mezi změnami steroidů *in utero* k některým patologiím jsou asociační studie, které mají svá úskalí v tom, že samotná asociace neznamena kausalitu, ale i tak může otevřít nové hypotézy, a proto mají svůj určitý význam. Pro pochopení složitých vztahů a úlohy steroidů je základem dobré poznání jejich změn v rámci fyziologie. Změny umožní tvorbu hypotéz publikovaných v asociačních studiích, či naopak jejich popření s tím, že se jedná o pouhé náhodné nálezy v rámci fyziologických změn. Základem je pochopitelně přesná laboratorní analýza s respektováním limitů stanovení a správně vytvořená referenční rozmezí pro dané analyty (Dušková et al., 2018), aby asociace nevznikaly pouze z nepřesných měření (Dušková et al., 2020).

Rozdíly ve steroidních hormonech dané pohlavím plodu jsou v literatuře popisovány odlišně jako žádné, snížení nebo zvýšení (Kuijper et al., 2015), stejně tak jako změny dané věkem matky a jejich význam (Carlsen et al., 2003; Troisi et al., 2008).

1.6 Kouření a těhotenství

Tabákový kouř je dynamickým komplexem více než 4000 plynných a hmotných látek. Obsahuje přibližně 100 kancerogenů (např. dibenzantracen, ens-a-pyren, dimetylnitrosamin, dietylnitrosamin, vinylchlorid, hydrazin, arzen) promotorů tumorů nebo suspektních kancerogenů. Dalšími složkami jsou mutageny, alergeny, toxické látky, vysoký obsah oxidu uhelnatého a přibližně 700 aditiv (Adamcová et al., 2015).

Mutagenní změny vznikající vlivem cigaretového kouře v zárodečných buňkách mužů a žen se mohou uplatnit u jejich potomků. U kouřících mužů i žen bývá také snížená schopnost oplodnění, jejíž příčiny jsou různé. Četné chemické látky z cigaretového kouře mohou procházet placentární bariérou do krevního oběhu plodu a plod ohrožovat (Crha a Hrubá, 2000). Četné studie také ukazují, že ženy jsou ke škodlivinám cigaretového kouře vnímavější než muži (Hrubá, 2004).

V pupečnickové krvi plodů a novorozenců žen kouřících v průběhu těhotenství bývají zvýšené hladiny nikotinu i kotininu (metabolit nikotinu), oxidu uhelnatého vázaného na hemoglobin, olova, polycyklických aromatických uhlovodíků a specifických nitrosaminů. Prenatálně exponovaní

novorozenci mají signifikantně vyšší počet aberantních chromozomů v periferních lymfocytech, které jsou důkazem mutagenních účinků cigaretového kouře (Crha a Hrubá, 2000). Expozice cigaretovému kouři v těhotenství zvyšuje riziko onemocnění těhotné ženy, komplikací v těhotenství, výskytu vrozených vývojových vad plodu, nemocnosti a úmrtnosti dítěte po narození. V pozdějším věku jsou prenatálně exponované děti zvýšeně ohroženy mnohými onemocněními fyzického i psychického charakteru (Hrubá, 2011).

1.7 Vliv kouření na ženy

Kouření ovlivňuje reprodukční systém žen na mnoha úrovních a v literatuře je popisována řada změn a poškození, které kouření způsobuje. U silně kouřících žen (více než 20 cigaret denně) pozorujeme kratší folikulární fázi a častější nepravidelnosti menstruačního cyklu. Tyto změny zvyšují riziko anovulačních cyklů (Windham et al., 1999, Kato et al., 1999).

U kuřáček se setkáváme s nižší úspěšností programu umělého oplodnění. Thomford a Mattison (1986) popisují, že 21,3 % kuřáček zůstává při dosažení menopauzy bezdětných ve srovnání se 14 % pro obecnou populaci. U kuřáček bývá častější absence jakékoliv reakce na hormonální stimulaci, snížená tvorba oocytů po hormonální provokaci, a i významné snížení fertilizačního poměru. Ve folikulární tekutině kuřáček se vyskytuje kotinin – metabolit nikotinu, kadmium a další chemické látky, jejichž důsledkem může být nedostatečný růst folikulů v rámci IVF. Studie, analyzující vliv kouření na výsledek IVF ukázaly, že u kuřáček nacházíme méně zralých oocytů. Pro úspěšný cyklus IVF je potřeba vyšších dávek gonadotropinu a delší doby stimulace.

U kuřáček se častěji setkáváme se sníženou ovariální rezervou vzhledem k věku, se zvýšeným výskytem předčasného ovariálního selhání a dřívějším nástupem menopauzy (Dechanet et al., 2011; Freour et al., 2008; Varvarigou et al., 2006). Antiestrogenní účinek kouření snižuje pozitivní efekt hormonální substituční terapie používané při návalech horka, klimakterickém syndromu a urogenitálních poruchách (Tankó a Christiansen 2004; Tansavatdi et al., 2004).

Kouření zvyšuje riziko mimoděložního těhotenství i spontánního potratu. Nikotin může mít vliv na uterotubární funkce, konkrétně na tonus a amplitudu pohybu projevujícího se jako tubární vlna. Zpomalení transportu oplodněného vajíčka může jednak snížit jeho životnost, jednak umožnit vznik tubárního těhotenství (Hrubá, 2011). Prevalence spontánních potratů v časných stádiích

těhotenství je u kuřáček signifikantně vyšší než u nekuřáček. V souvislosti se spontánními potraty také pozorujeme, že jejich riziko je vyšší u silnějších kuřáček než u kuřáček slabých. Z rozsáhlé metaanalýzy provedené v roce 2014 vyplývá, že kuřáčky mají výrazně vyšší riziko spontánních potratů v I. trimestru. Riziko potratu pak roste s každou vykouřenou cigaretou o 1 %. Těhotné nekuřáčky, které byly vystaveny pasivnímu kouření, měly vyšší riziko spontánního potratu o 11 % oproti nekuřáčkám, které pasivnímu kouření nebyly vystavovány (Pineles et al., 2014).

Placenta praevia a abrupce placenty jsou závažné těhotenské komplikace se zvýšeným rizikem perinatální smrti plodu i ohrožení matky. Kouření během těhotenství je spojeno se zvýšeným rizikem výskytu placenta praevia a abrupce placenty. Riziko placenta praevia bývá u kuřáček zvýšené v průměru o 58 %. Předpokládá se, že ke vzniku této komplikace mohou přispívat různé patologické změny v cévním řečišti, které jsou u kouřících žen častější. Abrupce placenty se vyskytuje u 0,5-4 % těhotenství. U kuřáček se toto riziko zvyšuje zhruba o 62 % (Crha a Hrubá, 2000).

Souvislost mezi kouřením těhotných žen a zvýšením rizika předčasného porodu před 37. týdnem těhotenství popisuje řada studií. Podle longitudinální studie je následkem kouření v těhotenství riziko spontánního předčasného porodu zvýšeno o 23 % a lékařsky indukovaného předčasného porodu o 28 %. Lékařsky indukované předčasné porody přitom často souvisely s některými nežádoucími vlivy kouření v těhotenství (Montgomery et al., 2002). Soneji a Beltrán-Sánchez (2019) popisují, že riziko předčasného porodu klesá, pokud žena přestane během těhotenství kouřit. Čím dříve přestane, tím je riziko předčasného porodu nižší.

Z rozsáhlé metaanalýzy publikované v roce 2018 jednoznačně vyplývá, že se u žen kuřáček častěji setkáváme s problémy jak se zahájením, tak i s pokračováním kojení (Cohen et al., 2018). Studie popisují kratší dobu kojení v důsledku nižší tvorby mateřského mléka, ke které dochází inhibicí produkce prolaktinu způsobenou nikotinem (Crha a Hrubá, 2000).

1.8 Vliv kouření na plod a dítě

U dětí kuřáček se mohou častěji vyskytovat vrozené vývojové vady. Bylo zjištěno vyšší riziko výskytu malformací končetin, vrozených vad srdce, malformací urogenitálního ústrojí a rozštěpů.

Novorozenci žen, které kouřily v průběhu těhotenství, mají v průměru nižší porodní hmotnost než novorozenci žen, které nekouří. Frekvence dětí s nižší porodní hmotností je o 54 % vyšší u slabých kuřáček a až o 130 % vyšší u kuřáček silných, než u nekuřáček (Hrubá, 2011). Zároveň bylo u dětí kuřáček popsáno zvýšené riziko výskytu zlomenin do 1 roku života (Brand et al., 2020).

Riziko syndromu náhlého úmrtí kojence (Sudden Infant Death Syndrome, dále také SIDS) je u dětí kuřáček 2,5–3,5násobně vyšší oproti dětem matek, které v těhotenství nekouřily (Somm et al., 2008). SIDS je definován jako náhlá a vzhledem k předchozímu stavu neočekávaná smrt dítěte ve věku od 1 měsíce do 1 roku, u které se nepodaří ani při pitvě nalézt příčinu úmrtí. Z rozsáhlé studie provedené v Gruzii mezi lety 1997-2000 vychází kouření jako významný rizikový faktor pro zvýšení výskytu SIDS. Autoři této studie zkoumali mnoho proměnných (rasa, věk matky, parita, užívání alkoholu, váhový příbytek matky, prenatální péče, nedonošenost, Apgar skóre, pohlaví a další), které by mohly výsledky modifikovat. Poté se snažili zhodnotit souvislost výskytu SIDS s kouřením v těhotenství. Z výsledků vychází, že u kuřáček se zvyšuje riziko výskytu SIDS na 2,6 na 1000 oproti 0,8 na 1000 u nekuřáček. Ze všech případů SIDS se 61,3 % vyskytuje u žen, které v průběhu těhotenství kouřily, přičemž se odhaduje, že 20,7 % případů SIDS by bylo možné předejít, kdyby ženy během těhotenství nekouřily (Shah et al., 2006).

Kouření žen v průběhu těhotenství může poškodit vývoj dýchacích cest a/nebo měnit elastické vlastnosti plic plodu. Působí také na respirační funkce novorozenců, zvyšuje výskyt akutních a chronických respiračních onemocnění a může souviset s pozdějším rozvojem astmatu. Jednovteřinový expirační objem i funkční reziduální kapacita plic jsou výrazně nižší u kojenců narozených matkám kuřáčkám. Účinky prenatální expozice kouření můžou tedy být důležitým faktorem v pozdějším rozvoji astmatu (Hart et al., 2009). Zvýšení predispozice k akutním respiračním onemocněním je nadále patrné i během dětství. S tím souvisí i častější výskyt zánětu středního ucha jakožto komplikace akutních respiračních infekcí. Děti také vykazují častější nutnost hospitalizace pro akutní zánět dolních cest dýchacích (Kerkhof et al., 2009). Samozřejmě nesmíme zapomínat, že ženy, které kouřily během těhotenství, zpravidla pokračují v kouření i po porodu a vliv expozice pasivního kouření na incidenci respiračních onemocnění dětí nelze opomíjet.

Kouření má významný vliv na tvorbu řady hormonů plodu. U matek kuřáček byly prokázány vyšší hladiny katecholaminů v amniové tekutině (Divers et al., 1981; Wideroe et al., 2003), avšak

v pupečnickové krvi dětí kuřaček jsou popisovány signifikantně nižší hladiny adrenalinu a noradrenalinu. Děti kuřaček mají sníženou reakci katecholaminů na hypoxii a stres během porodu. Toto zpomalení reaktivity adrenergního systému může mít souvislost s třikrát vyšším výskytem náhlého úmrtí kojence u dětí matek kuřaček (Slotkin et al., 1997). Ve dvou studiích bylo kouření matky nalezeno jako nezávislý rizikový faktor kryptorchismu (Lawrence et al., 2008; Mendelsohn et al., 2014).

U dětí exponovaných kouření v jejich prenatálním vývoji se častěji vyskytují poruchy kognitivních funkcí, poruchy chování, pozornosti, hyperaktivita, psychické problémy nebo vyšší vnímavost ke vzniku závislosti. Tyto poruchy mohou přetrvávat do puberty, adolescence a mladé dospělosti. Vyšší výskyt těchto poruch u takto prenatálně exponovaných dětí a dospělých zůstává v epidemiologických studiích i po standardizaci interferujících faktorů. I zde je navíc možné sledovat přímou závislost na množství vykouřených cigaret (Hrubá, 2011). Ukazuje se, že kouření nastávajících matek v těhotenství má nejen časné důsledky pro plod/dítě, ale i řadu pozdních následků, které se mohou projevit až v dospělosti jako důsledek chybného fetálního programování exponovaného jedince nebo individua (Dušková et al., 2014). Zejména změny v tvorbě steroidních hormonů, které mají vedle genomového i neuroaktivní působení, by mohly být jedním ze spojovacích článků mezi vlivem kouření matky v těhotenství a pozdními následky u dětí v rámci širokého spektra poruch chování.

1.9 Pozdní následky kouření na dítě

Kouření matek v těhotenství má negativní vliv nejen na vývoj plodu během těhotenství, ale má i mnoho tzv. pozdních následků, které se mohou projevit jak v dětství, tak i v dospělosti.

V rozsáhlé studii zahrnující více než osm tisíc probandů byly nalezeny vyšší hladiny glykovaného hemoglobinu, triacylglycerolů, vyšší BMI a obvod pasu potomků žen kouřících během těhotenství, dcery měly nižší hladinu HDL, i když celkový cholesterol ke kouření matky vztah neměl. Z těchto nálezů lze predikovat, že dospělí, kteří byli exponováni kouření in utero, mají rizikovější profil pro kardiovaskulární onemocnění (Power et al., 2010).

Ve studii Gunes et al. (2007) byla vyšetřována intimomediální šíře aorty u novorozenců, což je jeden z parametrů kardiovaskulárního rizika. Intimomediální šíře adjustovaná na hmotnost

u novorozenců matek kuřáček je vyšší. To může také hrát roli v patogenezi aterosklerózy v dospělém věku (Hanrahan et al., 1992). Fetální a neonatální expozice nikotinu mění složení a množství perivaskulární tukové tkáně, důsledkem je zhoršená kontraktilní schopnost cév. Vzhledem k tomu, že perivaskulární tuková tkáň obklopuje téměř všechny systémové cévy, je důležitým modulátorem cévní funkce (Gilliland et al., 2000, Gunes et al., 2007). Tyto údaje naznačují, že zvýšený postnatální krevní tlak u jedinců intrauterinně exponovaných nikotinu můžeme alespoň z části přičítat změnám ve funkci perivaskulární tukové tkáně.

Nikotinu exponované potomstvo laboratorních hlodavců mělo větší rozsah infarktu myokardu levé komory srdeční po 25 minutách ischemie. Nesnášenlivost novorozenecké hypoxie může být také přičítána poruchám srdeční funkce po prenatální expozici nikotinu. Nikotinem indukované srdeční dysfunkce mohou souviset se zvýšeným rizikem SIDS u novorozenců matek kuřáček (Tong et al., 2008).

Bylo prokázáno, že u potkanů exponovaných nikotinu v průběhu těhotenství a kojení došlo k endokrinním a metabolickým změnám u dospělého potomstva, které souvisí s narušením metabolismu glukózy a které mohou vést k rozvoji diabetu 2. typu (Hrubá, 2000). Epidemiologické studie o vlivu kouření, stejně jako výsledky studií na modelu na zvířeti, poskytují údaje o vztahu mezi časnou růstovou restrikcí a rozvojem diabetes mellitus 2. typu a metabolickým syndromem. Expozice mateřskému kouření in utero v průběhu těhotenství může zvýšit riziko vzniku diabetu 2. typu a obezity prostřednictvím změny v programování, což může mít za následek celoživotní metabolické poruchy regulace (Okuyemi et al., 2000).

Ženy, které byly vystaveny kouření během svého fetálního života, mohou mít zároveň vyšší riziko vzniku gestačního diabetu a obezity (Mitchell a Milerad, 2006).

Prenatální expozice nikotinu ve zvířecí studii prokázala zvýšení postnatální tělesné hmotnosti a vyšší procento tělesného tuku (Peters a Morgan, 2002; Vaz et al., 2014). Ke zvýšení adipozity a tělesné hmotnosti může docházet prostřednictvím změn v centrální endokrinní regulaci homeostázy tělesné hmotnosti. Signály pro regulaci tělesné hmotnosti a energetickou bilanci jsou nakonec integrovány v hypotalamu, který je pravděpodobně nejdůležitějším centrem pro regulaci chuti k jídlu a homeostázu tělesné hmotnosti (Holloway et al., 2005; Králíková et al., 2005). Poruchy

v regulaci homeostázy vedoucí ke zvýšení chuti k jídlu souvisí se změnami v hypotalamu způsobenými mateřským kouřením.

Kouření během těhotenství zdvojnásobuje riziko astmatu do dvou let věku a je spojováno se snížením plicních funkčních parametrů, jako jsou např. vitální kapacita plic a expirační rezervní objem, u dětí (Gilliland et al., 2001). Riziko rozvoje astmatu zůstává zvýšené až do dospělosti (Glynn et al., 2009).

Změna nastavení hormonální osy plodů kouřících matek má mnoho důsledků i v dospělosti. Studie z posledních let prokázaly negativní vliv kouření matek na reprodukční funkce jejich synů (Lackmann et al., 1999; Soares a Melo, 2008). Porucha ovariální rezervy nebyla u dcer kuřaček v dospělosti prokázána, ale byla u nich nalezena signifikantně menší děloha (Hillebrand et al., 2002).

Nikotin a jeho metabolity byly detekovány v moči novorozenců narozených matkám, které kouřily v průběhu těhotenství (Main et al., 2009). To dokazuje, že karcinogeny obsažené v cigaretovém kouři procházejí placentou. Karcinogeny působí na rychle se dělící buňky plodu a mohou iniciovat a podporovat růst nádoru. Následkem může být vyšší výskyt nádorového onemocnění u těchto dětí jak v dětství (především leukemie, non-Hodkinův lymfom a nádory mozku), tak i v dospělosti (Jedrychowski et al., 1997).

U dětí, jejichž matky kouřily v těhotenství, můžeme sledovat již v předškolním věku poruchy chování. Ty mohou přetrvávat i do puberty, adolescence a mladé dospělosti. U exponovaných dětí se častěji vyskytují kognitivní poruchy (např. snížení vizuální paměti, poruchy chápání řeči, slabší reakce na sluchové stimuly), poruchy chování (antisociální projevy, agresivita, kriminalita), poruchy pozornosti, hyperaktivita, psychické problémy (úzkosti, deprese) nebo vyšší vnímavost ke vzniku závislosti. Vyšší výskyt těchto poruch u prenatálně exponovaných dětí a dospělých zůstává v epidemiologických studiích i po standardizaci interferujících faktorů (socioekonomické, poruchy chování u rodičů, porodní hmotnost, prenatální a postnatální komplikace). V populační studii se ve věku 18 let vyskytovala různá psychiatrická onemocnění u 13,7 % neexponovaných, u 21 % méně exponovaných a u 24,7 % osob silně exponovaných v prenatálním období (Jedrychowski et al., 1997).

1.10 Pasivní kouření

Kouření cigaret je závažným celosvětovým problémem. Vlivu aktivního kouření na zdraví člověka se věnovaly tisíce studií a jeho negativní vlivy jsou obecně dobře známy. Naopak dopady pasivního kouření na lidské zdraví nejsou zcela prozkoumány (Benyu et al., 2018).

Cigaretový kouř je nejen aktivním kuřákem vdechován, ale současně se uvolňuje do jeho okolí. Pasivní kouření je vdechování kouře osobami jinými, než je sám aktivní kuřák. Ve světě se pro pasivní kouření běžně užívá název secondhand smoke („kouř z druhé ruky“) nebo environmental tobacco smoke („kouř z životního prostředí“).

Chemické složení obou směsí je obdobné, ale v cigaretovém kouři vznikajícím na zapáleném konci cigarety jsou koncentrace mnoha chemických škodlivin až několikanásobně vyšší. Výzkumy ukazují, že k poškození zdraví vlivem pasivního kouření nedochází až po dlouholeté expozici, jak se dříve předpokládalo, ale dokonce i po jednorázové krátkodobé epizodě (Jedrychowski et al., 1997).

U těhotných žen vystavených pasivnímu kouření může docházet ke zvýšení výskytu vrozených vývojových vad plodu, zvýšení rizika narození mrtvého plodu, častějšímu předčasnému porodu dítěte před 37. týdnem těhotenství a snížení porodní hmotnosti novorozence (Jedrychowski et al., 1997).

Lidské plody a malé děti, které nejsou fyziologicky zralé, mohou být zvýšeně vnímavé ke škodlivým účinkům expozice pasivnímu kouření (Jedrychowski et al., 1997).

Na druhou stranu existují studie, které negativní vliv pasivního kouření jednoznačně nepotvrzují. Pokud totiž byla provedena objektivizace stanovením koncentrace kotininu v moči, vycházelo, že u žen, u kterých byly přítomny některé z možných negativních vlivů kouření, dosahovaly koncentrace kotininu v moči hodnot odpovídajících aktivnímu kouření (Dušková et al., 2014).

1.11 Vliv kouření na endokrinní systém

Kouření má zásadní vliv na endokrinní systém. Ovlivňuje hypofyzární, tyreoidální, adrenální, testikulární i ovariální funkce, kalciový metabolismus a působení inzulínu (Stárka et al., 2005). Kromě nikotinu mají na hormonální sekreci vliv i další toxiny obsažené v cigaretách, například

thiokyanát, působící na štítnou žlázu. Hlavním význačným klinickým efektem je zvýšené riziko rozvoje Graves Basedowovy toxikózy a endokrinní orbitopatie, osteoporózy a neplodnosti. Zároveň přispívá ke vzniku inzulinové rezistence, a tím ke zvýšení rizika rozvoje diabetes mellitus typu 2 (Hruškovičová et al., 2011).

Řada studií zkoumala akutní vliv vykouření jedné cigarety na hormony hypofýzy. Bylo prokázáno zvýšení plazmatických hladin prolaktinu, adrenokortikotropního hormonu (ACTH), růstového hormonu a vasopresinu, bez výrazných změn thyreotropního (TSH), luteotropního (LH) či folikulostimulačního (FSH) hormonu. Tento efekt je přímo úměrný dávce nikotinu, získané z vykouřené cigarety. (Seyler et al., 1986; Gossain et al., 1986; Wilkins et al., 1982).

Chronické kuřáctví má negativní vliv na sekreci prolaktinu a růstového hormonu (Fuxe et al., 1989; Coleman a Bancroft, 1995; Trummer et al., 2002; Weigert et al., 1999; Salazar et al., 1995). U perimenopauzálních žen byly nalezeny změny v hladinách gonadotropinů. Aktivní i pasivní kouření zvyšovalo FSH, což způsobí zkrácení období perimenopauzy. U mužů jsou výsledky nejednotné. Některé práce popisují neměnné hladiny, jiné zvýšení či snížení LH (Cooper et al., 1995; Velasco et al., 1990; Andersen et al., 1984; Ochedalski et al., 1994).

Akutní i chronické kouření, zvyšuje hladiny kortizolu v plazmě. Hladina kortizolu je přímo úměrná počtu vykouřených cigaret během dne (Kirschbaum et al., 1992). Nikotin ihned aktivuje hypotalamo-hypofyzo-adrenokortikální osu (HPA). Při přerušení kouření dochází nejprve ke vzestupu aktivity HPA osy, pak v závislosti na době nekouření k jejímu poklesu, a nakonec ke strmému snížení hladin kortizolu (Kirschbaum et al., 1992; Frederick et al., 1998).

Kouření vede ke změnám hladin endogenních steroidních hormonů. Ve studiích jsou popisovány vyšší hladiny 17-hydroxyprogesteronu, androstendionu, DHEA a jeho 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. S dřívějším nástupem menopauzy je spojena řada dalších komplikací jako je například osteoporóza

a zvýšené riziko zlomenin, urogenitální atrofie nebo vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění, především aterosklerózy. U kuřáček je popisována vyšší hladina testosteronu v průběhu celého života (Manjer et al., 2005; Sowers et al., 2001; Friedman et al., 1987). Manjer a kol. (2005) navíc popisuje, že ženy kuřáčky mají nejen vyšší hladinu testosteronu ve srovnání s nekuřáčkami, ale že hladina testosteronu stoupá s počtem vykouřených cigaret za den. Dušková a kol. (2012) popisuje vyšší hladinu testosteronu u fertálních žen v obou fázích menstruačního cyklu. U kouřících žen dochází také ke snížení biologické dostupnosti estrogenů (Michnovicz et al., 1986).

Chronické kouření může vyvolat poruchy plodnosti u obou pohlaví. Mužský reprodukční systém je vůči negativnímu vlivu kouření odolnější. V souvislosti s kouřením je nejčastěji popisováno zhoršení spermiogramu (Istvan et al., 1994; Trummer et al., 2002; Patterson et al., 1990; Shaarawy a Mahmoud, 1982). Řada dalších studií se zabývá vlivem na rozvoj erektilní dysfunkce (Natali et al., 2005; Corona et al., 2005). O vlivu kouření na hladiny steroidních hormonů u mužů nepřináší literatura jednotné výsledky, některé studie popisují jeho snížení jiné zvýšení (Jandíková et al., 2017).

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. Ženy, které rodily císařským řezem, jsme dále rozdělili dle toho, zda byl císařský řez plánovaný či akutní. Císařské řezy označujeme jako primární, elektivní, plánované, tj. operace, jejichž indikace vznikla již před nástupem děložní činnosti, a akutní, kde nebylo možné indikaci před nástupem kontrakční činnosti dělohy předpovídat. V současném porodnictví se nejčastěji uplatňují tyto indikace k císařskému řezu: stav po předchozím císařském řezu, hypoxie plodu, dystokie cervikokorporální (někdy nesprávně označovaná jako nepostupující porod), konec pánevní. Tyto indikace byly nejčastější i v případě naší studie. Poměr zastoupení císařských řezů v naší studii odpovídal celorepublikovému průměru, přičemž císařským řezem rodí přibližně 1/4 žen (24,2 % v roce 2019). V naší studii to bylo 38 žen ze 142 (27 %). Přestože na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN v Praze bylo za rok 2020 ukončeno císařským řezem 37,9 % těhotenství, v naší studii rodilo císařským řezem 27 % žen. Do studie byly zařazeny jen zdravé ženy s nízkorizikovým těhotenstvím.

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 jednak 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 hochu. 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 řezy (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-pregnenolone), testosteron, androstendion, 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 NCSS 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 kuřáček a 71 nekuřáček. Všechny ženy byly české národnosti a porodily spontánně. Do studie nebyly zařazeny exkuřáčky ani pasivní kuřáčky. 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-OH-progesteron, kortikosteron, estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3)) byly stanoveny LC-MS/MS postupem popsáným detailně jinde (Sosvorová et al., 2015a; Sosvorová et al., 2015b; Vítka et al., 2015; Vítka 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 novorozených 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

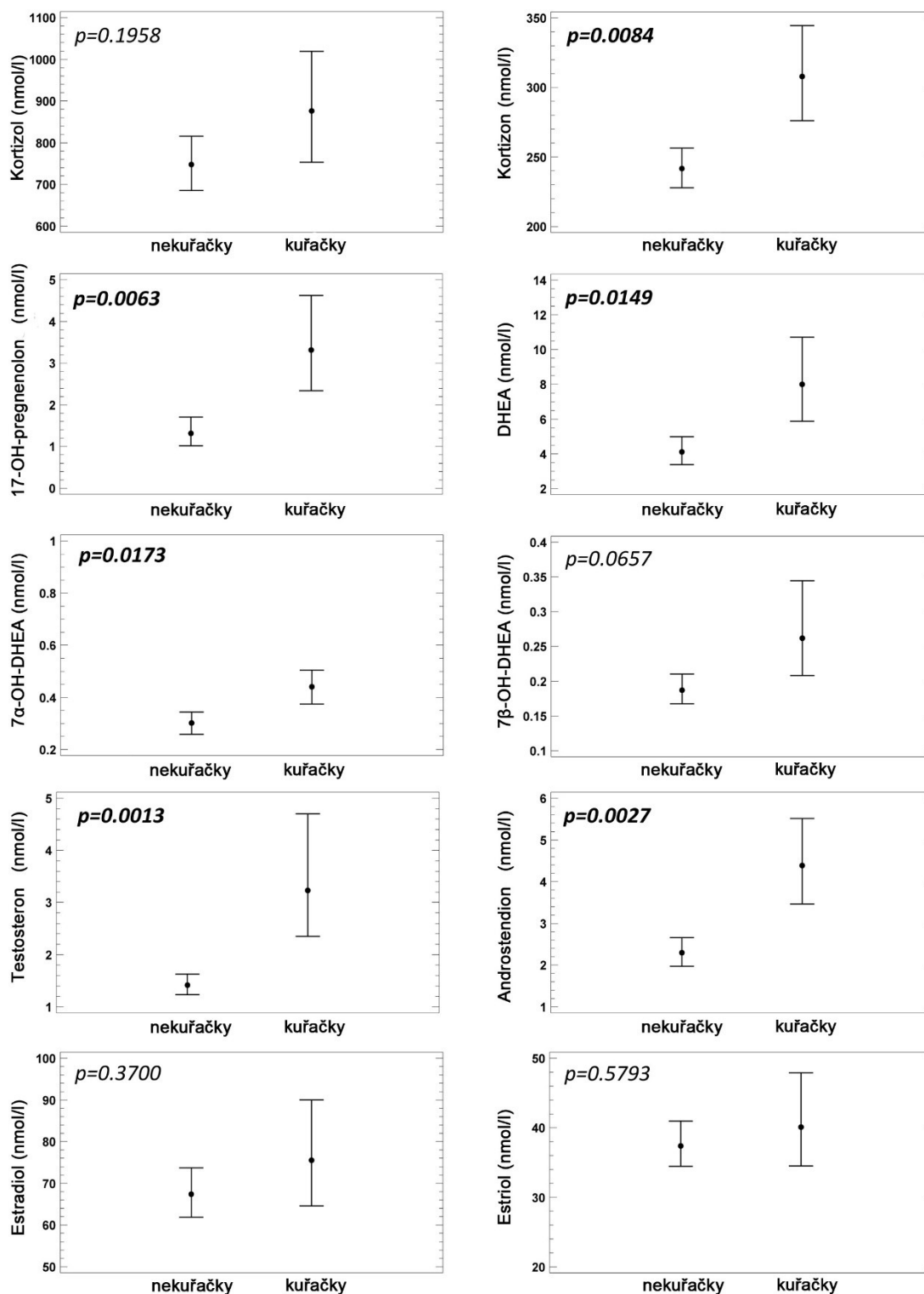
Jak uvádí tabulka 3, kuřačky a nekuřačky se nelišily ve věku. Kuřačky měly vyšší přírůstek tělesné hmotnosti v těhotenství, a to v průměru o 4 kg. Naopak porodní hmotnost dětí matek kuřaček byla nižší, a to v průměru o 300 g. Sledovaný soubor žen jsme rozdělili podle pohlaví novorozence a hormonální 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, 7α -OH-DHEA, 17-OH-pregnenolonu, testosteronu a androstendionu. Ostatní sledované steroidy (kortizol, 7β -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, pregnenolon, progesteron, 17-OH-progesteron, kortikosteron, estron, estradiol a estriol) se u kuřaček a nekuřaček nelišily (obrázek 2).

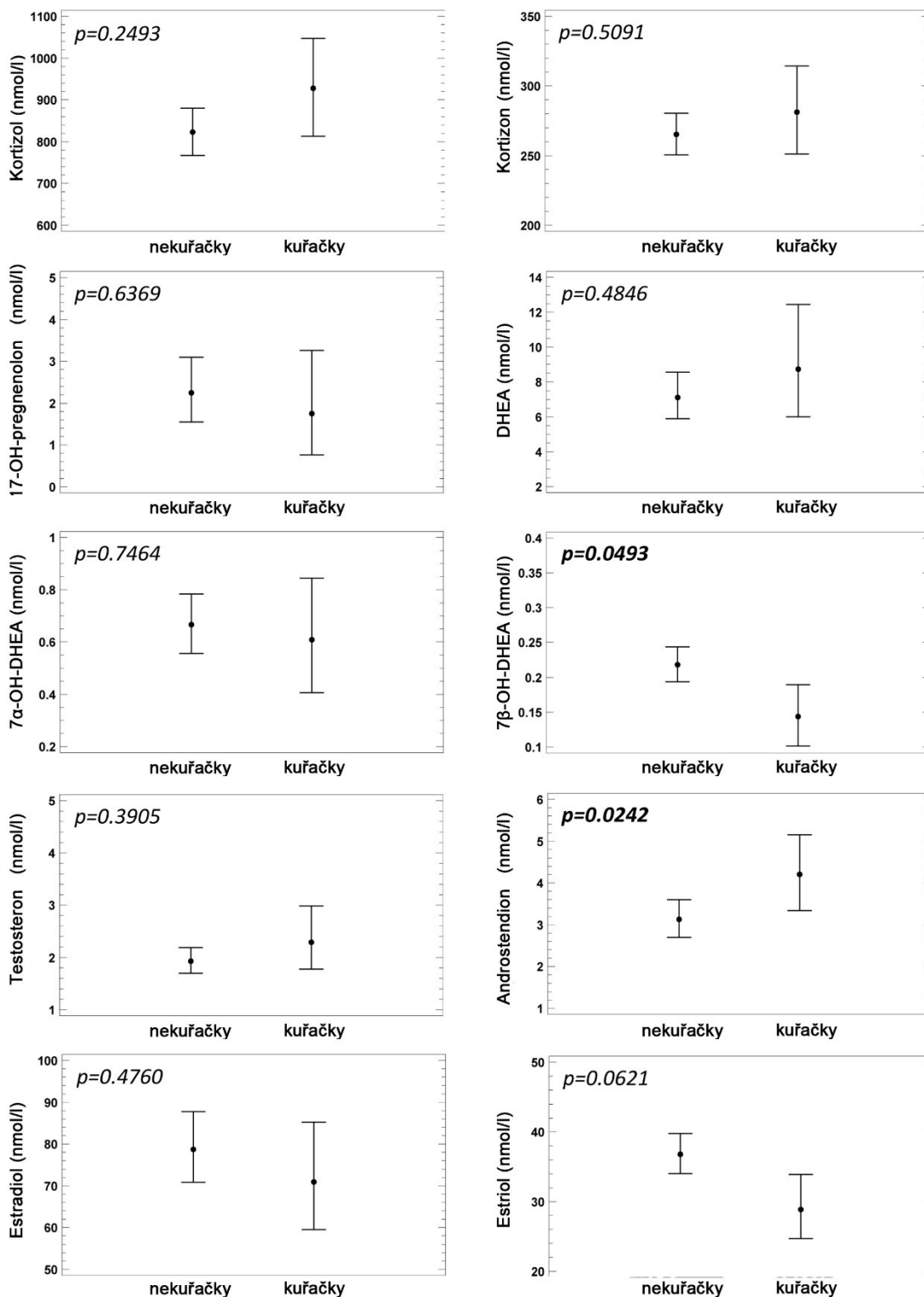
Ve skupině žen, které čekaly děvče, jsme našli u kuřaček ve 37. týdnu těhotenství signifikantně nižší hladiny 7β -OH-DHEA a vyšší hladiny androstendionu. Dále kuřačky měly hraničně nižší E3, výsledek však nebyl statisticky signifikantní. Ostatní sledované steroidy (kortizol, kortizon, DHEA, 7β -OH-DHEA, 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).

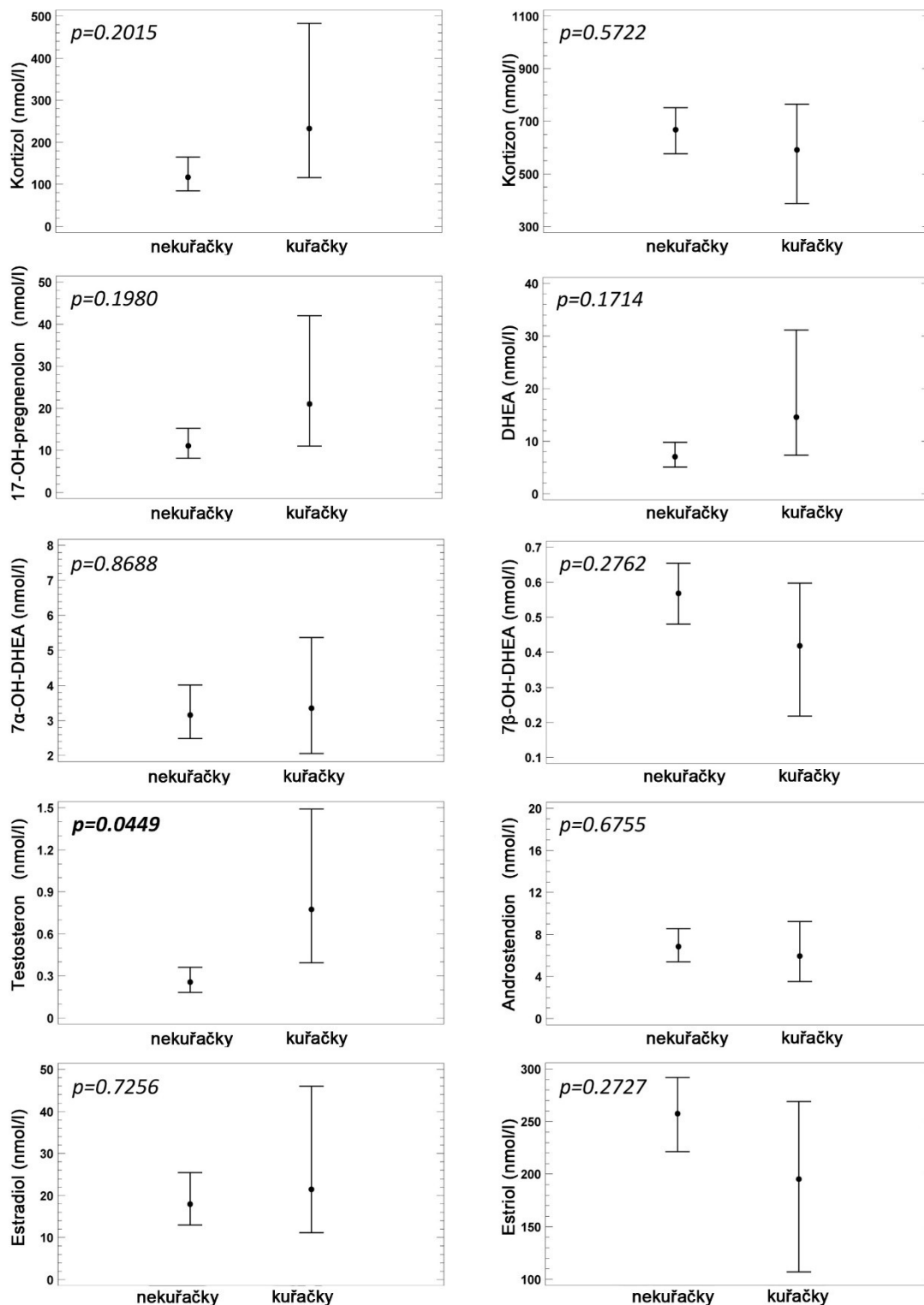
U novorozenech děvčat jsme u potomků kuřaček našli signifikantně nižší 7α -OH-DHEA. V ostatních sledovaných hormonech jsme signifikantní změny neprokázali, pouze u potomků kuřaček byl velký rozptyl hodnot (obrázek 5).



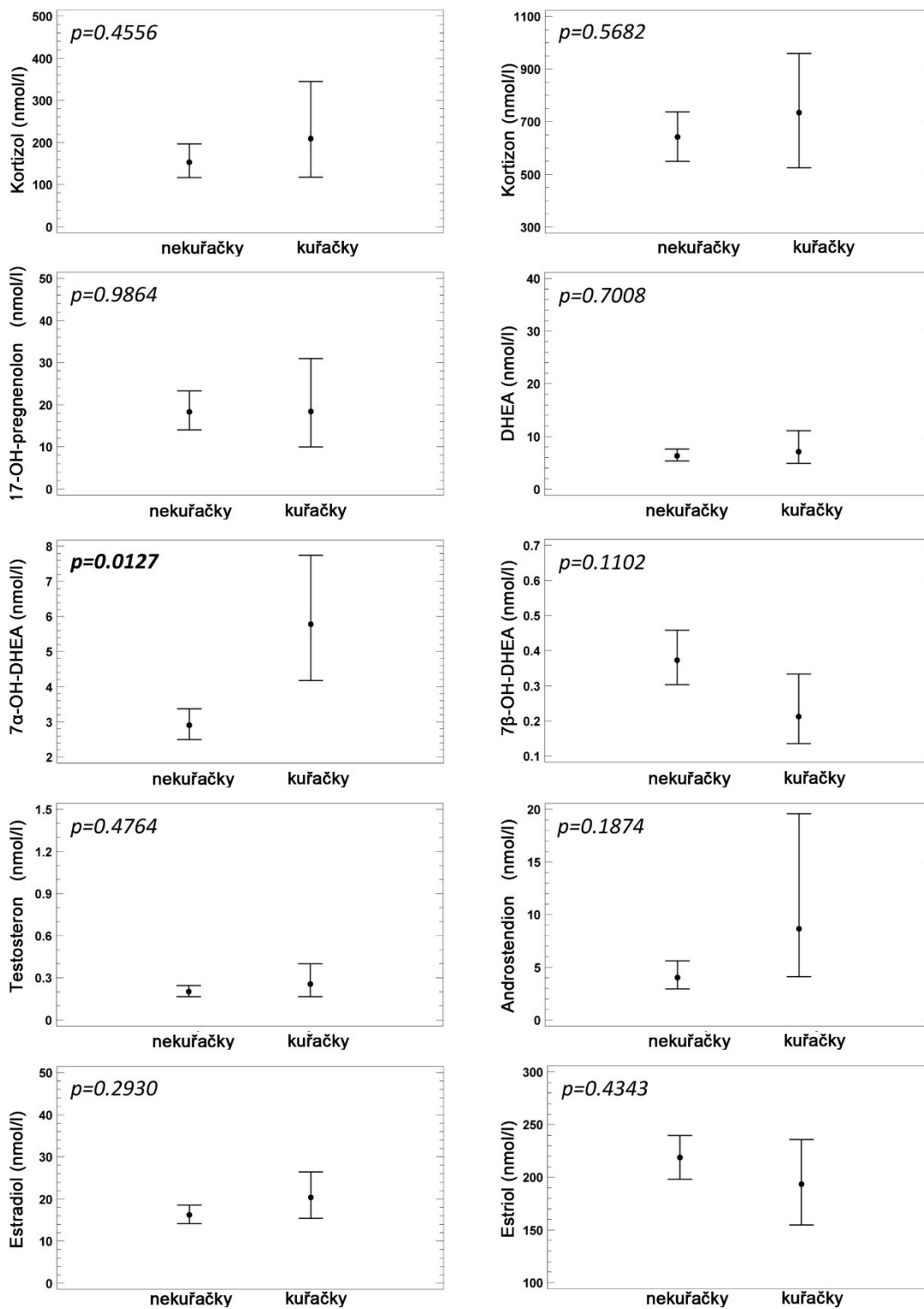
Obrázek 2. Ženy ve 37. týdnu těhotenství, které čekaly hochu. U kuřaček jsme našli signifikantně vyšší hladiny kortizonu, DHEA, 7α-OH-DHEA, 17-OH-pregnenolonu, testosteronu a androstendionu. Ostatní sledované steroidy se nelišily u kuřaček a nekuřaček.



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 7 α -OH-DHEA. V ostatních sledovaných hormonech jsme signifikantní změny neprokázali, pouze u potomků kuřaček byl velký rozptyl hodnot.

5 DISKUZE

5.1 1. část studie

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. V laboratoři Endokrinologického ústavu má sledování steroidních hormonů pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v těhotenství a peripartálním období dlouhou tradici, a to nejen u fyziologických vztahů (Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010b; Hill et al., 2010c; Pašková et al., 2014), ale také v souvislosti k hledání vztahů k patologickým stavům např. poporodní deprese, intrahepatální cholestáza a gestační diabetes mellitus (Pařízek et al., 2014; Pařízek et al., 2015; Pařízek et al., 2016). 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). Je důležité podotknout, že je vždy potřeba přihlédnout k metodě stanovení, nelze porovnávat stanovení steroidů provedené různými metodami (chromatografie/imunoanalýza).

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. Naše výsledky kortizolu nejsou v souladu se studií, která sledovala slinný kortizol v druhé polovině těhotenství, ale je potřeba připomenout, že není úplně možné pozorovat výsledky slinného a plazmatického kortizolu. Vztah slinného kortizolu u matek v druhé polovině těhotenství k pohlaví plodu je popisován jako vyšší u matek, které čekaly hoča do 30. týdne, pak vyšší u matek, které čekaly děvče (DiPietro et al., 2011). U novorozenců jsme rozdíly u steroidů mezi pohlavími neprokázali. Hladiny však nebyly úplně stejné, takže při tvorbě referenčních rozmezí je vhodné je konstituovat odděleně. Zároveň však z druhé strany nenalezené rozdíly opravňují sledovat některé změny bez ohledu na pohlaví plodu, pokud nemá patologie vztah k pohlaví (Adamcová et al., 2018).

Věk matek ve studii nekoreloval s hladinami steroidů. V literatuře jsou v některých studiích popisovány vyšší estrogény (Troisi et al., 2008) a testosteron u mladších matek (Carlsen et al., 2003; Troisi et al., 2008), jedná se však o výsledky z první poloviny těhotenství. Autoři pak spekulují o významu těchto rozdílů ve vztahu k rozvoji např. karcinomu prsu v pozdějším věku. Jsou to zajímavé asociace. Ale je třeba tyto rozdíly ve vztahu k věku matky hodnotit opatrně, protože ve tvorbě steroidů v těhotenství se uplatňuje hlavně placenta a fetální nadledvina plodu, ne až tak matka. Vliv věku matky na steroidní hormony ve 37. týdnu jsme neprokázali (Adamcová et al., 2018).

V literatuře jsou popisovány vztahy vyšších hladin androgenů k novorozencům s růstovou restrikcí (Carlsen et al., 2006). Porodní hmotnost novorozence neměla v naší studii vztah ke hladinám steroidů u matky v těhotenství. Sledovali jsme ale pouze nízkoriziková těhotenství a novorozenci měli normální porodní hmotnost. Stejně jako nárůst tělesné hmotnosti u matek nebyl extrémně malý ani velký, takže jsme vztah k hladinám steroidů neprokázali. Dalším důvodem mohlo být, že nešlo o longitudinální studii (Adamcová et al., 2018).

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).

Mechanismus iniciace porodu je složitý proces, ve kterém klíčovou úlohu hrají právě hormonální změny. I přes řadu pokroků a slibných hypotéz není mechanismus iniciace porodu u člověka znám a poznatky z experimentálních modelů jsou obtížně přenositelné, vzhledem k rozdílům v hormonálním vybavení mezi druhy. Iniciace porodu u lidí tak doposud zůstala neodhalena.

Ve studii jsme našli vyšší hladiny kortizolu a kortikosteronu u spontánních porodů, což je v souladu s literárními daty a předpokladem, že aktivace stresové osy hraje roli v mechanismu iniciace porodu (Ravanos et al., 2015). Na zvířecích modelech byla zjištěna přímá souvislost mezi iniciací porodu a zvýšenou aktivitou hypotalamo-hypofyzární osy plodu. Stimulace produkce

kortizolu ve fetálních nadledvinách pomocí ACTH 1-2 týdny před porodem zvyšuje u zvířat aktivitu některých enzymů v placentě, které přispívají ke změnám v myometriu a v děložním hrdle (Mastorakos a Ilias, 2003; Čech et al., 2006). Každý živočišný druh má však mechanismus iniciace porodu odlišný.

U lidí se ukazuje jako významný CRH, který je označován jako „placentární hodiny“ (McLean et al., 1995). Syntéza CRH v placentě před porodem významně vzrůstá. CRH se uplatňuje v několika oblastech: zvyšuje kontraktilitu myometria na základě snížení syntézy progesteronu a zvýšení exprese oxytocinových receptorů, stimuluje tvorbu prostaglandinů v plodových obalech a v decidue a stimuluje syntézu kortizolu ve fetálních nadledvinách (McLean a Smith, 2001; Vannuccini et al., 2016).

Snížení hladin progesteronu hraje roli při iniciaci porodu u králíků a laboratorních hlodavců, u lidí se spíše hladiny progesteronu nemění, je zvažován změněný poměr estradiolu a progesteronu a změny na receptorové úrovni (Ravanos et al., 2015). Naše výsledky nejsou s tímto v souladu, proto spíše již odráží změny pozdější během porodu a nelze je vztahovat k iniciaci porodu.

Porovnání změn u spontánních porodů a plánovaných císařských řezů by se mohlo zdát jako vhodné ke zkoumání hormonálních změn, které vedou k iniciaci porodu. Bohužel se nelze na tato data dívat tímto způsobem kompletně, i když určitý obraz poskytují. Hlavním úskalím je, že plánované císařské řezy jsou vždy blízko termínu porodu, mezi 39. a 40. týdnem těhotenství, kdy lze předpokládat, že určité změny vedoucí ke spontánnímu porodu již v hormonálním spektru zachytíme a nejsme tak schopni odhadnout, v jaké fázi se odběry krve provádějí. Pro sledování změn vedoucích k iniciaci porodu je nutné longitudinální sledování, které je zakončeno přirozeným porodem. V souladu s tímto tvrzením je i nález hormonálních změn u novorozenců, kde nebyl nalezen rozdíl ve vztahu k typu porodu. Interpretace pouze porovnání hormonálních hladin při plánovaném císařském řezu a spontánním porodu by tak mohla být nepřesná. Se všemi těmito limity naše data podporují teorii, že v mechanismu iniciace porodu a průběhu porodu jsou významné hormonální změny vedoucí k aktivaci stresové osy.

5.2 2. část studie

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 Rhodeho et al. (2013). Z této studie zaměřené na sledování tělesné hmotnosti v průběhu těhotenství (Rode et al. 2013), provedené na 1774 ženách, vyplývá, že u odvykajících kuřáček dochází k většímu nárůstu tělesné hmotnosti v průběhu těhotenství než u nekuřáček, což může mít dva důvody. Za prvé absence samotného nikotinu, který zpomaluje vyprazdňování žaludku, urychluje střevní peristaltiku a zvyšuje bazální metabolismus. Druhým důvodem je, že odvykající člověk místo kouření častěji konzumuje potraviny bohaté na sacharidy a tuky, aby si vynahradil pozitivní pocity spojené s kouřením cigaret. Průměrný váhový přírůstek odvykajících žen byl o 2 kg vyšší než u nekuřáček (Rode et al., 2013). Z našich výsledků vyplývá, že kuřáčky měly přírůstek tělesné hmotnosti vyšší v průměru o 4 kg oproti nekuřáčkám. To může být způsobeno tím, že většina z nich omezila po zjištění těhotenství počet vykouřených cigaret, a to průměrně z 21 na 6 cigaret za den, a mohly tedy pocítit abstinenční příznaky, včetně zvýšené chuti k jídlu.

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. Při uvažování o účinku kouření matky na steroidogenezi plodu a její možné důsledky je nejprve nutné si uvědomit některá specifika tvorby a účinků steroidů v těhotenství.

V těhotenství se až stokrát zvyšuje syntéza estrogenů (E2 a E1), přičemž tvorba E3, hlavního estrogenu v těhotenství, roste ještě mnohem více. E3 se mimo těhotenství v lidském těle prakticky nevyskytuje. Nárůst koncentrací estrogenů kolujících v krvi matky je závislý na funkci fetoplacentární jednotky. Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS) z fetální nadledviny je konvertován 16 α -hydroxylázou ve fetálních játrech na prekurzor pro E3. Krátce po porodu tato aktivita mizí (Speroff and Fritz, 2005). U těhotných žen produkce DHEAS roste, zatímco sérové koncentrace jsou nižší než u fertálních žen mimo těhotenství, pravděpodobně jeho konverzí na estrogenu (Tawaga et al., 2004). Androstendion je androgen, který je prekurzorem pro tvorbu testosteronu a estrogenů (E1 a E2). Enzym 17 β -hydroxysteroidní dehydrogenáza přeměňuje androstendion na testosteron, který je aromatizován na estrogenu. Placentární aromatizace je

dostatečně účinná, aby veškeré androgeny, které se dostanou z plodu do placenty, přeměnila na estrogény. Což je zásadní u dvojčat rozdílného pohlaví, aby ženské plody nebyly ovlivněny androgeny sourozence, nejen při vývoji gonád, ale také aby se u nich nevyvinul mužský typ chování (Kuijper et al., 2015). Právě vývoj mozku a jeho pohlavní diferenciaci je závislá na steroidech produkovaných v gonádách plodu. Klíčová role je tam pak hlavně ochrana mozku plodu proti nadbytku estrogenů, které jsou pro těhotenství typické. Před estrogény chrání vyvíjející se mozek alfa-fetoprotein, který brání průniku estrogenů do nervových buněk. U plodů mužského pohlaví testosteron produkovaný v gonádách plodu prochází do cytoplazmy buněk, kde je aromatázou přeměňován na E2, který se váže na estrogení receptor buněčného jádra a je zodpovědný za vývoj mužského mozku. Tedy v deficitu estrogenů se vyvíjí ženský mozek a pod jejich vlivem mužský mozek (McCarthy, 2008). Což je typické jen pro intrauterinní období jedince. Právě specifické role steroidů v těhotenství je proto nutné zvažovat při hodnocení efektu změn steroidogeneze vyvolaných kouřením. Ovlivnění jen jednoho enzymu či množství steroidu v jednom kompartmentu může mít za následek změny ve všech dalších a ovlivňovat řadu dějů u vyvíjejícího plodu a jeho programování do budoucnosti. Ze změny několika steroidů se dá těžko usuzovat na změny celku, ale je to signál, který nás na ně upozorňuje a přináší informaci pro vysvětlení změn, které jsou u dětí kuřáček popisovány.

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 jejího dítěte.

Změnám estrogenů vlivem kouření v těhotenství se věnuje několik prací. Autoři našli nižší hladiny E2 jak u těhotných kuřáček (Andersen et al. 1984), tak u novorozenců matek kuřáček (Andersen et al. 1984; Varvarigou et al. 2009). V naší studii jsme našli pouze nesignifikantně nižší hladiny E3 u kuřáček 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 E2 u potomků kuřáček. 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 kuřáček (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 u kuřáček v těhotenství a vztahu ke kouření potomků v dospělosti. Zajímavým nálezem je vztah vyšší hladiny testosteronu u matek kuřáček ke kouření jejich dcer. Vyšší hladina testosteronu u kuřáček v těhotenství korelovala s kuřáctvím dcer, na rozdíl od prenatální hladiny kortizolu, která s ním nekorelovala. Hladina testosteronu matek kuřáček 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. Tato studie neprokázala asociaci s kuřáctvím matek ani testosteronu ani kortizolu u mužských potomků. V naší studii jsme neprokázali změny testosteronu u těhotných kuřáček, které očekávaly děvče ani u novorozenech děvčat matek kuřáček. Nalezli jsme pouze velký rozptyl hladin testosteronu, u některých žen byla hladina testosteronu opravdu výrazně zvýšená. U žen kuřáček 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. Prenatální expozice nikotinu u hlodavců také v experimentálním modelu zvyšovala hladinu kortikosteronu přímým působením na kůru nadledvin, což vedlo k významnému zvýšení hladiny testosteronu v perinatálním období (Cross et al., 2017). V naší studii

jsme také našli změny u těhotných kuřáček, které čekaly plody mužského pohlaví. U novorozenců 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).

U kuřáček, které čekaly hochy, jsme proti nekuřáčkám zaznamenali zvýšené hladiny nadledvinových steroidů kortizonu, DHEA, 7 α -OH-DHEA, 17 α -OH-pregnenolonu. Naopak u matek, které čekaly děvče, byl u kuřáček ve srovnání s nekuřáčkami významně snížen 7 β -OH-DHEA nadledvinového původu, který je považován za steroid s výrazným působením na imunitní systém. Také náznak nižší hladiny E3 by byl v souladu s předpokladem, že kouření má nepříznivý účinek na nadledvinovou steroidogenezu, protože E3 vzniká v placentě převážně z produktu fetální nadledviny (Adamcová et al., 2017).

V literatuře je popisováno ovlivnění osy hypotalamus-hypofýza nadledvina u potomků žen, které kouřily v těhotenství. Výsledky studií, které sledovaly ovlivnění kortizolu, jsou však rozporuplné, od nálezu stejných hladin po vyšší. McDonald et al. (2006) sledovali hladiny ACTH a kortizolu v pupečnickové krvi u novorozenců plánovaně narozených císařským řezem. Hladina ACTH u dětí kuřáček byla vyšší, hladiny kortizolu se nelišily. Vyšší hladiny kortizolu u dětí kuřáček byly nalezeny v řadě dalších studií (Lieberman et al., 1992; Varvarigou et al., 2006; Varvarigou et al., 2009). Varvarigou et al. (2006) našli vyšší kortizol jak u dětí kuřáček narozených císařským řezem, tak u dětí narozených spontánně. Hladina kortizolu u dětí kuřáček narozených císařským řezem pozitivně korelovala s množstvím cigaret vykouřených jejich matkami. V naší studii jsme našli ve 37. týdnu těhotenství pouze vyšší hladiny kortizonu u těhotných kuřáček, které čekaly hochy. U novorozenců jsme změny neprokázali. Hladiny kortizolu i kortizonu měly však velký rozptyl, jak u hochů, tak u děvčat, jejichž matky v těhotenství kouřily oproti potomkům nekuřáček (Adamcová et al., 2017). To by ukazovalo na rozdílné ovlivnění steroidů u jednotlivých potomků kuřáček, což by mohlo vysvětlit rozporuplné výsledky nacházené v literatuře.

Zajímavé jsou práce popisující longitudinální sledování změn osy hypotalamus-hypofýza-nadledvina po prenatální expozici kouření. Ve studii Saridjanově et al. (2010) byl u dětí ve věku mezi 12-20 měsíci sledován diurnální profil kortizolu. U dětí kuřáček byla nalezena pozitivní reakce kortizolu na probuzení. Práce Schuetze et al. (2008) sledovala reakci kortizolu na stres

u sedmiměsíčních dětí, která byla vyšší u těch, jejichž matky během těhotenství kouřily. Dále byl nalezen rozdíl v reakci mezi pohlavími. Exponovaní chlapci měli vyšší reakci kortizolu na stres než exponované dívky. Z citovaných prací je patrné, že prenatální expozice kouření by mohla mít vliv na programování osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny potomstva. V naší studii jsme rozdíl mezi pohlavími neprokázali, ani rozdíl v reakci na porodní stres u novorozenců (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 hochy ($p=0.03$), 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 hochy, 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 hochy, 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 hochy, 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 kuřaček 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 kuřačky 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 kuřaček, které čekají hochy, a také u novorozenech 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, 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.
2. 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.
3. 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.
4. Alfaidy N, Li W, Macintosh T, et al. Late gestation increase in 11betahydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88:5033–8.
5. 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.
6. Archer DF, Mathur RS, Wiqvist N, Diczfalusy E. Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit. 2. Synthesis and secretion of steroids and steroid sulphates by the midgestation foetus. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1971; 66:666–78.
7. Bader D, Riskin A, Vafsi O, Tamir A, Peskin B, Israel N, et al. Alphafetoprotein in the early neonatal period—a large study and review of the literature. *Clin Chim Acta*, 2004; 349:15–23.
8. 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.
9. Begeot M, Dubois MP, Dubois PM. Immunologic localization of alpha- and beta-endorphins and beta-lipotropin in corticotropic cells of the normal and anencephalic fetal pituitaries. *Cell Tissue Res*, 1978; 193:413–22.
10. Benyu S, Wen Q, Feng X, Xiaomin W, Qiangdong G, Wenchong J, Shue W, Mengmeng X, Sufang Y. The relation of passive smoking with cervical cancer. *Medicine (Baltimore)*, 2018 Nov; 97(46): e13061.
11. Blanks AM, Brosens JJ. Progesterone action in the myometrium and decidua in preterm birth. *Facts Views Vis Obgyn*, 2012; 4:33–43.

12. Brand JS, Hiyoshi A, Cao Y, Lawlor DA, Cnattingius S, Montgomery S. Maternal smoking during pregnancy and fractures in offspring: national register based sibling comparison study. *BMJ*, 2020; 368; 170-7.
13. Carlsen SM, Jacobsen G, Bjerve KS. Androgen levels in pregnant women decrease with increasing maternal age. *Scand J Clin Lab Invest*, 2003, 63(1):23-6.
14. Carlsen SM, Jacobsen G, Romundsrød P. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth. *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(2):365-70.
15. Carr BR, Simpson ER. De novo synthesis of cholesterol by the human fetal adrenal gland. *Endocrinology*, 1981; 108: 2154–62.
16. Carr BR, Simpson ER. Cholesterol synthesis in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982; 55:447–52.
17. Cohen SH, Alexander DD, Krebs NF, Young BE, Cabana MD, Erdmann P, Hays NP, Bezold CP, Levin-Sparenberg E, Turini M, Saavedra JM. Factors Associated with Breastfeeding Initiation and Continuation: A Meta-Analysis. *J Pediatr*, 2018 Dec; 203: 190-196.
18. Coleman DT, Bancroft C. Nicotine acts directly on pituitary GH3 cells to inhibit prolactin promoter activity. *J Neuroendocrinol*, 1995,7(10):785-9.
19. Cooper GS, Baird DD, Hulka BS, Weinberg CR, Savitz DA, Hughes CL Jr. Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol*, 1995, 85(3):407-11.
20. Corona G, Mannucci E, Petrone L, Ricca V, Mansani R, Cilotti A, Balercia B, Chiarini V, Giommi R, Forti G, Maggi M. Psychobiological correlates of smoking in patients with erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 2005, 17, 527–534.
21. Crha I, Hrubá D. Kouření a reprodukce. 1. vyd., Brno: Masarykova univerzita, 2000, 54 s., ISBN 80-210-2284-1.
22. 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.
23. Čech E, Hájek Z, Maršál K, Šrp B. *Porodnictví*, Praha, 124-125, ISBN 80-247-1313-9, 2006.
24. De Hertogh R, Thomas K, Hoet JJ, Vanderheyden I. Plasma concentrations of unconjugated estrone, estradiol-17beta and estriol, and HCS throughout pregnancy in diabetics and gestational diabetics. *Diabetologia*, 1976; 12:455–61.

25. Di Pietro JA, Costigan KA, Kivlinghan KT, Chen P, Laudenslager ML. Maternal salivary cortisol differs by fetal sex during the second half of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, 2011, 36(4):588-91.
26. Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, Hedon B, Dechaud H. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update*, 2011, 17: 76-95.
27. 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.
28. Divers WA Jr, Wilkes MM, Babaknia A, Yen SS. Maternal smoking and elevation of catecholamines and metabolites in the amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 1981, 141(6), 625–628.
29. Dušková M, Hruškovičová H, Šimůnková K, Stárka L, Pařízek A. The effects of smoking on steroid metabolism and fetal programming. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 139, 138–143.
30. 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.
31. Dušková M, Kolátorová L, Šimková M, Šrámková M, Horáčková L, Vítků J, Stárka L. Steroid diagnostics of 21st century in the light of their new roles and analytical tools. *Physiol Res*, 69(Suppl 2), 2020; 193-203.
32. 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.
33. Emanuel RL, Robinson BG, Seely EW, et al. Corticotrophin releasing hormone levels in human plasma and amniotic fluid during gestation. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1994; 40:257–62.
34. Fluck CE, Pandey AV. Steroidogenesis of the testis—new genes and pathways. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2014; 75:40–7.
35. Frederick SL, Reus VI, Ginsberg D, Hall SM, Munoz RF, Ellman G. Cortisol and response to dexamethasone as predictors of withdrawal distress and abstinence success in smokers. *Biol Psychiatry*, 1998, 43(7):525-30.

36. Freour T, Masson D, Mirallie S, Jean M, Bach K, Dejoie T, Barriere P. Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16: 96-102.
37. Friedman AJ, Ravnikar VA, Barbieri RL. Serum steroid hormone profiles in postmenopausal smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*, 1987, 47(3):398-401.
38. Fuxe K, Andersson K, Eneroth P, Härfstrand A, Agnati LF. Neuroendocrine actions of nicotine and of exposure to cigarette smoke: medical implications. *Psychoneuroendocrinology*, 1989,14(1-2):19-41.
39. Gilliland FD, Berhane K, McConnell R. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. *Thorax*, 2000, 55, 271–276.
40. Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163, 429–436.
41. Glynn DA, Cryan JF, Kent P. Update on smoking cessation therapies. *Adv Ther*, 2009, 26, 369–382.
42. Gossain VV, Sherma NK, Srivastava L, Michelakis AM, Rovner DR. Hormonal effects of smoking--II: Effects on plasma cortisol, growth hormone, and prolactin. *Am J Med Sci*, 1986, 291(5):325-7.
43. Goto M, Brickwood S, Wilson DI, Wood PJ, Mason JI, Hanley NA. Steroidogenic enzyme expression within the adrenal cortex during early human gestation. *Endocr Res*, 2002; 28:641–5.
44. Guichard A, de Ikonoff LK, Cedard L. [Delta 5–3 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity in the human full term placenta after culture: the effect of chorionic gonatropin]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 1975; 280:1481–4.
45. Gunes T, Koklu E, Yikilmaz A et al. Influence of maternal smoking on neonatal aortic intima-media thickness, serum IGF-I and IGFBP-3 levels. *Eur J Pediatr*, 2007 Jan 4, 166(10), 1039–1044.
46. Hanrahan JP, Tager IB, Segal MR. The effect of maternal smoking during pregnancy on early infant lung function. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145(5), 1129–1135.
47. Hart R, Sloboda DM, Doherty DA et al. Prenatal determinants of uterine volume and ovarian reserve in adolescence. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(12), 4931–4937.

48. Hautanen A, Adlercreutz H. Hyperinsulinaemia, dyslipidaemia and exaggerated adrenal androgen response to adrenocorticotropin in male smokers. *Diabetologia*, 1993,36(12):1275-81.
49. Heussner K, Ruebner M, Huebner H, Rascher W, Menedez-Castro C, Hartner A, Fahlbusch FB, Rauh M. Species differences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 function in human and rat term placenta determined via LC-MS/MS. *Placenta*. 2016, 37:79-84.
50. Hill M, Pařízek A, Jirásek JE, Jirkovská M, Velíková M, Dušková M, Klímková M, Pašková A, Žižka Z, Germanová A, Koucký M, Kalousová M, Stárka L. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res*, 2010a, 59: 211-224.
51. Hill M, Pařízek A, Kancheva R, Dušková M, Velíková M, Kříž L, Klímková M, Pašková A, Žižka Z, Matucha P, Meloun M, Stárka L. Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010b, 121: 594-610.
52. Hill M, Pařízek A, Velíková M, Kubátová J, Kancheva R, Dušková M, Šimůnková K, Klímková M, Pašková A, Žižka Z, Jirásek JE, Jirkovská M, Stárka L. The distribution of placental oxidoreductase isoforms provides different milieus of steroids influencing pregnancy in the maternal and fetal compartment. *Horm Mol Biol Clin Invest*, 2010c, 4(3): 581–600.
53. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, foodintake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 2002, 23, 2283–2306.
54. Holloway AC, Lim GE, Petrik JJ et al. Fetal and neonatal exposure to nicotine in Wistar rats results in increased beta cell apoptosis at birth and postnatal endocrine and metabolic changes associated with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2005, 48, 2661–2666.
55. Hrubá D. Kouření a reprodukce, 2004, <http://www.med.muni.cz/prelek/zdravi/clanky/hruba/repro.html>.
56. Hrubá D. Riziko kouření v těhotenství se stále podceňuje. Tolerovat kouření v těhotenství je neodborné a neetické. *Prak Gynek*, 2011, 15(1), 34–39.
57. Hruškovičová H, Bičíková M, Vondra K., Stárka L., Dušková M. Vztah neuroaktivních steroidů a vybraných závislostí, *DMEV*, 2011, 14, 4:217-224.
58. 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.

59. Istvan JA, Buist AS, Hess DL, Voelker H. Relationship of smoking cessation and nicotine gum use to salivary androstenedione and testosterone in middle-aged men. *Metabolism*, 1994, 44: 90-95.
60. 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.
61. Jedrychowski W, Flak E. Maternal smoking during pregnancy and postnatal exposure to environmental tobacco smoke as predisposition factors to acute respiratory infections. *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105(3), 302–306.
62. 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.
63. Kato I, Toniolo P, Koenig KL, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, Riboli E. Epidemiologic correlates with menstrual cycle length in middle aged women. *Eur J Epidemiol*, 1999, 15: 809-814.
64. Kerkhof GF, Leunissen RW, Willemsen RH et al. Influence of preterm birth and birth size on gonadal function in young men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(11), 4243–4250.
65. Kirschbaum C, Wüst S, Strasburger CJ. 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sci*. 1992,50(6):435-42.
66. Klak J, Hill M, Parizek A, Havlikova H, Bicikova M, Hampl R, Fait T, Sulcova J, Pouzar V, Kancheva R, Starka L. Pregnanolone isomers, pregnenolone and their polar conjugates around parturition. *Physiol Res*, 2003; 52:211–21.
67. Králíková E, Bajerová J, Raslová N et al. Smoking and pregnancy: prevalence, knowledge, anthropometry, risk communication. *PMR*, 2005, 106(2), 195–200.
68. 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.
69. 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.
70. Lackmann GM, Salzberger U, Tollner U et al. Metabolites of a tobacco-specific carcinogen in urine from newborns. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91, 459–465.

71. Lawrence J, Xiao D, Xue Q et al. Prenatal nicotine exposure increases heart susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult offspring. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324, 331–341.
72. Lieberman E, Torday J, Barbieri R, Cohen A, Van Vunakis H, Weiss ST. Association of intrauterine cigarette smoke exposure with indices of fetal lung maturation. *Obstet Gynecol*, 1992 Apr; 79(4):564-70.
73. Linton EA, Woodman JR, Asboth G, et al. Corticotrophin releasing hormone: its potential for a role in human myometrium. *Exp Physiol*, 2001; 86:273–81.
74. Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Cryptorchidism as part of the testicular dysgenesis syndrome: the environmental connection. *Endocr Dev*, 2009, 14, 167–173.
75. 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.
76. Mastorakos G, Ilias I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 997:136-49.
77. McCarthy M. Estradiol and developing brain. *Physiol Rev*, 2008, 88: 91-134.
78. McDonald SD, Walker M, Perkins SL, Beyene J, Murphy K, Gibb W, Ohlsson A. The effect of tobacco exposure on the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. , *BJOG*, 2006 Nov; 113(11):1289-95.
79. McLean M, Bisits A, Davies J, et al. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med*, 1995; 1:460–3.
80. McLean M, Smith R. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction*. 121(4):493-501, 2001.
81. Meeker CI, DeCesaris V, Tulp O. Metabolism of 7-3 H-pregnenolone in normal human placenta maintained in organ culture. *Am J Obstet Gynecol*, 1971; 111:840–5.
82. Mendelsohn C, Gould G, Oncken C. Management of smoking in pregnant women. *Austr Fam Physician*, 2014, 43, 46–51.
83. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* 2009; 23:947–54
84. Mesiano S, Wang Y, Norwitz ER. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci*, 2011; 18:6–19.

85. 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.
86. Mitchell EA, Milerad J. Smoking and the sudden infant death syndrome. *Rev Environ Health*, 2006, 21, 81–103.
87. Montgomery SM, Ekbom A. Smoking during pregnancy and diabetes mellitus in a British longitudinal birth cohort. *BMJ*, 2002, 324–326.
88. 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.
89. Natali A, Mondaini N, Lombardi G, Del Popolo G, Rizzo M. Heavy smoking is an important risk factor for erectile dysfunction in young men. *Int J Impot Res*, 2005 May-Jun,17(3):227-30.
90. Nechanská B, Mravčík V, Sopko B, Velebil P. Rodičky užívající alkohol, tabák a nelegální drogy. *Ces Gynek*, 2012, 77(5), 457–469.
91. Nodwell A, Carmichael L, Fraser M, et al. Placental release of corticotrophin-releasing hormone across the umbilical circulation of the human newborn. *Placenta*, 1999; 20:197–202.
92. Ochedalski T, Lachowicz-Ochedalska A, Dec W, Czechowski B. Examining the effects of tobacco smoking on levels of certain hormones in serum of young men. *Ginekol Pol*, 1994, 65(2):87-93.
93. Okuyemi KS, Ahluwalia JS, Harris KJ. Pharmacotherapy of smoking cessation. *Arch Fam Med*, 2000, 9, 270–281.
94. Pařízek A, Mikešová M, Jiráček 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*. 63 Suppl 2, 2014: 277-282.
95. Pařízek A, Dušková M, Vitek 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: 203-210.
96. Pařízek A, Hill M, Dušková M, Vitek L, Velíková M, Kancheva K, 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 11(8): e0159203.

97. 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.
98. 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.
99. Pasqualini JR, Kincl FA, editors. *Hormones and the fetus*, vol. 1. Oxford: Pergamon Press, 1985:73–172.
100. Pasqualini JR. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005; 97:401–15.
101. Patterson TR, Stringham JD, Meikle AW. Nicotine and cotinine inhibit steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Life Sci*, 1990, 46(4):265-72.
102. Peters MJ, Morgan LC. The pharmacotherapy of smoking cessation. *Med J Aust*, 2002, 176, 486–490.
103. Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003; 87:181–9
104. Pineles BL, Park E, Samet JM. Systematic Review and Meta-Analysis of Miscarriage and Maternal Exposure to Tobacco Smoke During Pregnancy. *Am J Epidemiol*, 2014 Apr 1; 179(7): 807–823.
105. Power C, Atherton K, Thomas C. Maternal smoking in pregnancy, adult adiposity and other risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2010 Aug; 643-648.
106. 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.
107. 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.
108. Ravanos K, Dagklis T, Petousis S, Margioulas-Siarkou Ch, Prapas Y, Prapas N. Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review, *Gynecol Endocrinol*, 2015;31(9):679-83.
109. 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.

110. Salazar G, Phil M, Albala C, Yáñez M, Serón-Ferré M, Vio F. Smoking effects on prolactin at the end of pregnancy. *Nutrition Research*, 1995,15(11): 1599-1604.
111. 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.
112. Saridjan NS, Huizink AC, Koetsier JA, Jaddoe VW, Mackenbach JP, Hofman A, Kirschbaum C, Verhulst FC, Tiemeier H. Do social disadvantage and early family adversity affect the diurnal cortisol rhythm in infants? The Generation R Study. *Horm Behav*. 2010 Feb; 57(2):247-54.
113. Schuetze P, Lopez FA, Granger DA, Eiden RD. The association between prenatal exposure to cigarettes and cortisol reactivity and regulation in 7-month-old infants. *Dev Psychobiol*, 2008 Dec; 50(8):819-34.
114. Shaarawy M, Mahmoud KZ. Endocrine profile and semen characteristics in male smokers. *Fertil Steril*, 1982 Aug,38(2):255-7.
115. Seyler LE Jr, Pomerleau OF, Fertig JB, Hunt D, Parker K. Pituitary hormone response to cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav*, 1986,24(1):159-62
116. Shah T, Sullivan K, Carter J. Sudden infant death syndrome and reported maternal smoking during pregnancy. *Am J Public Health*, 2006 October, 96 (10), 1757-1759.
117. Slotkin TA, Saleh JL, McCook EC, Seidler FJ. Impaired cardiac function during postnatal hypoxia in rats exposed to nicotine prenatally: implications for perinatal morbidity and mortality, and for sudden infant death syndrome. *Teratology*, 1997, 55, 177–184.
118. 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.
119. Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and IVF. *Obstet Gynec*, 2008, 3(4), 555–563.
120. Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM et al. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology*, 2008, 149, 6289–6299.
121. Soneji S, Beltrán-Sánchez H. Association of Maternal Cigarette Smoking and Smoking Cessation With Preterm Birth. *JAMA Netw Open.*, 2019, Apr; 2(4): e192514.
122. 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.

123. 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.
124. 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.
125. Speroff, L. and Fritz, M. (2005) *The clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
126. Stárka L., Hill M., Králíková E. Kouření a endokrinní systém. *DMEV*, 2005 8: 180-186.
127. Strauss JF, Barbieri RB. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. 5th Edition, 2004, 340.
128. 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.
129. Sun K, Brockman D, Campos B, et al. Induction of surfactant protein A expression by cortisol facilitates prostaglandin synthesis in human chorionic trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91: 4988–94.
130. Šimůnková K, Marek J. CBG - nejen transportní protein. *DMEV*, 2012; 15: 251-257.
131. Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N. Serum concentrations of androstenediol and androstenediol sulfate, and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Steroids*, 2004 Sep; 69(10):675-80.
132. Tankó LB, Christiansen C. An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners. *Menopause* 11: 104-109, 2004.
133. Tansavatdi K, McClain B, Herrington DM. The effects of smoking on estradiol metabolism. *Minerva Ginecol* 56: 105-114, 2004.
134. Thomford PJ, Mattioson DR. The effect of cigarette smoking on female reproduction. *J Ark Med Soc*, 1986, 82: 597-604.
135. Tong VT, England LJ, Dietz PM, Asare LA. Smoking patterns and use of cessation interventions during pregnancy. *Am J Prev Med*, 2008, 35, 327–333.
136. Troisi R, Hoover RN, Thadhani R, Hsieh CC, Sluss P, Ballard-Barbash R, Potischman N. Maternal, prenatal and perinatal characteristics and first trimester maternal serum hormone concentrations. *Br J Cancer*. 2008, 99(7):1161-4.

137. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod*, 2002, 17(6):1554-9.
138. Vannuccini S, Bocchi C, Severi FM, Challis JR, Petralgia F. Endocrinology of human parturition. *Ann Endocrinol*, 2016, Jun, 77 (2): 105-13.
139. 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.
140. Varvarigou AA, Petsali M, Vassilakos P, Beratis NG. Increased cortisol concentrations in the cord blood of newborns whose mothers smoked during pregnancy. *J Perinat Med*, 2006, 34(6), 466–470.
141. Vaz LR, Leonardi-Bee J, Aveyard P et al. Factors associated with smoking cessation in early and late pregnancy in the smoking, nicotine, and pregnancy trial: A Trial of Nicotine Replacement Therapy. *Nicotine Tob Res*, 2014, 16(4), 381–389.
142. Velasco E, Malacara JM, Cervantes F, de León JD, Dávalos G, Castillo J. Gonadotropins and prolactin serum levels during the perimenopausal period: correlation with diverse factors. *Fertil Steril*, 1990 ,53(1):56-60
143. 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.
144. 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.
145. Voutilainen R, Miller WL. Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450c17 (17 α hydroxylase/17,20 lyase) and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986; 63:1145–50.
146. Waddell BJ. The placenta as hypothalamus and pituitary. Possible impact on maternal and fetal adrenal function. *Reprod Fertil*, 1993 Dec, 5:479.
147. Weigert M, Hofstetter G, Kaipf D, Gottlich H, Krischker U, Bichler K, Poehl M, Feichtinger W. The effect of smoking on oocyte quality and hormonal parameters of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*, 1999,16(6):287-93.

148. Wideroe M, Vik T, Jacobsen G, Bakketeig LS. Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2003, 17, 171–179.
149. Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E, Jarvik ME. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, 1982,78(4):305-8.
150. Windham GC, Elkin EP, Swan SH, Waller KO, Fenster L. Cigarette smoking and effects on menstrual function. *Obstet Gynecol*, 1999, 93: 59-65.

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam publikovaných článků a abstrakt

9.1.1 *Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace*

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 0.30.

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.

9.1.2 *Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace*

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

9.1.3 *Abstrakta přednášek/posterů se vztahem k tématu disertace*

Adamcová K. 8.konference nemocničních gynekologů a porodníků, 2018. Poster. Změny steroidogeneze plodu vyvolané kouřením matky.

Šrámková M, Kolátorová L, Chlupáčová T, Jandíková H, Pařízek A, **Adamcová K**, Stárka L, Dušková M. Poster. 18th International Congress of Endocrinology and 53rd SEMDSA Congress, 2018. Changes to fetal steroidogenesis caused by maternal smoking.

Šrámková M, Kolátorová L, Chlupáčová T, Jandíková H, Pařízek A, **Adamcová K**, Stárka L, Dušková M. Ústní sdělení. EYES Porto 2017: 5rd European young endocrine scientists' society meeting. Changes to fetal steroidogenesis caused by maternal smoking.

9.1.4 Publikace v časopisech s IF bez vztahu k tématu disertace

Fartáková Z, Šimják P, Vitek 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, Vavrous 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, Vitek 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, Vitek 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, Hruškoviceová H, Stárka L, Dušková M, Pařízek A. The role of steroids in the development of postpartum 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, Velíkova 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, 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, 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.

9.1.5 Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace

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

9.2 Přílohy

9.2.1 Informovaný souhlas

Informovaný souhlas těhotné

Název a popis studie:

Změny steroidogeneze plodu vyvolané kouřením matky

Jméno těhotné:

Datum narození:

Odpovědný lékař:

1. Já, níže podepsaná souhlasím s mou účastí ve studii. Je mi více než 18 let.
2. Byla jsem podrobně informována o cíli studie, o jejích postupech, a o tom, co se ode mě očekává. Lékař pověřený prováděním studie mi vysvětlil očekávané přínosy a případná zdravotní rizika, která by se mohla vyskytnout během mé účasti ve studii, a vysvětlil mi, jak bude postupovat při výskytu jejího nežádoucího průběhu. Beru na vědomí, že prováděná studie je výzkumnou činností. Pokud je studie randomizovaná, beru na vědomí pravděpodobnost náhodného zařazení do jednotlivých skupin lišících se léčbou.
3. Informovala jsem lékaře pověřeného studií o všech lécích, které jsem užívala v posledních 28 dnech, i o těch, které v současnosti užívám.
4. Budu při své léčbě se svým lékařem spolupracovat a v případě výskytu jakéhokoliv neobvyklého nebo nečekaného příznaku ho budu ihned informovat.
5. Porozuměla jsem tomu, že svou účast ve studii mohu kdykoliv přerušit či odstoupit, aniž by to jakkoliv ovlivnilo průběh mého dalšího léčení. Moje účast ve studii je dobrovolná.
6. Při zařazení do studie budou moje osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti dle platných zákonů ČR. Do mé původní zdravotní dokumentace budou moci na základě mého uděleného souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci sponzora či nezávislých etických komisí. Pro tyto případy je zaručena ochrana důvěrnosti mých osobních dat. Při vlastním provádění studie mohou být osobní údaje poskytnuty jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to je data pod číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být moje osobní údaje poskytnuty pouze pod číselným kódem nebo s mým výslovným souhlasem.
7. S moji účastí ve studii není spojeno poskytnutí žádné odměny.
8. Porozuměla jsem tomu, že mé jméno se nebude nikdy vyskytovat v referátech o této studii. Já naopak nebudu proti použití výsledků z této studie.

Podpis těhotné:

Podpis lékaře pověřeného touto studií:

Datum:

Datum:

9.2.2 Dotazník pro pacientku

Anamnestický dotazník

Vyplnění dotazníku by Vám nemělo zabrat více než 10-15 minut. Moc Vám děkujeme za Váš zájem a čas.

1. Kolik Vám je let?
2. Kolik jste vážila před těhotenstvím?
nyní?
3. Kolik měříte do výšky?
4. V kolikátém týdnu těhotenství momentálně jste?
5. Toto těhotenství je Vaše (prosím zaškrtněte jednu z možností)
první
druhé
třetí
.....
6. Měla jste v I. trimestru provedený screening?
Ano
Ne
7. Dělal se u Vás odběr plodové vody/choriových klků?
Ano
Ne
8. Měla jste provedený test na těhotenskou cukrovku?
Ano
Ne
9. Byl výsledek v pořádku?
Ano
Ne

10. Léčíte se s vysokým krevním tlakem?

Ano

Ne

11. Léčíte se se štítnou žlázou?

Ano

Ne

12. Měla jste v těhotenství nějaké jiné komplikace? Krvácení, dráždivá děloha, hrozící předčasný porod...

.....(prosím vypište)

13. Užíváte nějaké léky nebo doplňky stravy / vitamíny pro těhotné?

Anojaké?(prosím vypište)

Ne

14. Byly všechny ultrazvuky v těhotenství v pořádku?

Ano

Ne

15. Vaše nejvyšší dosažené vzdělání? (prosím zaškrtněte jednu z možností)

základní

střední bez maturity

střední s maturitou

vyšší odborné

vysokoškolské

16. Váš čistý měsíční příjem v době před těhotenstvím byl (prosím zaškrtněte jednu z možností)

10 000 Kč a méně

10 000-25 000 Kč

25 000 Kč a více

17. Momentálně kouříte? (prosím zaškrtněte jednu z možností a vyplňte její podotázky)

nekouřím a nikdy jsem nekouřila

- Nekouříte-li, jste vystavena pasivnímu kouření?

ano, v práci

ano, doma

ne

přestala jsem kouřit před otěhotněním nebo po zjištění těhotenství

- pokud jste přestala kouřit před těhotenstvím, napište prosím kdy (jak dlouho před těhotenstvím jste přestala kouřit)
- pokud jste přestala kouřit po zjištění těhotenství, napište prosím kdy

omezila jsem počet cigaret, které vykouřím za den

- napište prosím počet cigaret, které jste vykouřila za den před těhotenstvím
- napište prosím počet cigaret, které vykouříte za den nyní

kouřím stejně jako před těhotenstvím

- napište prosím počet cigaret, které vykouříte za den

18. Kolik let kouříte či jste kouřila?

19. Jsou Vaši rodiče kuřáci?

Ano

Ne

20. Je Váš parter kuřák?

Ano

Ne

21. Pokud jste přestala kouřit, jste vystavována pasivnímu kouření (doma, v práci apod.)?

Ano

Ne

22. Pokoušela jste se někdy s kouřením přestat?

ano, kolikrát.....

ne

23. Odkud získáváte informace o kouření v těhotenství? (prosím zaškrtněte max. 4 z nabízených možností)

od svého gynekologa
od jiného lékaře, jakého

- z webových diskuzí
- z internetových medií
- z tištěných medií
- z televize, rádia

v předporodních kurzech
od přátel, známých a rodiny
odjinud

informace o kouření v těhotenství nevyhledávám, nezískávám

- prosím napište, který zdroj ze zaškrtnutých preferujete

.....

24. Poradil Vám Váš gynekolog přestat s kouřením?

ano

ne

25. Vyhledávala jste aktivně informace o kouření v těhotenství?

ano

- kde jste informace hledala.....

- kdy, v jakém období, jste informace nejvíce vyhledávala.....

.....

ne

26. Máte dojem, že Vaše informace o kouření v těhotenství jsou dostatečné? (prosím zaškrtněte jednu z možností)

rozhodně ano

spíše ano

spíše ne

rozhodně ne

27. Kdy si myslíte, že jste byla nejnímavější k informacím o kouření v těhotenství?

(prosím zaškrtněte jednu z možností)

v době před otěhotněním

v prvním trimestru těhotenství
po celou dobu těhotenství
nemám pocit, že bych někdy informace o kouření v těhotenství více vnímala

Následující část dotazníku vyplňte prosím, pouze pokud aktuálně kouříte.

28. Jak brzy po probuzení si zapálíte svou první cigaretu?

- do 5 minut
- za 6-30 minut
- za 31-60 minut
- po 60 minutách

29. Je pro Vás obtížné nekouřit v místech, kde není kouření dovoleno?

- ano
- ne

30. Kterou cigaretu byste nerada postrádala?

- první ráno
- kteroukoliv jinou

31. Kolik cigaret denně kouříte?

- 0-10
- 11-20
- 21-30
- 31 a více

32. Kouříte častěji během dopoledne?

- ano
- ne

33. Kouříte, i když jste nemocná a upoutána na lůžko?

- ano
- ne

9.3 Separáty publikací v impaktovaných vědeckých časopisech

1. **ADAMCOVÁ K, DUŠKOVÁ M, PAŘÍZEK A.** Smoking in pregnancy-negative impact on mother and child. Opinions on nicotine substitution. *Česka Gynekol.* 2015 Aug;80(4):264-70.
2. **ADAMCOVÁ K, KOLÁTOROVÁ L, ŠKODOVÁ T, ŠIMKOVÁ M, PAŘÍZEK A, STÁRKA L, DUŠKOVÁ M.** Changes to fetal steroidogenesis caused by maternal smoking. *Physiol Res.*,2017,66(Suppl.3),375–386.
3. **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.*,2018,67(Suppl.3),489–497.