

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



Mgr. Ilona Sejkorová

**Vybrané faktory komplementového systému v diagnostice intraamniálního zánětu u  
pacientek s předčasným porodem spojeným s předčasným odtokem plodové vody  
(PPROM)**

**Selected factors of the complement system in the diagnosis of intraamniacal  
inflammation in a patient with preterm prelabor rupture of fetal membranes  
(PPROM)**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

## **Poděkování**

Poděkování patří vedoucímu této rigorózní práce, prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D., za odborné vedení, velice vstřícný přístup a za pomoc při získávání potřebných informací a podkladů. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ondřeji Součkovi za cenné rady a připomínky týkající se daného tématu a za podporu při psaní této práce. Také děkuji své rodině, která mě při psaní práce podporovala.

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

V Hradci Králové, 2021

Mgr. Ilona Sejkorová

## Obsah

ABSTRAKT .....	7
ABSTRACT .....	8
1. ÚVOD .....	10
2. CÍL PRÁCE .....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1 Předčasný porod .....	12
3.1.1 Klasifikace předčasného porodu .....	12
3.2 PPRM .....	14
3.2.1 Stanovení rizika v průběhu těhotenství .....	15
3.2.2 Diagnostika PPRM .....	17
3.2.3 Management PPRM .....	18
3.2.4 Léčba .....	18
3.3 Imunitní systém v těhotenství .....	20
3.4 Komplementový systém .....	22
3.4.1 Klasická cesta aktivace komplementu .....	23
3.4.2 Alternativní cesta aktivace komplementu .....	23
3.4.3 Lektinová cesta aktivace komplementu .....	24
3.4.4 Vznik komplexu atakujícího membránu .....	24
3.4.5 Komplementový systém v těhotenství .....	24
3.4.6 Komplementový systém u předčasných porodů .....	25
3.5 Komplementová složka 8 .....	26
3.6 CD59 .....	27
3.7 Terminální komplex komplementu .....	28
3.7.1 Komplementová složka 5 .....	29
3.7.2 Komplementová složka 6 a 7 .....	29
3.7.3 Komplementová složka 8 .....	29
3.7.4 Komplementová složka 9 .....	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
4.1 Soubor pacientek .....	31

4.2	Odběr vzorků plodové vody.....	32
4.3	Stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě.....	32
4.4	Detekce patogenů Ureaplasma species, Mycoplasma hominis a Chlamydia trachomatis .....	32
4.5	Detekce dalších bakteriálních druhů v plodové vodě.....	33
4.6	Stanovení diagnózy mikrobiální invaze do amniální dutiny a intraamniálního zánětu	33
4.6.1	Určení probíhajícího IAI.....	33
4.6.2	Diagnostika MIAC.....	34
4.7	Rozdělení souboru pacientek .....	34
4.8	Stanovení koncentrace vybraných parametrů komplementového systému v plodové vodě .....	34
4.8.1	Stanovení C8 složky komplementového systému.....	35
4.8.2	Stanovení TCC .....	36
4.8.3	Stanovení solubilní formy regulační bílkoviny komplementového systému CD59 .....	37
4.9	Statistické zpracování dat.....	39
5.	VÝSLEDKY.....	40
5.1	Koncentrace C8 složky komplementového systému v plodové vodě u pacientek s PPRM .....	42
5.1.1	Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u žen s probíhajícím IAI a bez IAI.....	42
5.1.2	Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek bez infekce .....	43
5.1.3	Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u žen s MIAC a bez MIAC .....	44
5.1.4	Porovnání hladin komplementové složky C8 u pacientek s IAI a/nebo MIAC	45
5.2	Koncentrace CD59 v plodové vodě u pacientek s PPRM .....	47
5.2.1	Porovnání hladin CD59 u žen s probíhajícím IAI a bez IAI.....	47
5.2.2	Porovnání hladin CD59 u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek bez infekce .....	48
5.2.3	Porovnání hladin CD59 u žen s MIAC a bez MIAC.....	49
5.2.4	Porovnání hladin komplementové složky CD59 u pacientek s IAI a/nebo MIAC .....	50
5.3	Koncentrace TCC u pacientek s PPRM .....	52
5.3.1	Porovnání hladin TCC u žen s probíhajícím IAI a bez IAI .....	52

5.3.2	Porovnání hladin TCC u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek bez infekce .....	53
5.3.3	Porovnání hladin TCC u žen s MIAC a bez MIAC .....	54
5.3.4	Porovnání hladin TCC u pacientek s IAI a/nebo MIAC .....	55
6.	DISKUSE .....	57
7.	ZÁVĚR .....	62
8.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	63
9.	SEZNAM GRAFŮ.....	65
10.	SEZNAM TABULEK .....	65
11.	POUŽITÁ LITERATURA.....	66

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Kandidát:** Mgr. Ilona Sejkorová

**Vedoucí rigorózní práce:** prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

**Název rigorózní práce:** Vybrané faktory komplementového systému v diagnostice intraamniálního zánětu u pacientek s předčasným porodem spojeným s předčasným odtokem plodové vody (PPROM)

**Cíl:** Cílem práce bylo stanovit koncentrace vybraných složek komplementu v plodové vodě u pacientek s těhotenstvím komplikovaným PPROM s ohledem na mikrobiální invazi do amniální dutiny (MIAC), intraamniální zánět (IAI) a intraamniální infekci. Mezi hodnocené biomarkery byla zařazena složka komplementového systému C8, terminální komplex komplementu (TCC) a regulační bílkovina komplementového systému protektin (CD59).

**Metody:** Do studie bylo zařazeno 164 žen s jednočetným těhotenstvím komplikovaným PPROM. Vzorok plodové vody byly odebrány transabdominální aminocentézou. Koncentrace vybraných molekul byla stanovena pomocí imunoenzymatické reakce (ELISA). Přítomnost bakterií v plodové vodě byla stanovena pomocí polymerázové řetězové reakce, imunochromatograficky byla stanovena koncentrace interleukinu 6 v plodové vodě. Intraamniální zánět byl definován koncentrací IL-6 >745 pg/ml. Intraamniální infekce je charakterizována přítomností MIAC a IAI.

**Výsledky:** Byl prokázán statistický rozdíl v hladinách TTC a regulačního proteinu CD59 s ohledem na IAI a intraamniální infekci. V koncentraci C8 nebyl nalezen rozdíl v závislosti na MIAC, IAI a intraamniální infekci.

**Závěr:** Komplex TCC a regulační protein CD59 se jeví jako vhodné biomarkery pro detekci přítomnosti IAI či intraamniální infekce u pacientek s PPROM.

**Klíčová slova:** předčasný porod, PPROM, intraamniální zánět, komplementová složka C8, terminální komplex komplementu, protektin

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

**Candidate:** Mgr. Ilona Sejkorová

**Supervisor:** prof. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

**Title of Thesis:** Selected factors of the complement system in the diagnosis of intraamniotical inflammation in a patient with preterm prelabor rupture of fetal membranes (PPROM)

**Objective:** The aim of the study was to evaluate concentrations of selected markers in amniotic fluid in pregnancies complicated by PPRM with respect to the presence of the microbial invasion of the amniotic cavity (MIAC), intraamniotical inflammation (IAI) and intraamniotical infection. Among the evaluated biomarkers were complement component C8, terminal complement complex (TCC), the regulatory protein of the complement system protectin (CD59).

**Methods:** One hundred sixty-four women with singleton pregnancies complicated by PPRM were included in this study. Amniotic fluid samples were obtained by transabdominal amniocentesis. Concentrations of selected molecules were determined by enzyme immunoassay test (ELISA). MIAC was detected by a polymerase chain reaction. Interleukin 6 levels were determined in amniotic fluid of patients by immunochromatographic assay. IAI was defined as an amniotic fluid interleukin-6 concentration  $\geq 745$  pg/ml. Intraamniotical infection was characterized as the presence of both MIAC and IAI.

**Results:** Elevated concentrations of TCC and CD59 were found in patients with respect to the presence of the intraamniotical inflammation and intraamniotical infection. The concentration of complement component C8 was not changed with respect to the presence MIAC, IAI or intraamniotical infection.

**Conclusions:** TCC and the regulatory protein CD59 are promising biomarkers for the detection of IAI or intraamniotical infection of women with pregnancies complicated by PPRM.



**Key words:** preterm labor, PPROM, intraamniacal inflammation, complement component C8, terminal complement complex, protectin

# 1. ÚVOD

Plodové obaly se skládají ze dvou histologických vrstev, a to amnionu, který je v kontaktu s plodovou vodou, a chorionu, který je v kontaktu s mateřskou deciduou. Obaly obklopují plod během těhotenství, působí jako bariéra mezi fetálním a mateřským prostředím a poskytují mechanickou i biologickou ochranu před vnějšími vlivy a vzestupujícími bakteriemi vaginální mikroflóry [1].

Ruptura obalů je fyziologický proces, ke kterému dochází na konci těhotenství. Ruptura, ke které dojde před začátkem kontrakcí u 10 % těhotenství, se označuje jako předčasný odtok plodové vody (PROM). Asi 3 % žen trpí PROM před 37. týdnem těhotenství, což se nazývá PPROM. Jakmile je stanovena diagnóza předčasného porodu s předčasným odtokem plodové vody (PPROM; preterm premature rupture of membranes), je snaha o konzervativní léčbu ke snížení rizika novorozeneckých jako je infekce, komprese pupečníku apod. PPROM je zodpovědný za třetinu předčasných porodů a zvyšuje perinatální morbiditu a mortalitu zejména z důvodu rizika nitroděložní infekce, která může vést k časně novorozenecké infekci, nekrotizující enterokolitidě a úmrtí plodu. Navzdory pokroku v perinatální péči v posledních letech, jsou předčasná ruptura plodových obalů a předčasný porod stále závažným problémem [1].

## 2. CÍL PRÁCE

Primárním cílem této práce je stanovit koncentrace vybraných složek komplementu, které by mohly predikovat předčasný porod a PPRM. Zjistit, zda se koncentrace těchto parametrů liší v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC) a intraamniálního zánětu (IAI). Studie je provedena na kohortě pacientek, jež jsou rozdělené do 4 základních skupin dle přítomnosti MIAC a IAI, případně jejich kombinací. První skupinu tvoří pacientky se známkou MIAC spojenou s IAI. Druhá skupina nese příznaky IAI bez průkazu infekčního agens, v tomto případě se jedná o sterilní zánět. Do třetí skupiny jsou zařazeny pacientky s MIAC, ale bez známek zánětu. Čtvrtou skupinu tvoří pacientky s negativním nálezem MIAC i bez prokázaného zánětu, jedná se tedy o kontrolní skupinu. Výsledné hodnoty vybraných parametrů jsou statisticky vyhodnoceny a porovnány v rámci výše zmíněných skupin. Studie je součástí projektu, jež je zaměřen na hledání potenciálních biomarkerů pro predikci předčasného porodu.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Předčasný porod

Předčasný porod (PP) je dle Světové zdravotnické organizace definován jako porod před 37. týdnem těhotenství nebo méně než 259 dní od prvního dne poslední menstruace ženy. Na základě gestačního věku se dělí na extrémně předčasné porody (<28 týdnů); velmi předčasné (28– <32 týdnů) a mírně předčasné (32– <37 dokončených týdnů těhotenství) [2]. PP představuje celosvětově hlavní příčinu perinatální mortality a morbidity [3]. Jedná se o nejvýznamnější klinický problém, kterému čelí současné porodnictví v rozvinutém světě. Odhaduje se, že každý rok dojde k 15 milionům předčasných porodů [4][5].

Pokroky v perinatologii a neonatologii vedly v posledních letech ke zvýšení počtu přežití předčasně narozených dětí, a to hlavně extrémně předčasně narozených (mezi 24. a 27. týdnem těhotenství), avšak související morbidita zůstává významná. Jedna pětina až čtvrtina předčasně narozených dětí trpí alespoň jedním závažným postižením, jako jsou poruchy duševního vývoje, chronické plicní onemocnění, mozková obrna, hluchota či slepota. I předčasně narozené děti, jež jsou narozené mezi 32. a 36. týdnem těhotenství, mají větší riziko syndromu dechové tísně, potíží s krmením, teplotních nestabilit, žloutenky a opožděného vývoje mozku. Čím nižší je gestační věk, tím vyšší je riziko úmrtnosti a nemocnosti [5][6].

#### 3.1.1 Klasifikace předčasného porodu

PP se dělí na iatrogenní a spontánní PP. Iatrogenní PP je výsledkem lékařského zákroku provedeného v důsledku stavu plodu (např. omezení růstu plodu) nebo matky (např. preeklampsie). Spontánní PP je heterogenní stav s mnoha spouštěči nebo urychlujícími faktory včetně krvácení z genitálního traktu matky, cervikální dysfunkce, idiopatické kontrakce dělohy, infekce, podvýživy, vícečetného těhotenství apod. Spontánní PP se zachovalým vakem blan (PTL; preterm labor) a PPRM tvoří přibližně 70-80 % všech PP. PTL je definován jako pravidelné kontrakce a cervikální změny po méně než 37 týdnech těhotenství. PPRM je charakterizován jako spontánní prasknutí obalů nejméně 1 hodinu před kontrakcemi a po méně než 37 týdnech těhotenství.

Mezi známé rizikové faktory spontánních PP patří předchozí předčasný PP, rasa, nízký index tělesné hmotnosti ženy, komorbidity, krátký děložní čípek a další. K PTL a PPRM může přispívat i genetická predispozice. Ženy, jež mají tyto komplikace v rodinné či osobní anamnéze, jsou vystaveny riziku opětovného výskytu těchto potíží. I přes maximální úsilí o prodloužení těhotenství často dochází ke spontánnímu předčasnému porodu [5][7][8][9].

Dle dat z USA je nemocniční péče o předčasně narozené dítě v průměru 10krát vyšší než o dítě narozené v termínu. Další obtížně měřitelnou cenou jsou emoční a psychologické dopady na tyto děti a jejich rodiny. Z těchto důvodů je proto hlavním cílem zabránit předčasnému porodu. Pokud není možné zcela zabránit předčasnému porodu, je podstatné oddálit předčasný porod na dostatečně dlouhou dobu. Například umožnit překlad těhotné ženy do perinatologického centra intenzivní nebo intermediární péče, podávání kortikosteroidů ke zlepšení zrání plic plodu či podávání hořčíku pro neuroprotekcí plodu [5].

### **3.2 PPROM**

PPROM se řadí mezi hlavní komplikace těhotenství. Je definován jako porušení plodových obalů a odtok plodové vody před nástupem pravidelné děložní činnosti před 37. týdnem těhotenství. Tento stav nastává u 20-30 % všech PP a komplikuje přibližně 3 % těhotenství. Má nepříznivý vliv na těhotenství a novorozence a z toho důvodu je zásadní včasná a přesná diagnóza [10][11][12].

Počet případů PPROM převyšuje počet případů preeklampsie, gestačního diabetu a iatrogenních PP. Kromě toho je novorozenecká úmrtnost a morbidita ve skupině PPROM vyšší než u jiných typů PP. Navzdory těmto znalostem je PPROM často podceňovaným nepříznivým výsledkem těhotenství [13].

PPROM je považován z hlediska patofyziologie za multifaktoriální. Na rozvoj PPROM mají vliv některé rizikové faktory. Jedná se o (i) faktory demografické, jako je nízký socioekonomický status, špatná perinatální péče, matčin věk, podvýživa, rasa; (ii) faktory chování včetně kouření, užívání drog, alkohol, těžké fyzické práce; (iii) porodnická anamnéza včetně genetické predispozice, malformace dělohy, předchozí PPROM apod.; (iv) aspekty současného těhotenství jako je mnohočetné těhotenství, vaginální krvácení či infekce, zkrácený děložní čípek, snížený obsah kolagenu v plodových obalech a další komplikace těhotenství [5][14][15][16].

Poměrně často je PPROM komplikován přítomností mikroorganismů a/nebo zánětu v plodové vodě (IAI; intraamniální inflammatce) a to přibližně ve 30–35 % všech PPROM. V nižších gestačních týdnech je prevalence výše zmíněných komplikací u PPROM vyšší [17].

Plodové obaly slouží jako bariéra proti infekci. Jakmile obaly prasknou, dochází k riziku infekce pro matku i plod a k dalším komplikacím. Novorozenecké komplikace jsou tím závažnější, čím je nižší gestační věk při prasknutí obalů [10].

Nejméně 40 % PP je spojeno s nitroděložní infekcí. Mnohdy je však obtížné určit, zda je infekce příčinou nebo důsledkem procesů, jež vedou k PP. Nicméně mnoho důkazů nasvědčuje, že infekce a zánět vyvolaný infekcí, ať už v gestačních tkáních či jinde, jsou primární příčinou podstatné části PP [18][19].

Taktéž mimoděložní infekce těhotných žen, jako je pyelonefritida, pneumonie a periodontální onemocnění, jsou spojeny s PP. V případě amniální dutiny se zpravidla jedná o sterilní prostředí. Pouze <1 % těhotných žen, které nejsou v termínu porodu, mají v plodové vodě bakterie. Z tohoto důvodu je přítomnost bakterií v plodové vodě patologickým nálezem, označovaným jako MIAC (microbial invasion of the amniotic cavity). Většina takových kolonizací je subklinická a je nedetekovatelná bez analýzy plodové vody [20][21][22][23].

Dominujícími mikroorganismy v plodové vodě u žen s PP jsou bakterie rodu *Ureaplasma* (zejména *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*), *Mycoplasma* a *Fusobacterium*. Informace ohledně souvislosti mezi předčasným porodem a virovými infekcemi jsou poměrně vzácné. Nejčastěji izolovanými viry jsou adenovirus, cytomegalovirus a enterovirus, a to jak v nerizikových, tak v rizikových těhotenstvích [17][19][24][25].

Vzhledem k závažnosti PP je klíčová jeho včasná diagnostika. Stávající screeningové testy určené pro predikci spontánního PP je možné rozdělit do tří obecných kategorií, jsou to: (i) stanovení rizikových faktorů, (ii) měření délky děložního hrdla a (iii) biochemické markery [5].

### **3.2.1 Stanovení rizika v průběhu těhotenství**

Riziko PP lze částečně stanovit již na počátku gravidity, a to pomocí anamnézy, rizika infekce, přítomnosti anomálií dělohy a děložního čípku, pátrání po rizikových socioekonomických faktorech, vyšetření na asymptomatickou bakteriurii, sexuálně přenosné onemocnění apod. [26].

Z celkového počtu všech předčasných porodů proběhne 85 % PP u žen, u nichž se jedná o první graviditu nebo se u nich v anamnéze vyskytují pouze donošená těhotenství. U této skupiny žen je přínosné pro zhodnocení rizika PP provést stanovení hladiny cerviko-vaginálního fetálního fibronektinu mezi 22.-24. gestačním týdnem a měření délky děložního hrdla mezi 22.-24. gestačním týdnem. Po jednom, dvou anebo třech po sobě následujících PP se riziko opětovného PP zvyšuje na 15 %, 30 % a 45 % [26].

### **3.2.1.1 Rizikové faktory**

Mezi rizikové faktory patří (i) demografické faktory, jako jsou nízký socioekonomický status, špatná perinatální péče, extrémní věk matky nebo podvýživa, (ii) faktory chování, jako kouření, užívání drog, konzumace alkoholu, (iii) porodnická anamnéza včetně genetické predispozice, malformace dělohy, předchozího předčasného porodu (iv), aspekty současného těhotenství jako je mnohočetné těhotenství, infekce, malformace plodu, předčasné prasknutí obalů, zkrácený děložní čípek a další komplikace těhotenství včetně preeklampsie a gestačního diabetu mellitu [27] [28].

### **3.2.1.2 Délka děložního hrdla**

Délka děložního hrdla je také rizikovým faktorem PP. Ve 22. - 24. týdnu gravidity je možné provést ultrazvukovou cervikometrii, pomocí níž lze monitorovat délku cervixu. Nicméně vzhledem k celosvětově omezené dostupnosti ultrazvuku a nedostatečného specializovaného výcviku lékařů porodníků, nelze délku cervixu samostatně vždy spolehlivě využít k předpovědi předčasného porodu [29]. Mezi 22.-24. týdnem je fyziologická délka děložního hrdla kolem 36 mm. Riziko spontánního PP je nepřímo úměrné délce děložního hrdla, při zkrácení hrdla na 15 mm a méně exponenciálně stoupá [26].

Některé ženy mají zkrácenou délku cervixu v důsledku vrozené vady, v jiných případech může dojít ke zkrácení cervixu následkem infekce [10].

### **3.2.1.3 Biochemické (laboratorní) parametry**

Biologické materiály, jako krev, sérum, plazma, moč, sliny, plodová voda a cerviko-vaginální tekutina, jsou poměrně snadno dostupné a jsou vhodným zdrojem biomarkerů, jako jsou bílkoviny a metabolity. Koncentrace laboratorních parametrů stanovených v těchto tekutinách se mění v souvislosti s těhotenstvím, často i s gestačním stářím, a mohou odrážet různé patofyziologické poruchy těhotenství, a to včetně PP. Úspěšná dokončení těhotenství a porod závisí na komplexních interakcích mezi mnoha biologickými molekulami, a to zejména v mikroprostředí dělohy. Tyto procesy jsou složitě propojeny a modulovány mnoha endogenními a exogenními faktory. Poruchy se pak mohou projevit jako patologie těhotenství, a to jako předčasný



porod, preeklampsie, omezení růstu plodu apod. Navzdory velkému množství dostupných informací zůstává v této problematice řada nezodpovězených otázek [5][30][31].

### **3.2.2 Diagnostika PPRM**

PPROM je do značné míry klinická diagnóza. Časné stanovení diagnózy PPRM je nejdůležitější prevencí neonatálních a mateřských komplikací. Za zlatý standard je pro diagnózu PPRM považován anamnestický údaj o odtoku plodové vody a průkaz depa plodové vody v zadní klenbě poševní při vyšetření v zrcadlech [10].

Při průkazu odtoku plodové vody se dále používají laboratorní markery infekce z důvodu potvrzení či vyloučení infekce jako hlavní příčiny vzniku PPRM. Nejčastěji jsou měřeny hladiny CRP, počet leukocytů, event. cytokiny IL-6, TNF- $\alpha$  [32].

Používají se i další testy, které přispívají ke stanovení diagnózy PPRM. Jak pro potřebu klinických pracovišť, tak pro pacientku je nejpříznivější, pokud je možné provést analýzu biomarkeru přímo u lůžka pacientky případně v ambulanci lékaře. Tyto testy jsou označovány jako Bed-side test nebo POCT (Point of Care Testing). Využívá se Temešváryho test sloužící ke stanovení změny pH v pochvě. Další možností jsou specifické testy Actim -PROM<sup>TM</sup> test a Amnisure<sup>®</sup> test. Actim-PROM<sup>TM</sup> je rychlý test k detekci IGFBP-1 (inzulínu podobný růstový faktor vázající protein-1). Koncentrace IGFBP-1 v plodové vodě je velmi vysoká. Test není ovlivněn přítomností infikovaných vaginálních sekretů, moči, spermatu nebo malého množství krve. Amnisure<sup>®</sup> test je rychlý test k detekci stopového množství PAMG-1 (placentárního alfa-mikroglobulinu-1) ve vaginální tekutině. Tento test není ovlivněn spermatem ani stopovým množstvím krve [33][34][35][36].

Výše zmíněné testy pro detekci PPRM mají velmi vysokou specifitu i senzitivitu, i přesto je nezbytné pozitivitu těchto testů v některých případech velmi opatrně interpretovat. Příkladem může být situace, kdy je dostatečné množství plodové vody při ultrazvukovém vyšetření a klinický průkaz odtoku plodové vody je negativní. Uvedené testy totiž citlivě detekují přítomnost plodové vody i aktivaci neporušených plodových obalů. Z výše uvedených informací vyplývá, že je lepší v nejasných případech

nepovažovat pozitivitu těchto testů za průkaz PPRM, ale raději vyčkat na klinický průkaz odtoku plodové vody [37][38][39].

### **3.2.3 Management PPRM**

Management pacientek s PPRM je stanoven na podkladě gestačního stáří, stavu plodu a matky. Pacientky s PPRM je možné sledovat a léčit za hospitalizace i ambulantně. Jsou dostupné studie, které srovnávají tyto dva přístupy k PPRM. Výsledky jsou ovšem rozporuplné. V České republice jsou pacientky s PPRM vždy hospitalizovány. Hospitalizace probíhá ve vhodném zařízení dle gestačního stáří [40][41][42].

Management předčasného porodu zahrnuje stanovení rizika hrozícího PP, stanovení diagnózy PP, objasnění etiologie PP, zjištění stavu plodu, podání profylaktické terapie plodu, zahájení tokolýzy k oddálení porodu [26].

Před stanovením managementu u pacientek s PPRM je nutné vyloučit přítomnost klinické chorioamnionitidy, závažné vaginální krvácení a známky hypoxie plodu. Projevem chorioamnionitidy je teplota matky nad 37,5 °C a přítomnost nejméně dvou následujících příznaků: tachykardie matky či plodu, hnisavý vaginální výtok, zvýšená citlivost dělohy, bolesti břicha a leukocytóza. Těhotenství pacientek s PPRM, jež je komplikované některým z výše uvedených stavů, by mělo být co nejdříve ukončeno [43][44].

### **3.2.4 Léčba**

Terapie těhotných s diagnózou PPRM je ovlivněna a přizpůsobena gestačnímu stáří pacientky. Základním principem léčby PP je zastavit předčasný porod (účinná tokolýza), indukovat zralost plicní tkáně plodu (léčba kortikosteroidy) a léčba infekce antibiotiky [45].

#### **3.2.4.1 Tokolýza**

Tokolýtika zastavují nebo zmírňují kontrakční činnost dělohy, díky čemuž dojde k oddálení porodu. Tokolytická léčba je indikována u pacientek s rizikem PP mezi 24.-35. týdnem těhotenství. Pro zahájení léčby tokolytiky je podmínkou plod bez známky

ohrožení infekcí nebo hypoxií a nepřítomnost kontraindikací matky. Trvání této léčby by nemělo přesáhnout 48 hodin, toto období je nutné k indukci plicní zralosti plodu kortikosteroidy a převozu těhotné do perinatologického centra [46][47].

#### **3.2.4.2 Kortikosteroidy**

Kortikosteroidy by měly být indikovány pokud je zřejmé, že dojde k porodu do 7 dnů. Podávání kortikosteroidů se používá k indukci plicní zralosti při hrozícím PP. Je prokázáno, že kortikosteroidy podávané pacientkám s PPRM snižují u novorozenců úmrtnost, syndrom dechové tísně, nekrotizující enterokolitidu a intraventrikulární krvácení. Kontraindikací pro léčbu je rozvinutý zánět u matky (chorioamnionitis). V tomto případě nejsou podávány tokolytika ani kortikosteroidy a těhotenství je nejčastěji ukončeno císařským řezem [45][46][48].

#### **3.2.4.3 Antibiotika**

Zahájení léčby antibiotiky je vhodné u všech žen s diagnostikou PPRM. Při příjmu pacientky k hospitalizaci se provede odběr materiálu na vaginorektální kultivaci, a to z důvodů možné mikrobiální infekce. Ihned jsou empiricky podávána profylaktická antibiotika. Pokud je pacientka bez klinických příznaků IAI, v podávání antibiotik se dále nepokračuje. V případě pozitivního mikrobiologického nálezu se aplikuje cílená antibiotická léčba. Je prokázáno, že antibiotika prodlužují těhotenství, snižují infekce matek a novorozenců a snižují morbiditu plodu [44][45][47].

### **3.3 Imunitní systém v těhotenství**

V toleranci plodu hraje důležitou roli imunitní systém. Během těhotenství dochází k zásadním změnám v imunitním systému, kdy mateřský imunitní systém musí být schopen chránit sebe i plod před infekčními a dalšími hrozbami a také musí tolerovat semialogenní štěp. Ten představuje plod s antigenní výbavou, která pochází z poloviny od otce. Při toleranci plodu se uplatňuje více různých imunologických a anatomicko-fyziologických mechanismů. Při imunologické toleranci byla popsána řada cytokinů a jiných imunoregulačních molekul, které přispívají ke stavu imunologické tolerance a svoji úlohu mají i při toleranci plodu [49].

Imunitní systém má dva hlavní obranné systémy: vrozený a adaptivní. Vrozená imunitní odpověď je nespecifická reakce na cizí antigeny, zatímco adaptivní reakce vytváří velmi specifickou reakci na antigeny. Ačkoli jsou v těchto systémech zapojeny různé imunitní složky, existuje mezi těmito dvěma systémy mnoho vzájemného propojení [50][51]. Původně se předpokládalo, že těhotenství představuje dobu potlačení imunity. Dle poznatků v poslední době dochází během těhotenství spíše ke změně poměru a funkce mateřských leukocytů než k úplnému potlačení. Například dochází k nárůstu celkového počtu periferních bílých krvinek od raných stádií těhotenství beze změny počtu CD4 a CD8 [49][50][52].

V průběhu fyziologické gravidity dochází k útlumu mateřské Th1 imunitní odpovědi, což je potřebné pro zabránění rejekce plodu. Tento proces vede k převaze Th2 imunitní odpovědi. Nerovnováha v Th1/Th2 imunitní odpovědi ve prospěch Th1 způsobí nástup porodu. K převaze Th2 cytokinů v těhotenství přispívají i buňky nehematopoetického původu, například placentární trofoblasty [49][53][54].

Imunologická tolerance během těhotenství je také významně ovlivněna hormony, hlavně progesteronem, choriovým gonadotropinem a estrogenem. Dalším důležitým hormonem je nadledvinkový kortisol, jehož produkce je v graviditě až desetkrát vyšší. Je dokázáno, že v prospívající graviditě přechodně slábnou až mizí silné alergické reakce, ale i dochází k výraznému zlepšení závažných autoimunitních onemocnění a zároveň na druhé straně není porušena protiinfekční imunitní ochrana. V dnešní

době je porod vnímán především jako zánětlivý proces. Nikoliv hormonálně řízený proces, jako tomu bylo dříve [55][56].

PPROM se mnohdy pojí s přítomností intraamniálních komplikací (zánětlivých či mikrobiálních). Tyto komplikace jsou velmi obtížně stanovitelné pomocí běžných ukazatelů zánětu v mateřské krvi z důvodu subklinického průběhu. IAI může být vyvolán různými stimuly, a to mikroorganismy v plodové vodě (intraamniální infekce) či endogenními látkami uvolněnými z plodových obalů a placenty do plodové vody (sterilní zánět). Intraamniální infekce je významným spouštěčem PPRM a následného nástupu předčasné děložní aktivity. Je provázána zvýšenou produkcí proteinů akutní fáze CRP, PTX3 a prozáněťových cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  a IL-8. Koncentrace markerů, uvedených výše, je možné sledovat v plodové vodě. Významným nástrojem v regulaci zánětu a bakteriální infekce je komplementový systém [57][58][59][60].

### **3.4 Komplementový systém**

Komplementový systém je velmi důležitou součástí humorálních složek vrozené (nespecifické) imunity, má klíčovou roli při obraně proti patogenům. Zahrnuje více než 30 molekul, které jsou většinou v tělních tekutinách (plazma) nebo jsou exprimovány na povrchu buněk (buněk imunitního systému). Molekuly navzájem spolu kooperují, ale také kooperují s dalšími komponentami imunitního systému. Základem komplementového systému je 9 sérových proteinů, které jsou označovány jako C1-C9, ústřední složkou je C3. Jejich kaskádovitá aktivace vede k tvorbě tzv. komplexu atakujícího membránu (MAC; membrane attack complex), který vyvolá perforaci a následnou lýzu napadené buňky. Pro aktivaci komplementu jsou velmi důležité faktory, které se označují velkými písmeny. Za fyziologických podmínek je komplementový systém udržován v neaktivní formě a pro svoji funkci musí být aktivován. Během aktivace komplementu se tvoří peptidické fragmenty s chemoatraktivními a anafylaktickými účinky. Některé proteolytické enzymy fungují jak v aktivaci komplementového systému, tak i v aktivaci koagulační kaskády. Aktivní komplex je označován vodorovnou čarou nad popisem. Aktivace probíhá jednou ze tří cest: klasická cesta aktivace, alternativní cesta aktivace a lektinová cesta aktivace. Jednotlivé cesty se liší mechanismem spuštění aktivace komplementu. Při aktivaci jsou složky a faktory komplementového systému proteolyticky štěpeny na fragmenty, jež jsou označovány malými písmeny a, b. Větší fragment, většinou fragment b (výjimka C2a), si ponechává enzymatickou aktivitu. Menší fragment, fragment a, získává prozáněťovou a anafylaktickou aktivitu. Složky, které jsou již aktivované, mohou vytvářet enzymaticky aktivní komplexy, tzv. konvertázy. Konvertázy posouvají aktivitu celého komplementového systému k dalším krokům. Nejvýznamnější jsou konvertázy štěpící složky C3, C5 a faktor B. Složky komplementu mají opsonizační funkci (C3b), také působí jako chemotaktické působky (C3a, C5a), další funkcí je osmotická lýza (komplex C5b-C9) a produkce anafylatoxinů (C3a, C4a, C5a). Komplement podporuje protilátkovou odpověď, podílí se na odstraňování apoptotických buněk a imunitních komplexů, má roli i v časném embryonálním vývoji a reparaci tkání. [61][62][63].

Aktivace komplementového systému probíhá kaskádovitě, jak již bylo zmíněno výše. V případě splnění aktivačních podmínek se složka komplementového systému mění na aktivní enzym. Enzymaticky aktivní složka štěpí následnou složku v kaskádě taktéž za vzniku aktivního enzymu. Výsledkem těchto pochodů je velmi rychlá a masivní aktivace komplementového systému. Je potřeba důsledná regulace na několika úrovních. Do složky C5b probíhá aktivace komplementového systému cestou enzymatické kaskády. Poté již dochází k sestavení MAC. Mechanismy komplementového systému jsou popsány stručně a ve vztahu k problematice řešené v této práci [64].

### **3.4.1 Klasická cesta aktivace komplementu**

Klasická cesta aktivace komplementu začíná vazbou protilátky třídy IgG nebo IgM na antigen. Tím, jak dojde k vazbě Ab (protilátky) na povrch např. bakterie, nastane změna konformace protilátkové molekuly a odhalení vazebného místa pro protein C1, který je tvořený pěti molekulami (molekula C1q, dvě molekuly C1r a dvě molekuly C1s). První složka komplementu C1 po vazbě na Ab také pozmění svůj tvar a stane se proteolyticky aktivní. Díky své získané aktivitě může štěpit proteiny C4 a C2, jejich fragmenty C4b a C2a se navážou na povrch napadeného mikroorganismu a vytvoří se klasická C3 konvertáza (C4bC2a). Tento enzym štěpí velké množství C3 na C3a a C3b. U C3 se cesty aktivace komplementu sbíhají. Klasická cesta může být také zahájena tzv. pentraxiny (CRP a sérový amyloid P). Jedná se o proteiny akutní fáze, jež se mohou vázat na povrch některých mikroorganismů a poté jsou schopny vázat a aktivovat protein C1 [65][66].

### **3.4.2 Alternativní cesta aktivace komplementu**

Alternativní cesta aktivace komplementu je zahájena spontánní hydrolýzou C3 složky komplementu generující C3(H<sub>2</sub>O). Může k tomu docházet jak na povrchu mikrobů, tak na povrchu vlastních buněk. Na povrchu vlastních buněk je tento proces škodlivý a z tohoto důvodu je zde několik ochranných regulačních proteinů (inhibiční faktory I a H), které brání tomuto samovolnému štěpení. Komplex C3(H<sub>2</sub>O) je schopen vázat faktor B, který je faktorem D štěpen na Ba a Bb. Tím vzniká enzymaticky aktivní

membránový komplex alternativní C3 konvertáza (C3bBb komplex), která štěpí velké množství C3 na C3a a C3b [65][66][67].

### **3.4.3 Lektinová cesta aktivace komplementu**

Lektinová cesta aktivace komplementu je podobná cestě klasické, využívá protein velmi podobný C1q, lektin vázající manózu (MBL; mannan-binding lectin). Iniciuje ji tedy vazba MBL přímo na sacharidové struktury povrchů některých mikrobů, přičemž se aktivují serinové proteázy asociované s lektinem vázajícím manózu (MASP-1 a MASP-2) a štěpí C4 a C2. Tato cesta je podobná klasické cestě. Výsledkem této aktivace je taktéž lektinová C3 konvertáza (C4bC2a komplex) [68][69].

### **3.4.4 Vznik komplexu atakujícího membránu**

Cesty aktivace komplementu se sbíhají u C3 konvertáz (C4bC2a a C3bBb). Ty štěpí C3 podjednotku na C3a a C3b, kdy C3b se k nim váže a vzniká C5 konvertáza. Tato konvertáza poté štěpí C5 na C5a a C5b. Fragment C5a, jak již bylo uvedeno, je menší a působí jako anafylatoxin. Fragmenty C5b tvoří komplex s dalšími komplementovými složkami C6 a C7 za vzniku C5bC6C7. Následně dojde k navázání další molekuly C8 a celý nově vzniklý komplex se zanoří do povrchové lipidové membrány atakované buňky. Ke komplexu C5bC6C7C8 se připojí 13-18 molekul C9 za vzniku MAC. Konečný MAC se váže na membránu buňky, tím se tvoří póry, dochází k úniku cytoplazmatických komponent a porušení osmotické rovnováhy, což způsobí lýzu této buňky [70][71].

### **3.4.5 Komplementový systém v těhotenství**

Zdravé těhotenství je spojeno s řadou imunologických změn v porovnání s negravidními ženami. Lze říct, že systém komplementu, součást vrozené imunitní odpovědi, hraje klíčovou roli v normálním těhotenství od početí až po porod. Aktivita komplementu je vysoká během implantace vajíčka, aby se podpořila invaze trofoblastů do decidua. Po implantaci se komplement vrátí na normální hladiny, i když v případech potratů zůstává aktivita zvýšená. Nekontrolovaná aktivace komplementu však vede k několika těhotenským komplikacím, jako je potrat, preeklampsie a předčasný porod. Materno-fetální rozhraní je bohaté na inhibitory komplementu, které chrání placentu,



kontrolují aktivaci komplementu, a tím brání plod a podporují těhotenství. [64][72][73].

### **3.4.6 Komplementový systém u předčasných porodů**

PP je jednou z hlavních příčin novorozenecké úmrtnosti a nemocnosti. Tento patologický stav postihuje jak zdraví matky, tak novorozence. Aktivace komplementového systému v rané fázi těhotenství (do 20. týdne těhotenství) je prediktivním faktorem pozdějšího spontánního předčasného porodu [64][74].

Sledování změn v cirkulujících složkách komplementu během těhotenství může poskytnout vhodné biomarkery pro predikci nepříznivého průběhu těhotenství. V již provedených studiích bylo například zjištěno, že u žen se zvýšenou hladinou faktoru komplementu Bb v oběhu, byla mnohonásobně vyšší pravděpodobnost, že dojde k PP ve srovnání s ženami s nižší hladinou tohoto fragmentu. Z další studie vyplývá, že mateřská plazmatická koncentrace anafylatoxinu C5a je zvýšena při PP a IAI ale ne při spontánním porodu v termínu. V dnešní době je tedy cílem hledat užitečné markery pro předpověď PP, a to buď samostatné, nebo v kombinaci s jinými ukazateli zánětu. Stále více přibývá důkazů o roli systému komplementu ve vztahu k PPRM [64].

### **3.5 Komplementová složka 8**

Lidská komplementová složka 8 (C8) je jednou z pěti složek komplementu (C5b, C6, C7, C8, C9), které interagují a vytvářejí MAC. C8 iniciuje průnik membránou a koordinuje tvorbu MAC pórů. C8 je složený ze tří podjednotek:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  s celkovou molekulovou hmotností 150 kDa. C8 $\alpha$  a C8 $\beta$  mají jedinečné a zásadní role při tvorbě MAC komplexu. C8 obsahuje specifickou doménu, a to membránu atakující komplex/perforin (MACPF; membrane attack complex/perforin). MACPF doména C8 $\beta$  je zodpovědná za integraci C8 s předem sestaveným MAC prekurzorem, C5b-7, zatímco MACPF doména C8 $\alpha$  prochází konformační změnou pro vložení do membrán a je hlavním vazebným místem pro C9 [75][76].

### **3.6 CD59**

Vzhledem k zymogenní povaze kaskády komplementu a riziku samoaktivace je vyvinuto několik regulačních molekul komplementu. Jsou známé dvě hlavní skupiny regulačního systému – membránově vázané regulátory a plazmatické regulátory drah. Nejdůležitějším regulátorem klasické cesty je C1-inhibitor (C1-INH), jehož funkcí je blokáce aktivity C1r a C1s. Regulační proteiny jako faktor urychlující rozpad (DAF, CD55) a membránový proteinový kofaktor (MCP, CD46) mají velký protektivní účinek na nežádoucí aktivaci komplementu. Faktor H a C4 binding protein (C4bp) mají nejvýznamnější regulační vliv na vznik C3 konvertázy klasické a alternativní cesty. Sestavení komplexu MAC je kontrolováno molekulou zvanou protektin (CD59). Mezi další regulační proteiny patří např. komplementové receptory CR1 (CD35) a CR2 (CD21) [62].

Protektin (CD59) je navázán na membránu buňky pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Jeho další názvy jsou MAC-inhibiční protein či membránový inhibitor reaktivní lýzy. Jedná se o jednořetězcový membránový glykoprotein s molekulovou hmotností 18-20 kD. CD59 je exprimován na všech hematopoetických buňkách, ve všech lidských tkáních a cirkulujících buňkách organismu. Jeho funkcí je ochrana buňky před lytickým působením komplementu. Váže se mezi komplementové složky C8 a C9, tím brání další polymerizaci C9 a vzniku lytického póru. Vzácné případy nedostatku CD59 vedou k paroxysmální noční hemoglobinurii. Nedostatkem CD59 dojde k destrukci červených krvinek v krevním oběhu, což způsobí anémii. Tato nemoc zdůrazňuje základní funkci tohoto proteinu. Nedávné studie ukázaly, že CD59 je vysoce exprimován v několika rakovinných buněčných liniích a nádorových tkáních. CD59 také reguluje funkci, infiltraci a fenotypy různých imunitních buněk v mikroprostředí nádoru [77][78].

### **3.7 Terminální komplex komplementu**

Dle posledních poznatků jsou hlavní biologické funkce TCC daleko rozsáhlejší, než bylo původně předpokládáno. U hostitelských jaderných buněk je aktivace komplementu často sublytická (<5% lýzy). Poskytuje buňce určitou ochranu, buňka se dokáže bránit jednotlivým, ale i chybným útokům. To je rozdíl oproti erytrocytům, které jsou snadno lyzovány. Sublytický útok chrání tedy hostitelské jaderné buňky, ale také je stimuluje k biosyntéze bílkovin a působí prozánětlivě a prokoagulačně. Uvádí se, že cytolyticky neaktivní TCC je schopen aktivovat endoteliální buňky [79].

Na rozdíl od aktivačních drah, které pro aktivaci vyžadují enzymatické štěpení, se terminální dráha opírá o konformační změny. Sestavení komplexu C5b-9 v lipidové dvojvrstvě membrány začíná štěpením vazby Arg-Leu v C5  $\alpha$ -řetězci za vzniku C5a a C5b. Existuje vztah mezi nativními C5 a C6, avšak komplex C5bC6 se tvoří asociací mezi fragmenty C5b a C6. Navázání C6 musí proběhnout velmi rychle, jinak dojde k velice rychlé inaktivaci C5b. Komplex C5bC6 se pak může reverzibilně vázat na membránu prostřednictvím iontových i hydrofobních interakcí. Následné interakce C7, C8 a C9 s C5bC6 a membránou vedou ke vzniku heteropolymerních transmembránových pórů. Po navázání C8 se tedy variabilní počet molekul C9 spojuje s komplexem C5b678 a vzniká takzvaný terminální komplementový komplex (TCC) nebo membránu atakující komplex (MAC). Tvorba membránové formy TCC způsobuje lýzu buněk nebo může vyvolat aktivaci různých buněčných metabolických cest, což vede k syntéze a uvolnění mediátorů zánětu. TCC obsahuje neoantigeny, které v jednotlivých nativních složkách chybí. Neoantigeny jsou přítomny jak v MAC, tak v solubilní formě komplexu (SC5b-9). C7, C8, C9 složky obsahují specifickou doménu MACPF, která je schopna se zakotvit na lipidy buněčné membrány. Póry vytvořené C8 složkou jsou schopny lyzovat citlivé buňky jako jsou erytrocyty, ale nejsou schopny narušit membránu jaderných buněk. Z těchto důvodů je k tomuto komplexu připojeno 13-18 molekul C9, což vede ke vzniku transmembránového kanálu. Tvorba TCC je řízena řadou různých buněčných a plazmatických molekul. Často se přehlíží, že C7 a C8 jsou také důležitými modulátory, protože jejich lokální přítomnost nebo nepřítomnost

může mít hlubší účinek než nepřítomnost nebo přítomnost specifických inhibitorů komplementu. To platí zejména pro C7, který může být syntetizován i extrahepatálně v místě zánětu granulocyty a endotelovými buňkami, čímž moduluje lytický membránový útok. TCC je přítomna v normální lidské plazmě, <1 AU/ml a zvyšuje se u pacientů s aktivací komplementu [79][80].

### **3.7.1 Komplementová složka 5**

C5 je protein o molekulové hmotnosti 190 kDa a je strukturně homologní s C3, C4 a  $\alpha$ -makroglobulinem. Syntéza C5 probíhá převážně v hepatocytech, avšak je také tvořen makrofágy a alveolárními epiteliálními buňkami. Hlavní polypeptidy C5a a C5b jsou produkovány štěpením C5 $\alpha$  řetězce C5 konvertázami. Uvolněný malý fragment, C5a, má jedno glykosylační místo a 50 % peptidu je v  $\alpha$ -helikální konformaci. C5a je nejúčinnější zánětlivý peptid uvolňovaný aktivací komplementu, má silnou chemotaktickou aktivitu a je, jak již bylo zmíněno, anafylatoxinem. Komplexy C5bC6 se pak mohou reverzibilně vázat na membrány prostřednictvím iontových i hydrofobních interakcí [79].

### **3.7.2 Komplementová složka 6 a 7**

C6 je neobvyklý, a to tím, že se jedná o mozaikový protein, který se skládá z několika homologních modulů nalezených v mnoha dalších proteinech. C6 má C-koncovou doménu bohatou na cystein, která je částečně homologní s oblastmi trombospondinu I, LDL receptorem a EGF receptorem. C6, C7, C8 $\alpha$ , C8 $\beta$  a C9 jsou homologní a obsahují N- a C-terminální části a 40kDa velký střední segment, označovaný jako doména MACPF [79].

### **3.7.3 Komplementová složka 8**

Komplementová složka C8 byla již výše zmíněna. Je to 150 kDa komplex skládající se ze 3 geneticky odlišných podjednotek: C8 $\alpha$  (64 kDa), C8 $\beta$  (64 kDa) a C8 $\gamma$  (22 kDa).  $\alpha$  řetězec a  $\beta$  řetězec mají velice podobnou homologii a jsou spojeny nekovalentní vazbou.  $\gamma$ -řetězec je spojen s  $\alpha$ -řetězcem pomocí disulfidové vazby. C8 $\alpha$ , - $\beta$  a - $\gamma$  jsou kódovány třemi různými geny [79].

### **3.7.4 Komplementová složka 9**

C9 je jednořetězcový globulární protein o molekulové hmotnosti 71 kDa, který je podobný C6. C9 může být štěpen v místě His-Gly  $\alpha$ -trombinem za vzniku C9a a C9b. Cytolytická aktivita C9b je zprostředkována díky jeho interakci s lipidovou dvojvrstvou membrány. Exprese C9 je nejvyšší v hepatocytech [79].

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Soubor pacientek

Do studie bylo zařazeno 164 těhotných žen, které byly přijaty s PPRM na porodní sál Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové mezi roky 2015-2017. Skupinu tvořily ženy v gestačním týdnu 24+0 až 36+6, starší 18 let, s jednočetným těhotenstvím komplikovaným PPRM. Gestační věk byl určen v prvním trimestru pomocí biometrie plodu. Ženy souhlasily s účastí ve studii podpisem informovaného souhlasu před odběrem vzorku. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Získaný biologický materiál je uložen v biobance Fakultní nemocnice Hradec Králové a je využíván k dalším analýzám.

Ze studie byly vyloučeny pacientky s vícečetným těhotenstvím, s pregestačním i gestačním diabetem, s gestační i chronickou hypertenzí, preeklampií, hypoxií plodu, abnormalitami plodu, s významným vaginálním krvácením, s komplikací růstové retardace plodu, vrozených vad plodu či s abnormálním genetickým nálezem.

Ženy s PPRM před 34. týdnem těhotenství byly léčeny kortikosteroidy pro maturaci plic plodu, tokolytiky po dobu 48 hodin a antibiotiky. Zatímco po 34. týdnu těhotenství byla zahájena pouze léčba antibiotiky, jiná léčiva k oddálení porodu či k indukci plicní zralosti nebyla podána. Ženy po 28. týdnu těhotenství, u nichž byl prokázán nesterilní IAI, dostávaly pouze kortikosteroidy pro indukci plicní zralosti a antibiotika. Za 24 hodin po dokončení léčby kortikosteroidy byl porod vyvolán nebo byl proveden císařský řez. U ostatních žen byl zvolen konzervativní přístup.

Diagnostika PPRM byla provedena pomocí sterilního vaginálního zrcadla, které se využívá k ověření odtoku plodové vody do vaginy. V případě potřeby byl výsledek vyšetření potvrzen testem přítomnosti IGFBP-1 (ACTIM PROM test; Medix Biochemica, Kauniainen, Finsko) ve vaginální tekutině.

## **4.2 Odběr vzorků plodové vody**

Před zahájením antibiotické, tokolytické a kortikosteroidní léčby, byla u pacientek provedena transabdominální aminocentéza pod kontrolou pomocí ultrazvuku. Pomocí tohoto odběru byly získány přibližně 2-3 ml plodové vody. Následně byla stanovena koncentrace IL-6 v plodové vodě pomocí POCT testu. K tomuto testu bylo využito 100 µl plodové vody ze vzorku. Zbytek odebraného vzorku byl rozdělen na podíly, kdy u jednoho podílu byla provedena centrifugace (15 min./2000 g), následná alikvotace získaného supernatantu a zmražení při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro imunologickou analýzu. Další podíly byly odeslány do mikrobiologické laboratoře k provedení polymerázové řetězové reakce (PCR; polymerase chain reaction). Analýzy, pomocí níž byla detekována DNA mikrobiálních druhů *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, a dále ke stanovení 16 sRNA. Také byla ze vzorku proveden aerobní a anaerobní kultivace.

## **4.3 Stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě**

Ke stanovení koncentrace IL-6 v plodové vodě byl použit imunochromatografický test Milenia® QuickLine IL6 za použití Milenia® POCScan Readeru (Milenia Biotec, GmbH, Giessen, Německo). Detekční rozmezí metody bylo mezi 50 – 10 000 pg/ml. Měření bylo provedeno dle pokynů výrobce.

## **4.4 Detekce patogenů *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis* a *Chlamydia trachomatis***

Výše uvedené patogeny, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis* a *Chlamydia trachomatis*, byly detekovány pomocí PCR v uspořádání Real-Time PCR. Z plodové vody byla dle instrukcí výrobce (použit protokol pro izolaci bakteriální DNA z biologických tekutin) izolována DNA pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (QIAGEN, Hilden, Německo). DNA výše zmíněných patogenů byla detekována pomocí komerční soupravy AmpliSens® *C. trachomatis/Ureaplasma/M. hominis* – MULTIPROME FRT (Federal State Institution of Science, Central Research Institute of Epidemiology, Moskva, Ruská Federace). K provedení PCR byl využit přístroj Rotor-Gene 6000 (QIAGEN) s použitím standardního laboratorního materiálu. Pro kontrolu, zda nejsou při provádění metody



ve vzorku přítomny inhibitory polymerázové řetězce, byla provedena PCR amplifikace genu pro  $\beta$ -aktin. Množství DNA (kopie/ml) bylo stanoveno absolutní kvantifikací pomocí kalibrační křivky. K přípravě kalibrační křivky sloužila plazmidová DNA o známé kvantitě (pCR4, Invitrogen). Analýza byla provedena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové.

#### **4.5 Detekce dalších bakteriálních druhů v plodové vodě**

DNA ostatních bakteriálních druhů byla detekována také pomocí PCR, avšak cílené na 16S rRNA. K provedení byly použity primery: 5`-CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3` (oblast V3) a 5`-ACATTTACAACACGAGCTGACGA-3` (oblast V6). Každá reakce obsahovala 3  $\mu$ l analyzované DNA, 500 Nm primerů a 25  $\mu$ l DNA polymerázy Q5 High Fidelity (NEB, Hitchin, UK). Amplifikace byla provedena pomocí přístroje 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Detekce výsledných produktů proběhla na agarózovém gelu po provedení gelové elektroforézy. Amplifikační produkty o velikosti 960bp, tedy pozitivní nálezy, byly vyjmuty, očištěny a následně byla provedena sekvenační PCR formou oboustranné sekvenace vždy s jedním primerem. V první reakci tedy s forward primerem, ve druhé pak s reverse primerem. K sekvenační analýze bylo využito komerčního kitu obsahujícího DNA polymerázu a značené dideoxynukleotidy – BigDye Terminator kit, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Výsledný produkt byl znovu pročištěn a byla provedena sekvenační analýza na sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). U získaných sekvencí, jež byly ve FASTA formátu, byly porovnávány shody se sekvencemi v databázi referenčních kmenů pomocí programu BLAST®, případně SepsisTest™ BLAST. Průkaz bakteriální DNA byl proveden na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové.

#### **4.6 Stanovení diagnózy mikrobiální invaze do amniální dutiny a intraamniálního zánětu**

##### **4.6.1 Určení probíhajícího IAI**

U pacientek s PPRM byl jako IAI definován stav, kdy byla v plodové vodě naměřena koncentrace markeru IL-6 více než 745 pg/ml [81].

#### **4.6.2 Diagnostika MIAC**

Diagnostika MIAC proběhla na základě pozitivního PCR nálezu *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* či kombinací těchto patogenů. MIAC může být také diagnostikována na základě pozitivního výsledku amplifikace genu pro 16S rRNA. Další možností je pozitivita aerobní nebo anaerobní kultivace z plodové vody.

#### **4.7 Rozdělení souboru pacientek**

Kohorta pacientek byla rozdělena do čtyř základních skupin dle přítomnosti MIAC a IAI, popřípadě jejich kombinací. Toto rozdělení je důležité z hlediska celkového přístupu k pacientce, nastavení léčby, jedná se tedy o velmi důležitý diagnostický znak. První skupina nese známky mikrobiální invaze do amniální dutiny spojenou s intraamniálním zánětem (MIAC+/IAI+), v tomto případě hovoříme o intraamniální infekci. Zde zánět vzniká imunitní reakcí na přítomné patogeny. Druhá skupina nese příznaky intraamniálního zánětu bez průkazu infekčního agens (MIAC-/IAI+), v tomto případě se hovoří o sterilním zánětu. Tento stav může být vyvolán jinými faktory, jako jsou poškození a stárnutí tkání, především plodových obalů. Do třetí skupiny jsou zařazeny pacientky s mikrobiální kolonizací amniální dutiny, avšak bez známek zánětu (MIAC+/IAI-). Čtvrtou skupinu tvoří pacientky s negativním nálezem MIAC i IAI, jedná se o těhotenství bez mikrobiální invaze i bez známek zánětu (MIAC-/IAI-).

#### **4.8 Stanovení koncentrace vybraných parametrů komplementového systému v plodové vodě**

Ke stanovení koncentrace sledovaných parametrů v plodové vodě byla využita metoda ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay). Při provádění testu bylo postupováno podle instrukcí výrobce dané soupravy. Výsledná hodnota absorbance byla měřena za použití readeru Multiscan RC ELISA (Thermo Fisher Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

#### **4.8.1 Stanovení C8 složky komplementového systému**

Pro analýzu byla použita ELISA souprava *Human Complement C8 Gamma ELISA KIT* od firmy Abcam (Cambridge, UK). Tento test je založen na kvantitativní nekompetitivní (sendvičové) enzymové imunoanalýzy, využívající imunochemickou reakci antigenu s protilátkou.

##### **Princip**

Protilátky, které jsou specifické pro komplementovou složku C8 Gamma (C8G), jsou předem navázány na dně jamky ELISA destičky, destička obsahuje celkem 96 jamek. Do jamky se přidá vzorek pacienta obsahující C8G složku komplementového systému a kalibrační standardy, C8G je následně zachycen protilátkami. Poté dojde k promytí a napipetování detekční protilátky značené biotinem proti C8G složce. Po dalším promytí následuje přidání konjugátu streptavidinu s peroxidázou. Streptavidin se specificky váže na biotin. Ke v jamce vytvořenému komplexu se přidá substrát, který slouží k vizualizaci pomocí barevné změny. Reakce se zastaví a měří se intenzita zabarvení. Koncentrace C8G je přímo úměrná intenzitě zabarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standardy), z nichž se tvoří kalibrační křivka.

##### **Pomůcky a chemikálie**

ELISA kit obsahuje reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8 jamek) pokrytými protilátkou proti C8G, kalibrační vzorky (standardy), biotinovanou detekční protilátkou proti C8G, ředící roztok, promývací roztok, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát, zastavovací (stop) roztok. K provedení jsou dále potřeba vícekanálové a jednonálové pipety, pipetovací špičky, zkumavky, promývačka ELx50, deionizovaná voda, ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

##### **Pracovní postup**

Nejdříve je třeba vytemperovat soupravu na laboratorní teplotu (18-25 °C) a následně připravit potřebné reagensie, vzorky a standardy v požadovaném ředění dle instrukcí. Stanovení se provádí při laboratorní teplotě. Následuje přidání 50 µl vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 2 hodin. Po 120 minutové inkubaci je provedeno promytí celé destičky promývacím pufrům.

Promytí se několikrát opakuje. V dalším kroku je přidáno 50 µl detekční biotinované protilátky proti C8G. Inkubace trvá po dobu 1 hodiny. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a následuje inkubace 30 minut. Po posledním promytí je přidáno 50 µl substrátu (tetramethylbenzidin, TMB) a po 30 minutách inkubace je reakce zastavena pomocí 50 µl stop roztoku. Ihned po zastavení reakce je odečtena intenzita zabarvení při vlnové délce 450 nm pomocí ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

**Výsledek:** Koncentrace C8G je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství C8G je 0,6 ng/ml. Rozsah měření je 0.875 ng/ml - 56 ng/ml.

#### **4.8.2 Stanovení TCC**

Pro analýzu byla použita ELISA souprava *Human Terminal Complement Complex (TCC)* od firmy HycultBiotech (Uden, Holandsko) využívající imunochemickou reakci antigenu s protilátkou. Metoda je založena na principu sendvičové ELISA imunoanalýzy.

##### **Princip**

Na dně jamky mikrotitrační destičky je navázána protilátka proti TCC, destička obsahuje celkem 96 jamek. Po přidání vzorků s neznámou koncentrací TCC a kalibračních standardů je TCC navázán na protilátku. Poté dojde k promytí a napipetování detekční protilátky značené biotinem proti TCC složce. Po dalším promytí následuje přidání konjugátu streptavidinu s peroxidázou. Streptavidin se specificky váže na biotin. Ke v jamce vytvořenému komplexu se přidá substrát, který slouží k vizualizaci pomocí barevné změny. Reakce se zastaví a měří se intenzita zabarvení. Koncentrace TCC je přímo úměrná intenzitě zabarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standardy), z nichž se tvoří kalibrační křivka.

##### **Pomůcky a chemikálie**

ELISA kit obsahuje reakční mikrodestičku s 96 jamkami (12 x 8 jamek) pokrytými protilátkou proti TCC, kalibrační vzorky (standardy), biotinovanou detekční protilátkou proti TCC, ředící roztok, promývací roztok, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát, zastavovací (stop) roztok. K provedení jsou dále potřeba

vícekanálové a jednonálové pipety, pipetovací špičky, zkumavky, promývačka ELx50, deionizovaná voda, ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **Pracovní postup**

Před použitím je třeba vytemperovat soupravu na laboratorní teplotu (20-25 °C) a následně připravit potřebné reagensie, vzorky a standardy v požadovaném ředění dle instrukcí. Následuje přidání 100 µl vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 60 minut při 4 °C. Po inkubaci je provedeno promytí celé destičky promývacím pufrům. Promytí se čtyřikrát opakuje. V dalším kroku je přidáno 100 µl detekční biotinované protilátky proti TCC. Inkubace trvá po dobu 60 minut při laboratorní teplotě (20-25 °C). Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a následuje inkubace 60 minut při laboratorní teplotě (20-25 °C). Po posledním promytí je přidáno 100 µl substrátu (TMB) a po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě je reakce zastavena pomocí 100 µl stop roztoku. Ihned po zastavení reakce je odečtena intenzita zabarvení při vlnové délce 450 nm pomocí ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

**Výsledek:** Koncentrace TCC je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství TCC je 8,2 mAU/ml. Rozsah měření je 8,2 - 2000 mAU/ml.

### **4.8.3 Stanovení solubilní formy regulační bílkoviny komplementového systému CD59**

Pro analýzu byla použita ELISA souprava *Human sCD59* od firmy HycultBiotech (Uden, Holandsko) využívající imunochemickou reakci antigenu s protilátkou. Metoda je založena na principu sendvičové ELISA imunoanalýzy.

#### **Princip**

Protilátky, které jsou specifické pro solubilní formu regulační bílkoviny komplementového systému CD59 (sCD59), jsou předem navázány na dně jamky ELISA destičky, destička obsahuje celkem 96 jamek. Do jamky se přidá vzorek pacienta obsahující neznámou koncentraci sCD59 a kalibrační standardy, sCD59 je následně zachycen protilátkami. Poté dojde k promytí a napipetování detekční protilátky proti sCD59 značené biotinem. Streptavidin se specificky váže na biotin. Ke v jamce

vytvořeném komplexu se přidá substrát, který slouží k vizualizaci pomocí barevné změny. Reakce se zastaví a měří se intenzita zbarvení. Koncentrace sCD59 je přímo úměrná intenzitě zbarvení. Spolu s patientskými vzorky se stejným způsobem analyzují i kalibrační vzorky (standardy), z nichž se tvoří kalibrační křivka.

### **Pomůcky a chemikálie**

ELISA kit obsahuje reakční mikroleštičku s 96 jamkami (12 x 8 jamek) pokrytými protilátkou proti sCD59, kalibrační vzorky (standardy), biotinovanou detekční protilátku proti sCD59, ředící roztok, promývací roztok, konjugát streptavidin-peroxidáza, chromogenní substrát, zastavovací (stop) roztok. K provedení jsou dále potřeba vícekanálové a jednonálové pipety, pipetovací špičky, zkumavky, promývačka ELx50, deionizovaná voda, ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **Pracovní postup**

Před použitím je třeba vytemperovat soupravu na laboratorní teplotu (20-25 °C) a následně připravit potřebné reagensy, vzorky a standardy v požadovaném ředění dle instrukcí. Stanovení se provádí při laboratorní teplotě. Následuje přidání 100 µl vyšetřovaných vzorků a standardů do odpovídajících jamek a inkubace po dobu 60 minut. Po inkubaci je provedeno promytí celé destičky promývacím puftrem. Promytí se vždy čtyřikrát opakuje. V dalším kroku je přidáno 100 µl detekční biotinované protilátky proti sCD59. Inkubace trvá po dobu 60 minut. Po dalším promytí je přidán konjugát streptavidin-peroxidáza a následuje inkubace 60 minut. Po posledním promytí je přidáno 100 µl substrátu (TMB) a po 30 minutách inkubace je reakce zastavena pomocí 100 µl stop roztoku. Ihned po zastavení reakce je odečtena intenzita zbarvení při vlnové délce 450 nm pomocí ELISA Reader Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **Výsledek**

Koncentrace sCD59 je vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Minimální detekovatelné množství sCD59 je 0,4 ng/ml. Rozsah měření je 0,39 – 25 ng/ml.

## **4.9 Statistické zpracování dat**

Demografické charakteristiky souboru pacientek byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho U testu pro spojité proměnné. Výsledky jsou vyjádřené mediány, doplněné mezikvartilovým rozpětím. Kategoriaální proměnné byly analyzovány pomocí Fisherova exaktního testu, výsledky jsou prezentovány v číselné podobě a doplněny o procentuální zastoupení. Normalita rozložení dat byla testována za pomoci D'Agostino-Pearsonova testu, Shapiro-Wilkova testu a Anderson-Darlingova testu. Výsledky koncentrací testovaných látek v plodové vodě nenabývají normálního rozložení, proto byly analyzovány pomocí neparametrických Man-Whitneyho U testu a Kruskal-Wallis testu. Korelační analýza byla provedena pomocí neparametrické Spearmanovy korelace. Testování probíhalo na 95 % hladině významnosti. Všechny  $p$  - hodnoty byly získány z dvouvýběrových testů. Ke statistické analýze byl použit program GaphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. VÝSLEDKY

Do studie bylo zahrnuto 164 žen, jejichž těhotenství bylo komplikováno PPROM. MIAC byl prokázán u 31 % (50/164), IAI byl prokázán u 25 % žen (41/164). Demografické a klinické charakteristiky jsou prezentovány v tabulce č.1. Nejčastěji detekovaným mikrobem u žen s MIAC byl mikrob *Ureaplasma species*, a to u 63 % žen (29/46). Polymikrobiální nález se vyskytl u 11 % žen (5/46).



**Tabulka 1** Demografická a epidemiologická charakteristika pacientek s PPROM podle přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a / nebo IAI

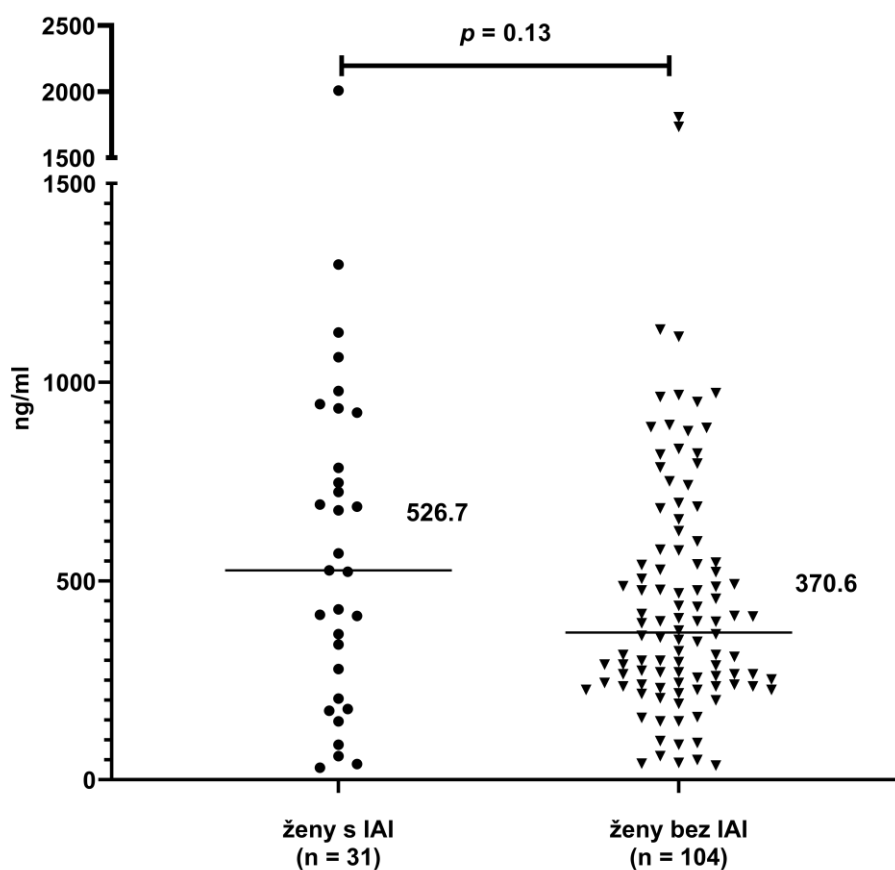
Charakteristika	ženy s MIAC (n= 46)	ženy bez MIAC (n= 100)	p hodnota	ženy s IAI (n= 34)	ženy bez IAI (n= 112)	p hodnota
Věk rodiček [roky, median (rozpětí)]	30 (24 – 32)	30 (27 – 34)	0,16	30 (26 – 32)	30 (27 – 34)	0,65
Prvorodičství [počet (%)]	24 (52%)	67 (67%)	0,09	19 (56%)	72 (64%)	0,42
Body mass index (BMI) před těhotenstvím [kg/m <sup>2</sup> , median (rozpětí)]	21.9 (19.15 – 24.75)	22.5 (20.50 – 26.80)	0,07	22.90 (19.40 – 27.75)	22.10 (20.30 – 24.80)	0,59
Kouření [počet (%)]	9 (20%)	10 (10%)	0,12	7 (21%)	12 (11%)	0,15
Doba mezi PPROM a amniocentézou [hodiny, median (rozpětí)]	4 (3 – 8)	5 (3 – 10)	0,43	4 (3 – 9.25)	4 (3 – 8)	0,59
Gestační věk při příjmu [dny, median (rozpětí)]	238 (207 – 248)	244 (230 – 253)	<b>0,019</b>	207 (178 – 236)	245 (235 – 252)	<b>&lt; 0,0001</b>
Gestační věk při porodu [dny, median (rozpětí)]	240 (208 – 250)	247 (235 – 254)	<b>0,01</b>	208 (186 – 238)	247 (238 – 254)	<b>&lt; 0,0001</b>
Doba mezi PPROM a porodem [hodiny, median (rozpětí)]	54 (23 – 112)	35 (14 – 104)	0,46	96 (25.50 – 194)	33 (14 – 85.25)	<b>0,0076</b>
Koncentrace IL-6 v plodové vodě při příjmu [pg/mL, median (rozpětí)]	603 (157.5 – 10 000)	231 (130.5 – 364)	<b>0,0006</b>	10 000 (1441 – 10 000)	207 (116 – 301.5)	<b>&lt; 0,0001</b>
Koncentrace CRP při příjmu [mg/L, median (rozpětí)]	8.15 (3.325 – 16.50)	4.35 (2.325 – 7.775)	<b>0,0018</b>	10.15 (5.5 – 25.4)	4.30 (2.3 – 7.8)	<b>&lt; 0,0001</b>
Počet leukocytů při příjmu [x10 <sup>9</sup> L, median (rozpětí)]	13.25 (10.18 – 16.83)	12.20 (10.53 – 14.10)	0,14	14.20 (11.5 – 17.8)	12.15 (10.1 – 13.8)	<b>0,0011</b>
Ošetření antibiotiky [počet (%)]	39 (85%)	81 (81%)	0,65	31 (91%)	89 (80%)	0,13
Ošetření kortikosteroidy [počet (%)]	33 (72%)	64 (64%)	0,45	28 (82%)	69 (62%)	<b>0,0369</b>
Spontánní vaginální porod [počet (%)]	32 (70%)	68 (68%)	0,84	21 (64%)	79 (72%)	0,39
Císařský řez [počet (%)]	13 (30%)	24 (24%)	0,54	13 (39%)	24 (22%)	0,07
Porod kleštěmi [počet (%)]	1 (2%)	2 (2%)	>0,99	0 (0%)	3 (3%)	>0,99
Váha plodu [gramy, median (rozpětí)]	2 080 (1 350 – 2 500)	2 305 (1 968 – 2 655)	<b>0,018</b>	1 310 (770 – 2 025)	2 415 (2 118 – 2 673)	<b>&lt; 0,0001</b>
Apgar skóre <7; 5 minut [počet (%)]	2 (5%)	1 (1%)	0,23	1 (3%)	1 (0.9%)	0,41
Apgar skóre <7; 10 minut [počet (%)]	0 (0%)	0 (0%)	>0,99	0 (0%)	0 (0%)	>0,99

## 5.1 Koncentrace C8 složky komplementového systému v plodové vodě u pacientek s PPRM

### 5.1.1 Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u žen s probíhajícím IAI a bez IAI

Koncentrace C8 v plodové vodě nebyla u pacientek s IAI statisticky vyšší než u žen bez IAI (pacientky s IAI: medián 526,7 ng/ml, rozpětí 30,6-2009; pacientky bez IAI: medián: 370,6 ng/ml, rozpětí 35,5-1808;  $p = 0,13$ , graf 1).

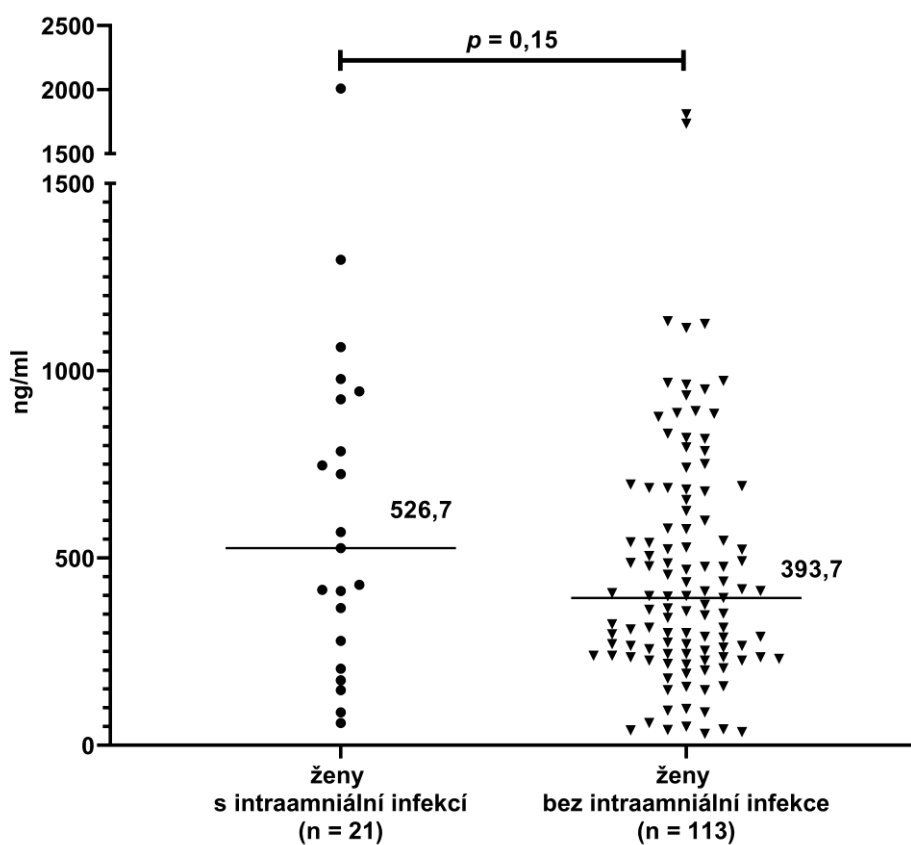
**Graf 1:** Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI



### 5.1.2 Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek bez infekce

Koncentrace C8 v plodové vodě není statisticky vyšší u pacientek s intraamniální infekcí než u pacientek bez infekce (pacientky s intraamniální infekcí: medián: 526,7 ng/ml, rozpětí: 59,6-2009; bez infekce: medián 393,7 ng/ml, rozpětí: 30,6-1808;  $p = 0,15$ , graf 2).

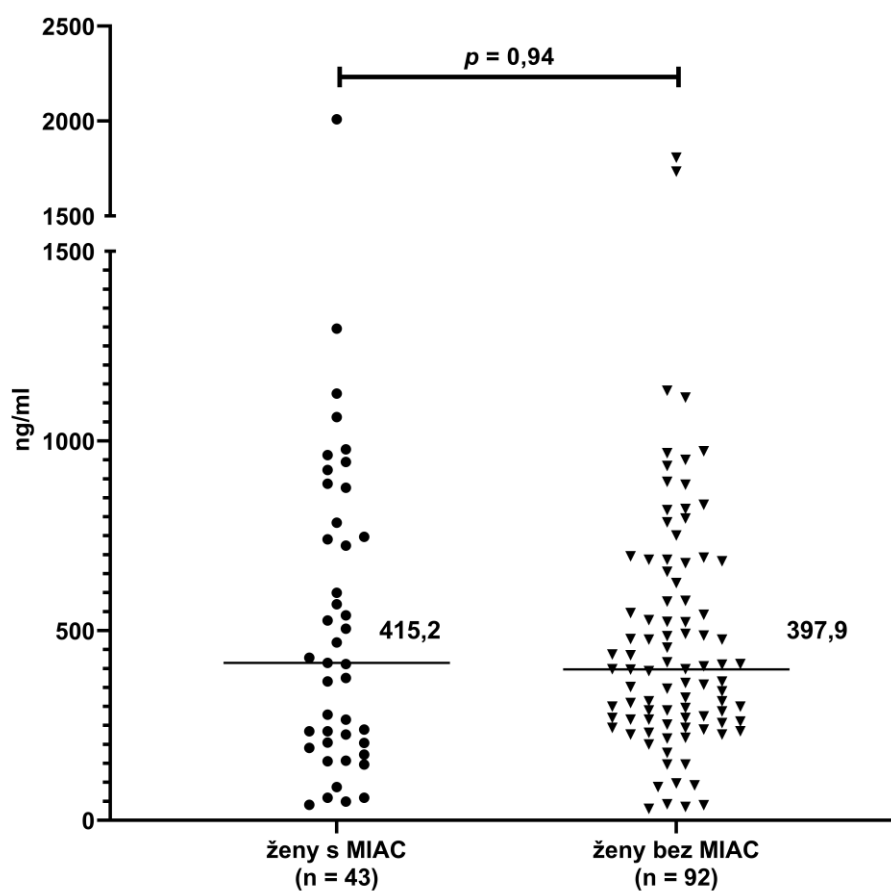
**Graf 2:** Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti intraamniální infekce



### 5.1.3 Porovnání hladin C8 složky komplementového systému u žen s MIAC a bez MIAC

Přítomnost MIAC u pacientek není spojena s vyšší koncentrací C8 v plodové vodě (pacientky s MIAC: medián 415,2 ng/ml, rozpětí: 40,8-2009; pacientky bez MIAC: medián 397,9 ng/ml, rozpětí: 30,6-1808;  $p = 0,94$ , graf 3).

**Graf 3:** Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC

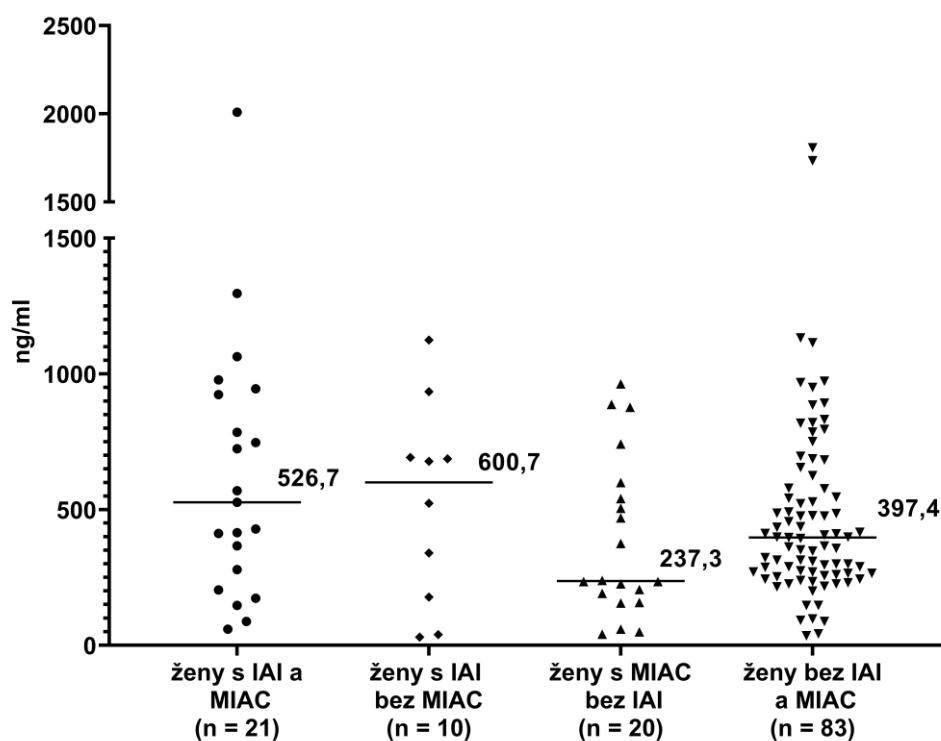


#### 5.1.4 Porovnání hladin komplementové složky C8 u patientek s IAI a/nebo MIAC

Porovnání hladin C8 v plodové vodě u patientek rozdělených podle přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a IAI do čtyř skupin neprokázalo statisticky významně vyšší či nižší hodnoty.

Pacientky se zánětem a současným MIAC (medián 526,7 ng/ml, rozpětí: 59,6-2009), pacientky se sterilním zánětem (medián 600,7 ng/ml, rozpětí: 30,6-1125), pacientky s kolonizací bez probíhajícího zánětu (medián 237,3 ng/ml, rozpětí: 40,8-963,1), pacientky bez komplikací (medián: 397,4 ng/ml, rozpětí: 35,50-1808) (graf 4). Jednotlivé *p*-hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

**Graf 4: Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC**



**Tabulka 2: p-hodnoty C8 složky komplementového systému**

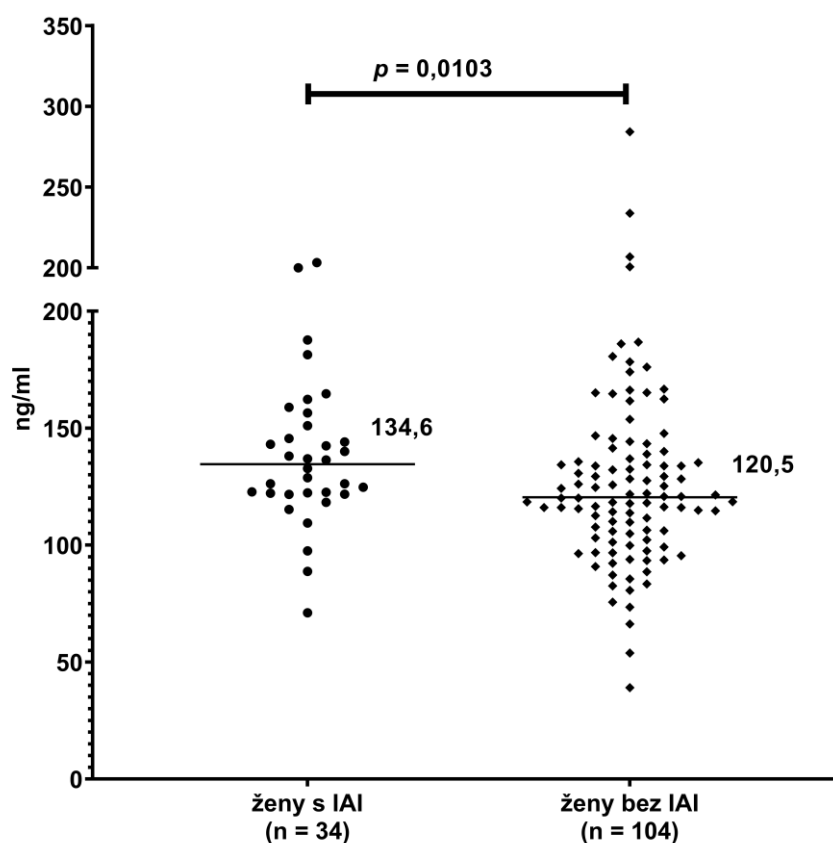
<b>C8</b>	<b>IAI + MIAC (intraamniální infekce)</b>	<b>IAI bez MIAC</b>	<b>MIAC bez IAI</b>	<b>bez IAI a MIAC</b>
<b>IAI a MIAC (intraamniální infekce)</b>	x	$p = 0,5745$	$p = 0,0966$	$p = 0,2002$
<b>IAI bez MIAC</b>	$p = 0,5745$	x	$p = 0,4683$	$p = 0,6226$
<b>MIAC bez IAI</b>	$p = 0,0966$	$p = 0,4683$	x	$p = 0,1359$
<b>bez IAI a MIAC</b>	$p = 0,2002$	$p = 0,6226$	$p = 0,1359$	x

## 5.2 Koncentrace CD59 v plodové vodě u pacientek s PPRM

### 5.2.1 Porovnání hladin CD59 u žen s probíhajícím IAI a bez IAI

U pacientek s IAI byla nalezena statisticky vyšší koncentrace CD59 v plodové vodě než u žen bez IAI (pacientky s IAI: medián 134,6 ng/ml, rozpětí: 71,1-203,3; pacientky bez IAI: medián 120,5 ng/ml, rozpětí: 39,1-284,3;  $p = 0,0103$ , graf 5).

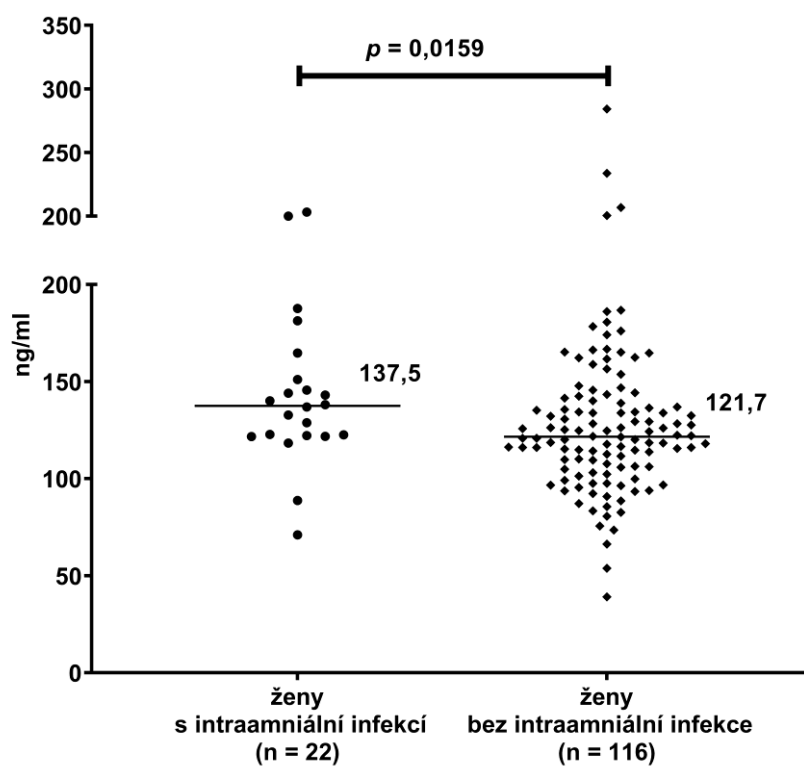
**Graf 5:** Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI



### 5.2.2 Porovnání hladin CD59 u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek bez infekce

U pacientek s intraamniální infekcí byla nalezena vyšší koncentrace CD59 v plodové vodě než u pacientek bez infekce (pacientky s intraamniální infekcí: medián 137,5 ng/ml, rozpětí: 71,1-203,3; pacientky bez infekce: medián 121,7 ng/ml, rozpětí: 39,1-284,3;  $p = 0,0159$ , graf 6).

**Graf 6:** Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti infekce

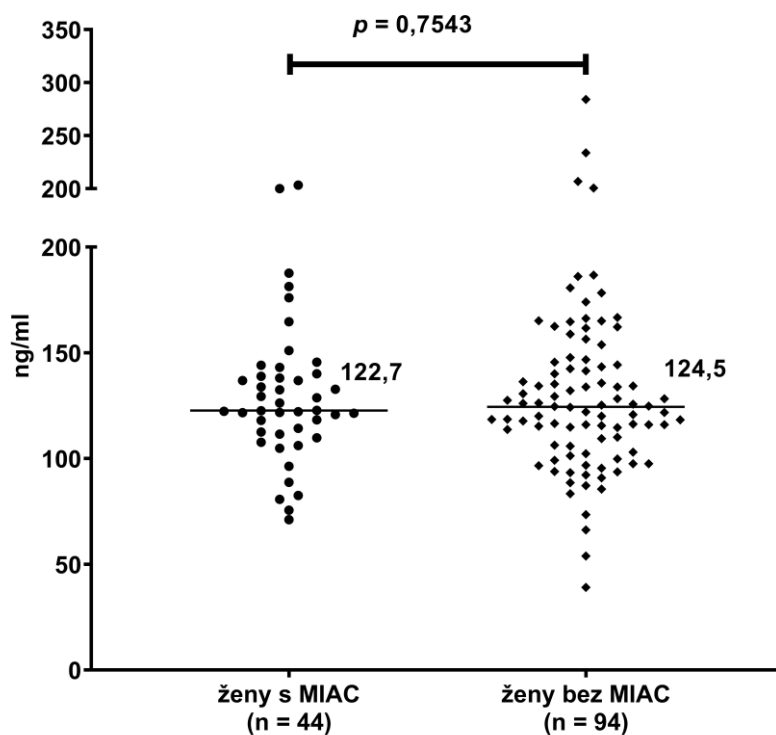




### 5.2.3 Porovnání hladin CD59 u žen s MIAC a bez MIAC

Mezi vzorky od patientek s MIAC a bez MIAC nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v koncentracích CD59 v plodové vodě (patientky s MIAC: medián 122,7 ng/ml, rozpětí: 71,1-203,3; patientky bez MIAC: medián 124,5 ng/ml, rozpětí: 39,1-284,3;  $p = 0,7543$ , graf 7).

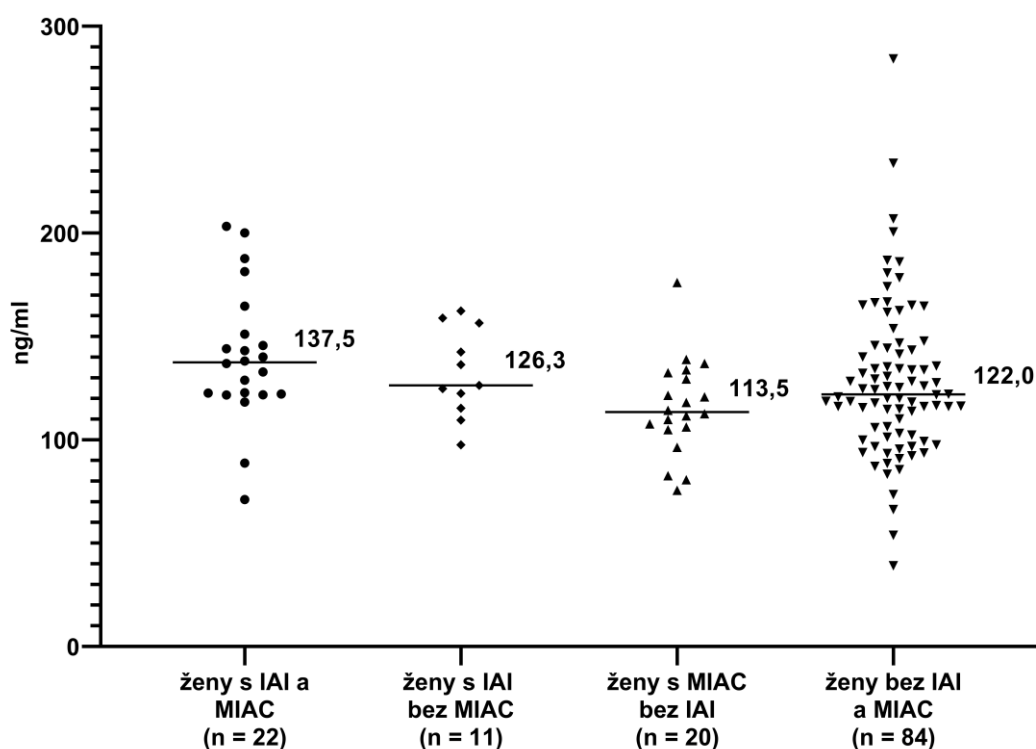
**Graf 7:** Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC



#### 5.2.4 Porovnání hladin komplementové složky CD59 u pacientek s IAI a/nebo MIAC

Při porovnání hladin CD59 v plodové vodě u pacientek, jež byly rozděleny dle přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a IAI do čtyř skupin, byly prokázány statisticky vyšší koncentrace CD59 u pacientek s infekcí (medián 137,5 ng/ml, rozpětí: 71,1-203,3), než u pacientek s prostou kolonizací (medián 113,5 ng/ml, rozpětí: 75,60-176,1,  $p = 0,0013$ ) a u pacientek bez infekce (medián 122,0 ng/ml, rozpětí: 39,1-284,3;  $p = 0,0382$ ). Porovnání hodnot ostatních skupin nepřineslo statisticky významné výsledky (graf 8).

**Graf 8:** Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC



**Tabulka 3: p-hodnoty CD59**

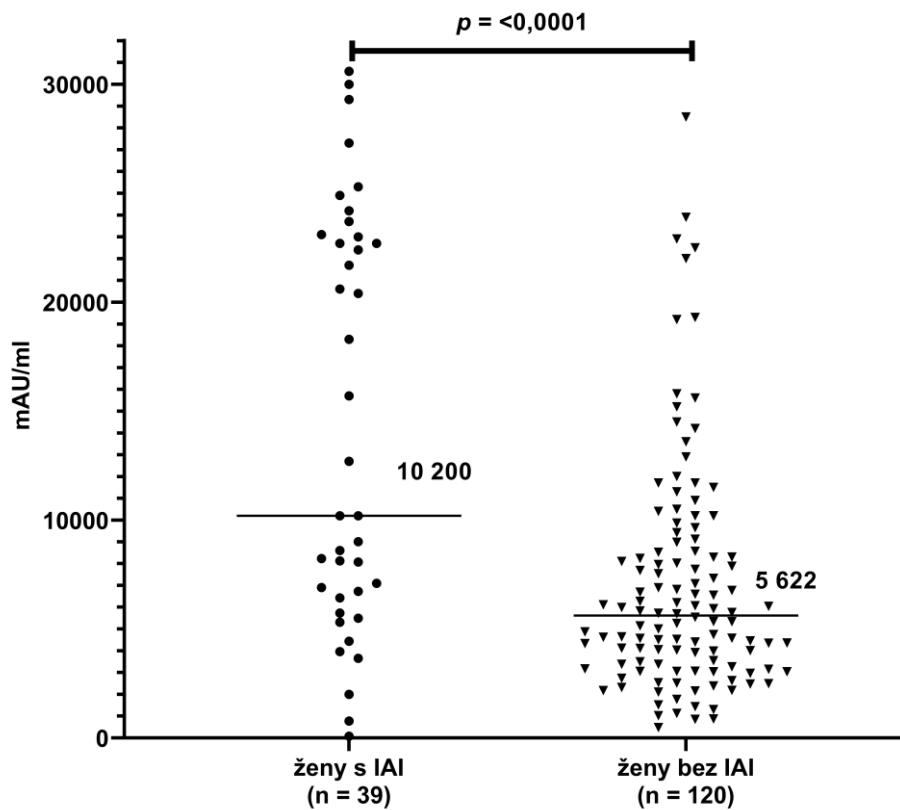
CD59	IAI + MIAC (intraamniální infekce)	IAI bez MIAC	MIAC bez IAI	Bez IAI a MIAC
IAI + MIAC (intraamniální infekce)	x	$p = 0,4859$	<b><math>p = 0,0013</math></b>	<b><math>p = 0,0382</math></b>
IAI bez MIAC	$p = 0,4859$	x	$p = 0,0539$	$p = 0,4256$
MIAC bez IAI	<b><math>p = 0,0013</math></b>	$p = 0,0539$	x	$p = 0,1577$
Bez IAI a MIAC	<b><math>p = 0,0382</math></b>	$p = 0,4256$	$p = 0,1577$	x

## 5.3 Koncentrace TCC u pacientek s PPRM

### 5.3.1 Porovnání hladin TCC u žen s probíhajícím IAI a bez IAI

U pacientek s IAI byla zjištěna vyšší koncentrace TCC v plodové vodě než u pacientek bez IAI (pacientky s IAI: medián 10 200 mAU/ml, rozpětí: 84-30 600; pacientky bez IAI: medián 5 622 mAU/ml, rozpětí: 476-28 500;  $p = <0,0001$ , graf 9).

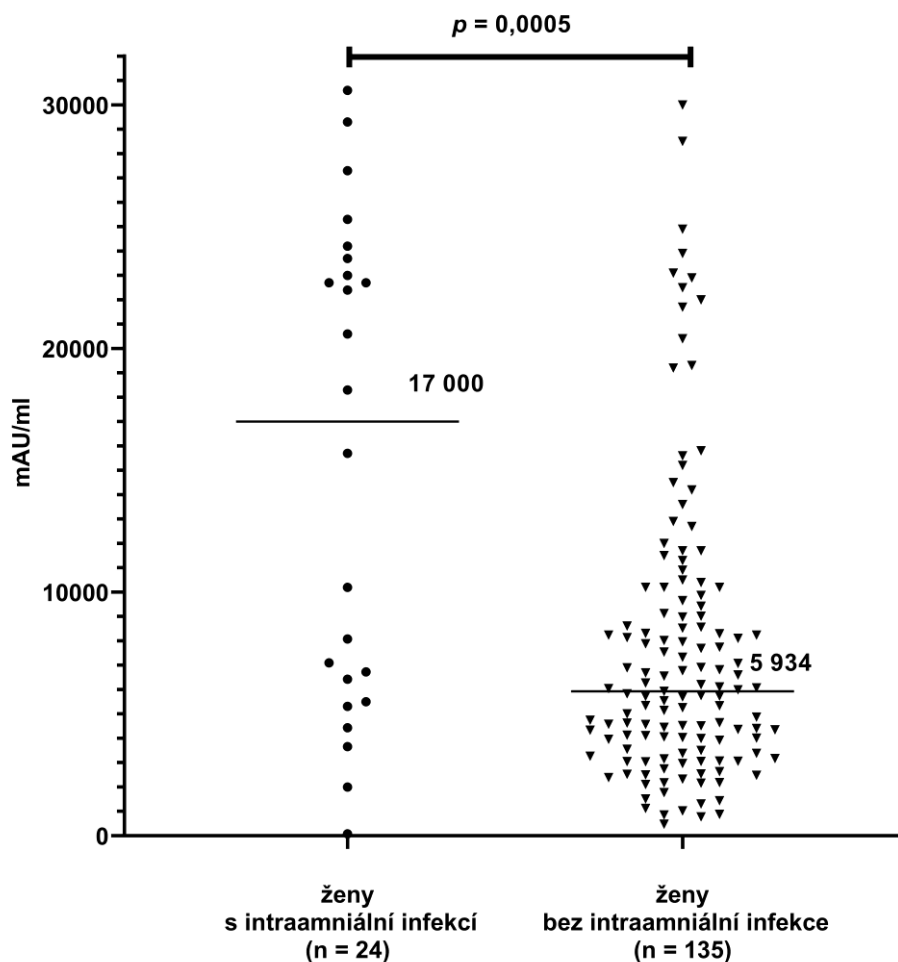
**Graf 9:** Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI



### 5.3.2 Porovnání hladin TCC u patientek s intraamniální infekcí a u patientek bez infekce

Koncentrace TCC je vyšší u patientek s intraamniální infekcí než u patientek bez infekce (patientky s intraamniální infekcí: medián 17 000 mAU/ml, rozpětí: 84-30 600; patientky bez infekce: medián 5 934 mAU/ml, rozpětí: 476-30 000;  $p = 0,0005$ , graf 10).

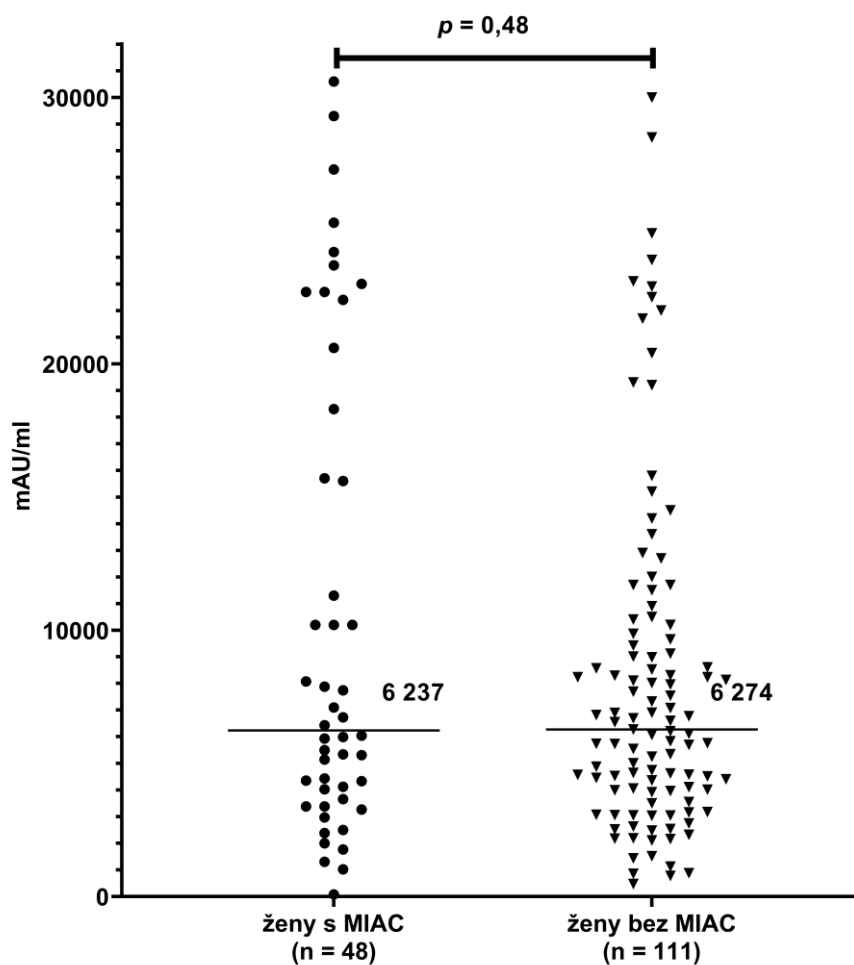
**Graf 10:** Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti intraamniální infekce



### 5.3.3 Porovnání hladin TCC u žen s MIAC a bez MIAC

Koncentrace TCC v plodové vodě nebyla u pacientek s MIAC statisticky vyšší než u pacientek bez MIAC (pacientky s MIAC: medián 6 237 mAU/ml, rozpětí: 84-30 600; bez MIAC: medián 6 274 mAU/ml, rozpětí: 476-30 000;  $p = 0,48$ , graf 11).

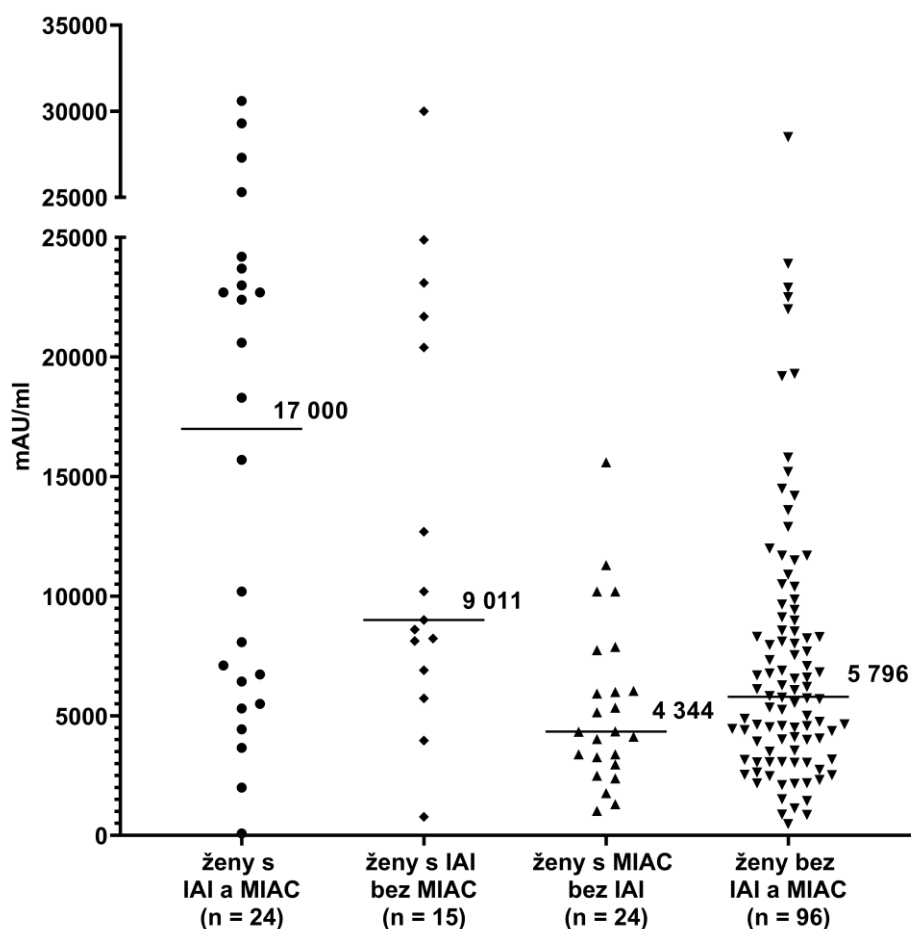
**Graf 11:** Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC



### 5.3.4 Porovnání hladin TCC u pacientek s IAI a/nebo MIAC

V případě rozdělení pacientek do čtyř skupin dosahovaly vzorky od pacientek s intraamniální infekcí (medián 17 000 mAU/ml, rozpětí: 84-30 600) statisticky vyšší koncentrace TCC v plodové vodě oproti pacientkám s prostou kolonizací (medián 4 344, rozpětí: 1 023-15 600,  $p = 0,0002$ ) a bez intraamniální infekce (medián 5 796 ng/ml, rozpětí: 476-28 500,  $p = 0,0005$ ). Rovněž byla zaznamenána statisticky vyšší koncentrace u pacientek se sterilním IAI (medián 9 011, rozpětí: 780-30 000) oproti pacientkám s prostou kolonizací (medián 4 344, rozpětí 1 023-15 600,  $p = 0,0017$ ) a bez infekce (medián 5 796 ng/ml, rozpětí: 476-28 500,  $p = 0,006$ ). Porovnání hladin TCC u pacientek s infekcí a IAI neukázalo statisticky významný rozdíl, stejně jako porovnání hladin u prosté kolonizace a pacientek bez infekce. Bylo zjištěno, že existuje korelace mezi hladinou IL-6 a TCC ( $\rho = 0,30$ ,  $p = 0,0002$ ), z čehož vyplývá, že hladina TCC stoupá s intenzitou zánětlivé odpovědi.

**Graf 12: Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC**



**Tabulka 4: p-hodnoty TCC**

TCC	IAI a MIAC (intraamniální infekce)	IAI bez MIAC	MIAC bez IAI	bez IAI a MIAC
IAI a MIAC (intraamniální infekce)	x	$p = 0,73$	$p = 0,0002$	$p = 0,0005$
IAI bez MIAC	$p = 0,73$	x	$p = 0,0017$	$p = 0,006$
MIAC bez IAI	$p = 0,0002$	$p = 0,0017$	x	$p = 0,12$
bez IAI a MIAC	$p = 0,0005$	$p = 0,006$	$p = 0,12$	x



## 6. DISKUSE

Počet PP celosvětově roste, což je důvodem, proč vědecké skupiny hledají diagnosticky důležité molekuly ve vztahu k této závažné těhotenské komplikaci. Těhotenství s PPRM jsou často komplikována IAI a MIAC. Amniální dutina je za normálních okolností sterilní prostředí. O nález bakterií v plodové vodě se hovoří jako o MIAC a ve většině případů je tento nález považován za patologický, nicméně ne vždy je spojen s horšími perinatologickými následky. MIAC může vést k rozvoji IAI, který je charakterizován vysokými hladinami zánětlivých mediátorů v plodové vodě. Tím dochází k infiltraci placenty a plodových obalů neutrofily a dalšími imunokompetentními buňkami a při této situaci může dojít u plodu k rozvoji syndromu fetální zánětlivé odpovědi. Jedná se o ekvivalent k syndromu systémové zánětlivé odpovědi dospělých. Zánětlivé změny výrazně přispívají ke zvýšení perinatální morbidity a mortality novorozenců [17][82][83].

Léčba PPRM závisí hlavně na gestačním věku a závažnosti klinického projevu. Včasná diagnostika těchto komplikací se proto jeví jako velice důležitá pro nastavení léčby a dalšího léčebného postupu u pacientek s PPRM. V ideálním případě by tyto informace měly být k dispozici během krátké doby od přijetí žen s PPRM. Problém však nastává v nedostatku vhodných biochemických a klinických indikátorů. V této studii byly zkoumány hladiny vybraných molekulárních parametrů v plodové vodě od žen s PPRM, přičemž ženy byly rozděleny do podskupin na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti IAI a MIAC. Jako definici IAI byla použita hodnota IL-6 plodové vodě vyšší než 745 pg /ml [81].

Cílem této práce bylo zhodnotit koncentraci vybraných parametrů, resp. zjistit, zda se vlivem přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a přítomnosti či nepřítomnosti IAI měnila koncentrace zvolených parametrů, případně, zda by některý z vybraných markerů mohl sloužit ke včasné diagnostice PPRM. Pro studii byly zvoleny parametry C8, CD59 a TCC. Jedná se o složky závěrečné fáze komplementové kaskády a protein blokuje tvorbu MAC.

Jako nejvhodnějším biologickým materiálem se pro diagnostiku jeví plodová voda, neboť je v úzké vazbě s plodem. Nevýhodou diagnostiky z plodové vody je nutnost

provést invazivní odběr k získání biologického materiálu, který s sebou nese určité riziko pro matku i plod (infekce při odběru, poškození plodu, vyvolání předčasného porodu). Z výše zmíněných důvodů se odběr tohoto biologického materiálu pravděpodobně nestane rutinou pro screening předčasného porodu. Odběr jiného materiálu, jako je cervikální tekutina, mateřská či pupečnicková krev, je bezrizikový a bez psychické zátěže. Nicméně situace v těchto biologických materiálech přesně nekoreluje se situací v amniální dutině a jejich diagnostický potenciál je nižší než v plodové vodě. Z toho důvodu je pro vědecké hledání vhodných markerů často využíván vzorek plodové vody.

Kaskáda komplementu byla identifikována před více než 100 lety, avšak vyšetřování komplementového systému ve vztahu k těhotenství zůstává stále v oblasti výzkumu. Inhibitory komplementu, jež jsou na rozhraní matky a plodu, zabraňují nevhodné aktivaci komplementu a tím dochází k ochraně plodu. Celá kaskáda příznivě ovlivňuje jednotlivá stadia těhotenství, včetně implantace, vývoje plodu i porodu. Na druhé straně však nevhodná aktivace komplementu v těhotenství může mít nepříznivý vliv na matku a plod [72].

Mnoho studií prováděných u pacientek s diagnostikou PP, poukazuje na fakt, že aktivace komplementu v patogenezi PP hraje důležitou roli. Bylo prokázáno, že u žen se zvýšeným faktorem komplementu Bb na počátku těhotenství byla čtyřikrát vyšší pravděpodobnost předčasného porodu než u žen s nižšími hladinami [84]. Také byly v plodové vodě žen s PP a s mikrobiální invazí do plodové dutiny detekovány zvýšené koncentrace faktorů komplementu C3a, C4a, C5a a Bb [85]. Výsledky studií naznačují, že mechanismy vedoucí k PP a porodu v termínu se zásadně liší, pokud jde o roli aktivace komplementu [86]. Dosavadní studie byly zaměřeny především na počátek dráhy aktivace komplementu, největší pozornost získaly komponenty C3 a C5. Tato práce pojednává o konečných komponentách komplementové kaskády, což může mít potenciál vedoucí ke zlepšení chápání infekčních a zánětlivých komplikací PPRM.

Měření koncentrace **komplementové složky C8**, jež se účastní sestavení MAC, nebyl zjištěn staticky významný rozdíl v koncentracích u jednotlivých skupin pacientek v závislosti na přítomnosti či absenci IAI nebo MIAC. C8 iniciuje penetraci membránou a koordinuje tvorbu MAC pórů. Je prokázáno, že buňky, které reagovaly se sedmi

složkami komplementu (C1-C7), jsou zjevně neporušené, pokud jde o funkci membrány, avšak tyto buňky po reakci s komplementovou složkou C8 podléhají lýze. Cytolýza indukovaná C8 je nezávislá na komplementární složce C9, resp. v nepřítomnosti C9 probíhá pomalou rychlostí, která je však po přidání terminální složky velmi zrychlena. C8 lze tedy považovat za protein komplementu, který je přímo zodpovědný za poškození membrány závislém na komplementu. Komponenty komplementu C1q a C5b-9 jsou exprimovány na povrchu buněk plodových obalů a stimulují buňky ve svém okolí k uvolnění zánětlivých mediátorů, které přispívají ke kontrakcím dělohy, zrání děložního hrdla, buněčné chemotaxi, produkci metaloproteináz, aktivaci a prasknutí obalů. Tyto poznatky naznačují, že existuje systémová imunitní odpověď matky na mikrobiální produkty působící v děložní dutině. Je dostatek informací o změnách koncentrací anafylatoxinů v plodové vodě během mikrobiální invaze intraamniální dutiny [72][73]. Zdá se, že koncentrace C8 je konstitutivní a zánět či přítomnost bakterií neměly vliv na zvýšení koncentrace této složky.

Obdobně jako u předchozích fází komplementové kaskády je i konečná lytická fáze řízena mnoha regulačními mechanismy. Regulací se předchází nežádoucímu sestavení MAC na vlastních buňkách. Regulace probíhá již na úrovni vzniku C5 konvertázy, kdy je pro její indukci zapotřebí aktivace přibližně sto molekul složky C3. **CD59** neboli protektin patří mezi regulátory komplementového systému, a to tím, že brání sestavení MAC. Molekuly protektinu mají schopnost snadno se pohybovat v membráně a schopnost akumulace, čímž účinně brání sestavení komplexu MAC. CD59 je exprimován na několika typech buněk, jako jsou leukocyty, endoteliální buňky, epiteliální buňky a erytrocyty. Nachází se také ve vysoké hustotě na membránách buněk trofoblastu na rozhraní matka/plod [87].

V případě **protektinu** bylo hlavním zjištěním, že: (i) u skupin pacientek, jejichž diagnóza je komplikována IAI, je statisticky vyšší koncentrace protektinu než u žen bez zánětu, (ii) ženy s infekcí mají vyšší koncentraci CD59 v plodové vodě než ženy bez infekce, (iii) MIAC neměla na výslednou koncentraci CD59 v plodové vodě významný vliv. Při porovnání hladin CD59 v plodové vodě u pacientek, jež byly rozděleny dle přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a IAI do čtyř skupin, byly prokázány statisticky vyšší koncentrace

CD59 u pacientek s IAI a MIAC než u pacientek (i) bez probíhajícího zánětu s MIAC a u pacientek (ii) bez probíhajícího zánětu a bez MIAC. Z těchto výsledků se dá dojít k závěru, že na zvýšení koncentrace protektinu měl vliv spíše samotný zánět než přítomnost bakterií. Statisticky významný rozdíl u pacientek se sterilním a nesterilním zánětem nebyl nalezen. K tomuto stavu zřejmě dochází vlivem vyšší aktivity komplementového systému z důvodu probíhajícího zánětu a zároveň tedy zvýšením exprese protektinu jako ochrana fetoplacentární jednotky před poškozením zprostředkovaným komplementem.

**Terminální komplex komplementu** má mnoho funkcí, cytolytická aktivita je však jednou z hlavních a nejdůležitějších funkcí. V případě poruchy jednotlivých složek komplementového systému dochází k různým klinickým projevům, které se však mohou u jednotlivých deficitů kombinovat. Jedná se o velmi vzácná onemocnění. Projevem deficitu terminálních složek komplementu C5-C9 jsou diseminované a závažné meningokokové infekce [88].

Existuje studie, že TCC je silný prozánětlivý komplex působící aktivačně na endoteliální a fagocytární buňky. Dalšími funkcemi je stimulace produkce různých biologicky aktivních látek, včetně mediátorů zánětu jako jsou volné radikály kyslíku a cytokinů. Po vložení TCC do buněčné membrány dojde ke zvýšení propustnosti membrány, čímž se spustí mnoho intracelulárních signálních cest, což vede k produkci různých biologicky aktivních látek. Tyto látky mají pozitivní vliv na odstraňování patogenů a zesílení zánětlivé reakce. TCC také podpoří expresi p-selektinu v endoteliálních buňkách, což může zvýšit adhezi neutrofilů, krevních destiček a monocytů a poté urychlit uvolňování zánětlivých mediátorů [89].

Stanovením koncentrace TCC bylo zjištěno, že je vyšší koncentrace TCC u pacientek (i) s IAI než bez IAI, (ii) s intraamniální infekcí než bez infekce. U žen (iii) s MIAC nebyla nalezena vyšší koncentrace TCC než u žen bez MIAC. Také bylo zjištěno, že pacientky s intraamniální infekcí měly statisticky vyšší koncentrace TCC v plodové vodě oproti pacientkám s (i) prostou kolonizací a (ii) bez infekce. Rovněž byla zaznamenána statisticky vyšší koncentrace u pacientek se sterilním IAI oproti pacientkám (i) s prostou kolonizací a (ii) bez infekce. Bylo zjištěno, že existuje korelace mezi hladinou IL-6 a TCC, z čehož vyplývá, že hladina TCC stoupá s intenzitou zánětlivé odpovědi.

Silnou stránkou předkládané práce je, že jako první přináší výsledky týkající se terminální fáze komplementového systému. Dřívější studie jsou zaměřené na jiné složky komplementového systému, jako C3, C3a, C5, C5a, fragment Bb apod. Další výhodou této práce je stratifikace pacientek do skupin dle IAI a MIAC. Je však nutné přiznat, že tato práce také podléhá určitým limitům. Není známo, v jaké míře se na produkci zkoumaných molekul, kromě imunokompetentních buněk, podílí buňky plodových obalů. Jaký je tedy přesný zdroj zkoumaných molekul. Studie by v budoucnu mohla být doplněna o stanovení vybraných markerů v cervikální tekutině a také ve skupině pacientek s diagnózou PTL.

## 7. ZÁVĚR

Práce měla za cíl stanovit koncentraci vybraných složek komplementu v plodové vodě u pacientek s PPRM. Zhodnotit, zda se koncentrace dané látky mění v závislosti na přítomnosti MIAC a IAI.

Práce v souhrnu přinesla zjištění, že přítomnost IAI a MIAC nemá vliv na zvýšení koncentrace C8 v plodové vodě. U TCC i regulačního proteinu CD59 byla zjištěna zvýšená hladina s ohledem na IAI a intraamniální infekci. Z výsledků vyplývá, že samotná přítomnost bakterií nemá vliv na spuštění komplementu, naopak zánět ať už sterilní či důsledkem intraamniální infekce má vliv na zvýšení koncentrace TCC a CD59. Získané výsledky vhodně doplňují dříve publikované studie o složkách počátečních fází komplementové kaskády (C3, C5, C4) a dalších molekulách ve vztahu k PPRM.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
Arg	Arginin
C1-C9	Komplementová složka 1-9
C8G	Komplementová složka C8 Gamma
C1-INH	C1-inhibitor
C4bp	C4 vázající protein (z angl. C4-binding protein)
CD	Diferenciační skupina (z angl. Cluster of differentiation)
CRP	C-reaktivní protein
DAF	Faktor urychlující rozpad (z angl. Decay-accelerating factor)
EGF-receptor	Receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. Epidermal growth factor receptor)
ELISA	Enzym linked immuno sorbent assay
Gly	Glycin
GPI	Glykosylfosfatidylinositolová kotva
His	Histidin
IAI	Intraamniální zánět (z angl. Intraamniacal inflammation)
IGFBP-1	Inzulinu podobný růstový faktor vázající protein-1 (z angl. Insulin-like growth factor-binding protein-1)
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LDL-receptor	Receptor pro nízkodenzní lipoprotein (z angl. Low-density lipoprotein-receptor)
Leu	Leucin

MAC	Membránu atakující komplex (z angl. Membrane attack complex)
MACPF	Membránu atakující komplex/perforin (z angl. Membrane attack complex/perforin)
MASP-1	Serinová proteáza- 1 asociovaná s lektinem vázajícím manózu (z angl. Mannan-binding lectin-associated serine proteases-1)
MASP-2	Serinová proteáza-2 asociovaná s lektinem vázajícím manózu (z angl. Mannan-binding lectin-associated serine proteases-2)
MBL	Lektin vázající manózu (z angl. Mannan-binding lectin)
MCP	Membránový proteinový kofaktor (z angl. Membrane cofactor protein)
MIAC	Mikrobiální invaze do amniální dutiny (z angl. Microbial invasion of the amniotic cavity)
PAMG-1	Placentární alfa-mikroglobulin-1 (z angl. placental alpha microglobulin-1)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)
POCT	Testování v místě péče o pacienta (z angl. Point of care testing)
PP	Předčasný porod
PPROM	Předčasný porod s předčasným odtok plodové vody (z angl. Preterm premature rupture of membranes)
PROM	Předčasný odtok plodové vody (z angl. Premature rupture of membranes)
PTL	Předčasný porod se zachovaným vakem blan (z angl. Preterm labor)
PTX3	Pentraxin 3
TCC	Terminální komplementový komplex (z angl. Terminal complement complex)
Th1/Th2	T pomocný lymfocyt ½ (z angl. T helper cell 1/2)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor nekrotizující faktor-α (z angl. Tumor necrosis factor-α)



## 9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI .....	42
Graf 2: Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti intraamniální infekce.....	43
Graf 3: Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC.....	44
Graf 4: Koncentrace C8 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC .....	45
Graf 5: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI .....	47
Graf 6: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti infekce.....	48
Graf 7: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC .....	49
Graf 8: Koncentrace CD59 v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC.....	50
Graf 9: Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI .....	52
Graf 10: Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti intraamniální infekce....	53
Graf 11: Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti MIAC.....	54
Graf 12: Koncentrace TCC v plodové vodě v závislosti na přítomnosti IAI a/nebo MIAC .....	56

## 10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Demografická a epidemiologická charakteristika pacientek s PPRM podle přítomnosti či nepřítomnosti MIAC a / nebo IAI.....	41
Tabulka 2: p-hodnoty C8 složky komplementového systému .....	46
Tabulka 3: p-hodnoty CD59.....	51
Tabulka 4: p-hodnoty TCC.....	56

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] M. Rouzaire *et al.*, “Predictors of Short Latency Period Exceeding 48 h after Preterm Premature Rupture of Membranes,” *J. Clin. Med.*, vol. 10, no. 1, p. 150, Jan. 2021, doi: 10.3390/jcm10010150.
- [2] J. A. Quinn *et al.*, “Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data,” *Vaccine*, 2016, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.045.
- [3] R. F. Lamont and J. S. Jørgensen, “Safety and Efficacy of Tocolytics for the Treatment of Spontaneous Preterm Labour,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 25, no. 5, pp. 577–592, Apr. 2019, doi: 10.2174/1381612825666190329124214.
- [4] H. Blencowe *et al.*, “Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births,” *Reprod. Health*, vol. 10, no. SUPPL. 1, p. S2, 2013, doi: 10.1186/1742-4755-10-S1-S2.
- [5] H. M. Georgiou, M. K. W. Di Quinzio, M. Permezel, and S. P. Brennecke, “Predicting Preterm Labour: Current Status and Future Prospects,” *Disease Markers*, vol. 2015. Hindawi Limited, 2015, doi: 10.1155/2015/435014.
- [6] J. Chatterjee, J. Gullam, M. Vatish, and S. Thornton, “The management of preterm labour,” *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, vol. 92, no. 2. BMJ Publishing Group, p. F88, Mar. 2007, doi: 10.1136/adc.2005.082289.
- [7] S. Y. Kook, K. H. Park, J. A. Jang, Y. M. Kim, H. Park, and S. J. Jeon, “Vitamin D-binding protein in cervicovaginal fluid as a non-invasive predictor of intraamniotic infection and impending preterm delivery in women with preterm labor or preterm premature rupture of membranes,” *PLoS One*, vol. 13, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0198842.
- [8] C. Phillips, Z. Velji, C. Hanly, and A. Metcalfe, “Risk of recurrent spontaneous preterm birth: A systematic review and meta-analysis,” *BMJ Open*, vol. 7, no. 6. BMJ Publishing Group, Jun. 01, 2017, doi: 10.1136/bmjopen-2016-015402.
- [9] B. R. de A. Ramos *et al.*, “Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: A case control study,” *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 16, no. 1, Feb. 2016, doi: 10.1186/s12884-016-0823-1.
- [10] A. B. Caughey, J. N. Robinson, and E. R. Norwitz, “Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes,” *Rev. Obstet. Gynecol.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–22, 2008, Accessed: Feb. 18, 2021. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701929>.

- [11] T. M. Medina and D. A. Hill, "Preterm premature rupture of membranes: Diagnosis and management," *Am. Fam. Physician*, 2006, doi: 10.5005/jp/books/10466\_13.
- [12] B. M. Mercer, "Preterm premature rupture of the membranes: Current approaches to evaluation and management," *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2005, doi: 10.1016/j.ogc.2005.03.003.
- [13] R. Menon and L. S. Richardson, "Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes," *Semin. Perinatol.*, vol. 41, no. 7, pp. 409–419, Nov. 2017, doi: 10.1053/j.semperi.2017.07.012.
- [14] A. Capece, O. Vasieva, S. Meher, Z. Alfirevic, and A. Alfirevic, "Pathway analysis of genetic factors associated with spontaneous preterm birth and pre-labor preterm rupture of membranes," *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108578.
- [15] D. A. Savitz, C. A. Blackmore, and J. M. Thorp, "Epidemiologic characteristics of preterm delivery: Etiologic heterogeneity," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, doi: 10.1016/S0002-9378(11)80001-3.
- [16] E. L. Stuart, G. S. Evans, Y. S. Lin, and H. J. Powers, "Reduced collagen and ascorbic acid concentrations and increased proteolytic susceptibility with prelabor fetal membrane rupture in women," *Biol. Reprod.*, 2005, doi: 10.1095/biolreprod.104.033381.
- [17] I. Musilova et al., "Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabor rupture of membranes," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0133929, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0133929.
- [18] R. F. Lamont, "Infection in the prediction and antibiotics in the prevention of spontaneous preterm labour and preterm birth," 2003, doi: 10.1016/S1470-0328(03)00034-X.
- [19] V. Agrawal and E. Hirsch, "Intrauterine infection and preterm labor," *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2012, doi: 10.1016/j.siny.2011.09.001.
- [20] Y. Da Fan, J. G. Pastorek, J. M. Miller, and J. Mulvey, "Acute Pyelonephritis in Pregnancy," *Am. J. Perinatol.*, 1987, doi: 10.1055/s-2007-999800.
- [21] T. J. Benedetti, R. Valle, and W. J. Ledger, "Antepartum pneumonia in pregnancy," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1982, doi: 10.1016/0002-9378(82)90246-0.
- [22] X. Xiong, P. Buekens, W. D. Fraser, J. Beck, and S. Offenbacher, "Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: A systematic review," *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2006, doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00827.x.

- [23] R. Romero, J. Espinoza, L. F. Gonçalves, J. P. Kusanovic, L. Friel, and S. Hassan, "The role of inflammation and infection in preterm birth," *Seminars in Reproductive Medicine*. 2007, doi: 10.1055/s-2006-956773.
- [24] M. Nikiforou *et al.*, "Intra-amniotic *Candida albicans* infection induces mucosal injury and inflammation in the ovine fetal intestine," *Sci. Rep.*, 2016, doi: 10.1038/srep29806.
- [25] M. S. Payne *et al.*, "Intrauterine *Candida albicans* infection elicits severe inflammation in fetal sheep," *Pediatr. Res.*, vol. 75, no. 6, p. 716, 2014, doi: 10.1038/PR.2014.35.
- [26] B. Vavřinková, "Aktuální gynekologie a porodnictví - Předčasný porod," *Actual Gyn* 2009, Accessed: Feb. 16, 2021. [Online]. Available: [https://www.actualgyn.com/pdf/cz\\_2009\\_13.pdf](https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2009_13.pdf).
- [27] G. A. Dekker, S. Y. Lee, R. A. North, L. M. McCowan, N. A. B. Simpson, and C. T. Roberts, "Risk factors for preterm birth in an international prospective cohort of nulliparous women," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039154.
- [28] E. Greco, R. Gupta, A. Syngelaki, L. C. Y. Poon, and K. H. Nicolaides, "First-trimester screening for spontaneous preterm delivery with maternal characteristics and cervical length," *Fetal Diagn. Ther.*, 2012, doi: 10.1159/000335686.
- [29] V. Berghella, J. K. Baxter, and N. W. Hendrix, "Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm delivery," *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013, doi: 10.1002/14651858.CD007235.pub3.
- [30] R. Shankar, N. Gude, F. Cullinane, S. Brennecke, A. W. Purcell, and E. K. Moses, "An emerging role for comprehensive proteome analysis in human pregnancy research," *Reproduction*. 2005, doi: 10.1530/rep.1.00524.
- [31] R. Shankar *et al.*, "Molecular markers of preterm labor in the choriodecidua," *Reprod. Sci.*, 2010, doi: 10.1177/1933719109353454.
- [32] A. Měchurová, "Doporučený postup - předčasný odtok plodové vody," *Česká Gynekol.*, vol. 67, no. supplementum, pp. 33–36, 2002.
- [33] M. Kacerovsky, I. Musilova, T. Bestvina, M. Stepan, T. Cobo, and B. Jacobsson, "Preterm Prelabor Rupture of Membranes between 34 and 37 Weeks: A Point-of-Care Test of Vaginal Fluid Interleukin-6 Concentrations for a Noninvasive Detection of Intra-Amniotic Inflammation," *Fetal Diagn. Ther.*, 2018, doi: 10.1159/000477617.
- [34] L. Marcellin *et al.*, "Analyse comparative de deux tests diagnostiques de rupture prématurée des membranes dans les sécrétions cervico-vaginales," *J. Gynecol. Obstet. Biol. la Reprod.*, 2011, doi: 10.1016/j.jgyn.2011.06.007.

- [35] C. Bon, V. Bon, F. Vaudoyer, M. Roubille, and J. Pichot, "Détection rapide de l'insulin-like growth factor-binding protein-1 dans les sécrétions cervico-vaginales: Comparaison avec le test à la diamine-oxydase pour le diagnostic de la rupture prématurée des membranes," *Immuno-Analyse Biol. Spec.*, 2002, doi: 10.1016/S0923-2532(02)01230-9.
- [36] A. El-Messidi and A. Cameron, "Diagnosis of Premature Rupture of Membranes: Inspiration From the Past and Insights for the Future," *J. Obstet. Gynaecol. Canada*, 2010, doi: 10.1016/S1701-2163(16)34525-X.
- [37] L. Marcellin *et al.*, "Comparison of two bedside tests performed on cervicovaginal fluid to diagnose premature rupture of membranes," *J. Gynécologie Obs. Biol. la Reprod.*, 2011, doi: 10.1016/j.jgyn.2011.06.007.
- [38] N. L. Hezelgrave, A. H. Shennan, and A. L. David, "Tests to predict imminent delivery in threatened preterm labour," *BMJ*, 2015, doi: 10.1136/bmj.h2183.
- [39] I. A. Abdelazim and H. H. Makhlof, "Placental alpha microglobulin-1 (AmniSure-test) for detection of premature rupture of fetal membranes," *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2012, doi: 10.1007/s00404-011-2106-4.
- [40] S. C. Ellestad, G. K. Swamy, T. Sinclair, A. H. James, R. P. Heine, and A. P. Murtha, "Preterm premature rupture of membrane management-inpatient versus outpatient: A retrospective review," *Am. J. Perinatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 69–73, Jan. 2008, doi: 10.1055/s-2007-1004830.
- [41] E. Catt, R. Chadha, S. Tang, E. Palmquist, and I. Lange, "Management of Preterm Premature Rupture of Membranes: A Comparison of Inpatient and Outpatient Care," *J. Obstet. Gynaecol. Canada*, vol. 38, no. 5, pp. 433–440, 2016, doi: 10.1016/j.jogc.2016.03.001.
- [42] M. Beckmann and G. Gardener, "Hospital versus outpatient care for preterm pre-labour rupture of membranes," *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 53, no. 2, pp. 119–124, Apr. 2013, doi: 10.1111/ajo.12021.
- [43] V. Tambor *et al.*, "Amniotic fluid cathelicidin in pprom pregnancies: From proteomic discovery to assessing its potential in inflammatory complications diagnosis," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, Jul. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041164.
- [44] M. Kacerovsky, "Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu," 2018, Accessed: Mar. 15, 2021. [Online]. Available: <https://www.labor-aktuell.cz/predcasny-odtok-plodove-vody-pred-terminem-porodu>.
- [45] S. Dayal and P. L. Hong, "Premature Rupture Of Membranes - StatPearls - NCBI Bookshelf.", Accessed: Mar. 18, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532888/>.

- [46] Z. Hájek, "Farmakoterapie předčasného porodu - tokolytika, kortikosteroidy," *Klin Farmakol Farm*, vol. 22, no. 4, pp. 142–144, 2008.
- [47] V. P. Kacerovský M., Kokrdová Z., Koucký M., Křepelka P., Lamberská T., Mašata J., Měchurová A., Pařízek A., Smíšek J., Šimják P., "Spontánní předčasný porod - Doporučený postup," *Česká Gynekol.*, vol. 82, no. 2, pp. 160–165, 2017.
- [48] G. Ventolini, R. Neiger, L. Mathews, N. Adragna, and M. Belcastro, "Incidence of respiratory disorders in neonates born between 34 and 36 weeks of gestation following exposure to antenatal corticosteroids between 24 and 34 weeks of gestation," *Am. J. Perinatol.*, vol. 25, no. 2, pp. 79–83, Feb. 2008, doi: 10.1055/s-2007-1022470.
- [49] O. Zapletalová and J. Krejsek, "Multiple sclerosis, pregnancy, maternity, and breastfeeding," *Ces. a Slov. Neurol. a Neurochir.*, vol. 82, no. 2, pp. 161–165, 2019, doi: 10.14735/AMCSNN2019161.
- [50] L. Sykes, D. A. MacIntyre, X. J. Yap, T. G. Teoh, and P. R. Bennett, "The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour," *Mediators of Inflammation*, vol. 2012. Hindawi Limited, p. 12, 2012, doi: 10.1155/2012/967629.
- [51] P. Luppi, "How immune mechanisms are affected by pregnancy," in *Vaccine*, Jul. 2003, vol. 21, no. 24, pp. 3352–3357, doi: 10.1016/S0264-410X(03)00331-1.
- [52] M. Kühnert, R. Strohmeier, M. Stegmüller, and E. Halberstadt, "Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy," *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 76, no. 2, pp. 147–151, Feb. 1998, doi: 10.1016/S0301-2115(97)00180-2.
- [53] S. S. W. Chow *et al.*, "Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection," *Cytokine*, vol. 44, no. 1, pp. 78–84, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.cyto.2008.06.009.
- [54] M. R. Shurin, L. Lu, P. Kalinski, A. M. Stewart-Akers, and M. T. Lotze, "Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy," *Springer Seminars in Immunopathology*, vol. 21, no. 3. Springer Verlag, pp. 339–359, 1999, doi: 10.1007/BF00812261.
- [55] A. C. Zenclussen, "Adaptive Immune Responses During Pregnancy," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 69, no. 4. pp. 291–303, Apr. 2013, doi: 10.1111/aji.12097.
- [56] D. Muzzio, M. Zygmunt, and F. Jensen, "The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 5, no. APR. Frontiers Research Foundation, 2014, doi: 10.3389/fendo.2014.00039.

- [57] C. Kanellopoulos-Langevin, S. M. Caucheteux, P. Verbeke, and D. M. Ojcius, "Tolerance of the fetus by the maternal immune system: Role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 1. BioMed Central, p. 121, Dec. 02, 2003, doi: 10.1186/1477-7827-1-121.
- [58] S. Park *et al.*, "Cervicovaginal fluid cytokines as predictive markers of preterm birth in symptomatic women," *Obstet. Gynecol. Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 455–463, 2020, doi: 10.5468/OGS.19131.
- [59] I. Musilova *et al.*, "Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabor rupture of membranes," *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0133929.
- [60] J. G. Padron, C. A. Saito Reis, and C. E. Kendal-Wright, "The Role of Danger Associated Molecular Patterns in Human Fetal Membrane Weakening," *Frontiers in Physiology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., p. 602, Jun. 17, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00602.
- [61] E. Vaisbuch *et al.*, "Activation of the alternative pathway of complement is a feature of pre-term parturition but not of spontaneous labor at term," *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 63, no. 4, pp. 318–330, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00800.x.
- [62] M. Noris and G. Remuzzi, "Overview of complement activation and regulation," *Semin. Nephrol.*, vol. 33, no. 6, pp. 479–492, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.001.
- [63] M. Sobotková, "Poruchy v komplementovém systému," *Vnitřní lékařství*, vol. 66, no. 6, pp. 346–352, 2020, doi: 10.36290/vnl.2020.100.
- [64] K. J. Denny, T. M. Woodruff, S. M. Taylor, and L. K. Callaway, "Complement in Pregnancy: A Delicate Balance," *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 69, no. 1, pp. 3–11, 2013, doi: 10.1111/aji.12000.
- [65] M. J. Walport, "Complement. First of two parts.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 14, pp. 1058–66, Apr. 2001, doi: 10.1056/NEJM200104053441406.
- [66] M. J. Walport, "Advances in immunology: Complement (second of two parts)," *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 15, pp. 1140–114, Aug. 2001, doi: 10.1056/NEJM200104123441506.
- [67] E. Vaisbuch *et al.*, "NIH Public Access," vol. 22, no. 10, pp. 905–916, 2013, doi: 10.1080/14767050902994663.Fragment.
- [68] M. Cedzyński and A. S. Świerzko, "Components of the lectin pathway of complement in haematologic malignancies," *Cancers*, vol. 12, no. 7. MDPI AG, pp. 1–18, Jul. 01, 2020, doi: 10.3390/cancers12071792.

- [69] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik, "The complement system and innate immunity," 2001, Accessed: May 13, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>.
- [70] C. B. Xie, D. Jane-Wit, and J. S. Pober, "Complement Membrane Attack Complex: New Roles, Mechanisms of Action, and Therapeutic Targets," *American Journal of Pathology*, vol. 190, no. 6. Elsevier Inc., pp. 1138–1150, Jun. 01, 2020, doi: 10.1016/j.ajpath.2020.02.006.
- [71] D. J. Doorduyn, S. H. M. Rooijackers, and D. A. C. Heesterbeek, "How the Membrane Attack Complex Damages the Bacterial Cell Envelope and Kills Gram-Negative Bacteria," *BioEssays*, vol. 41, no. 10. John Wiley and Sons Inc., p. 1900074, Oct. 01, 2019, doi: 10.1002/bies.201900074.
- [72] G. Girardi, J. J. Lingo, S. D. Fleming, and J. F. Regal, "Essential Role of Complement in Pregnancy: From Implantation to Parturition and Beyond," *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., p. 1681, Jul. 31, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01681.
- [73] N. Galindo-Sevilla, F. Reyes-Arroyo, and J. Mancilla-Ramírez, "The role of complement in preterm birth and prematurity," *J. Perinat. Med.*, vol. 47, no. 8, pp. 793–803, 2019, doi: 10.1515/jpm-2019-0175.
- [74] A. M. Lynch *et al.*, "Complement activation fragment Bb in early pregnancy and spontaneous preterm birth," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 199, no. 4, pp. 354.e1-354.e8, 2008, doi: 10.1016/j.ajog.2008.07.044.
- [75] C. L. Brannen and J. M. Sodetz, "Incorporation of human complement C8 into the membrane attack complex is mediated by a binding site located within the C8 $\beta$  MACPF domain," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 5, pp. 960–965, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.molimm.2006.03.012.
- [76] D. Bubeck, P. Roversi, R. Donev, B. P. Morgan, O. Llorca, and S. M. Lea, "Structure of human complement C8, a precursor to membrane attack," *J. Mol. Biol.*, vol. 405, no. 2, pp. 325–330, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.031.
- [77] B. Cai *et al.*, "Rapid degradation of the complement regulator, CD59, by a novel inhibitor," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 17, pp. 12109–12125, Apr. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.547083.
- [78] R. Zhang, Q. Liu, Q. Liao, and Y. Zhao, "CD59: A promising target for tumor immunotherapy," *Future Oncology*, vol. 14, no. 8. Future Medicine Ltd., pp. 781–791, Apr. 01, 2018, doi: 10.2217/fon-2017-0498.
- [79] C. A. Tegla *et al.*, "Membrane attack by complement: The assembly and biology of terminal complement complexes," *Immunol. Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 45–60, Oct. 2011, doi: 10.1007/s12026-011-8239-5.



- [80] R. Würzner, "Deficiencies of the complement MAC II gene cluster (C6, C7, C9): Is subtotal C6 deficiency of particular evolutionary benefit?," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 133, no. 2. Wiley-Blackwell, pp. 156–159, Aug. 01, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02230.x.
- [81] P. Chaemsaihong *et al.*, "A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection," *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.*, vol. 29, no. 3, p. 360, Feb. 2016, doi: 10.3109/14767058.2015.1006621.
- [82] M. Kacerovsky *et al.*, "Intraamniotic inflammatory response to bacteria: Analysis of multiple amniotic fluid proteins in women with preterm prelabor rupture of membranes," *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 25, no. 10, pp. 2014–2019, Oct. 2012, doi: 10.3109/14767058.2012.671873.
- [83] D. L. Soong, R. K. Mi, G. H. Pil, S. S. Shim, B. H. Yoon, and J. K. Chong, "Chorionic plate vessels as an origin of amniotic fluid neutrophils," *Pathol. Int.*, vol. 54, no. 7, pp. 516–522, Jul. 2004, doi: 10.1111/j.1440-1827.2004.01659.x.
- [84] A. M. Lynch, R. S. Gibbs, J. R. Murphy, P. C. Giclas, J. E. Salmon, and V. M. Holers, "Early Elevations of the Complement Activation Fragment C3a and Adverse Pregnancy Outcomes HHS Public Access," *Obs. Gynecol.*, vol. 117, no. 1, pp. 75–83, 2011, doi: 10.1097/AOG.0b013e3181fc3afa.
- [85] E. Soto *et al.*, "The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine Evidence for complement activation in the amniotic fluid of women with spontaneous preterm labor and intra-amniotic infection) Evidence for complement activation in the amniotic fluid of women with spontaneous preterm labor and intra-amniotic infection Evidence for complement activation in the amniotic fluid of women with spontaneous preterm labor and intra-amniotic infection," *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 22, no. 11, pp. 983–992, 2009, doi: 10.3109/14767050902994747.
- [86] J. M. Gonzalez, R. Romero, and G. Girardi, "Comparison of the mechanisms responsible for cervical remodeling in preterm and term labor," *J. Reprod. Immunol.*, vol. 97, no. 1, pp. 112–119, 2013, doi: 10.1016/j.jri.2012.07.008.
- [87] I. Farkas *et al.*, "CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9," *J. Physiol.*, vol. 539, no. 2, pp. 537–545, Mar. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2001.013381.
- [88] Schwartz R. A., "Complement Deficiencies.," Accessed Aug. 05, 2021. [Online]. Available: <https://emedicine.medscape.com/article/135478-overview>.
- [89] F. Tedesco, R. Bulla, and F. Fischetti, "Terminal Complement Complex: Regulation of Formation and Pathophysiological Functions," *Complement Syst.*, pp. 97–127, Feb. 2004, doi: 10.1007/1-4020-8056-5\_6.