

Lékařská fakulta
Univerzity Palackého v Olomouci

Obor: gynekologie a porodnictví

HELLP SYNDROM A MARKERY AKTIVACE ENDOTELU

MUDr. Ondřej Šimetka

Školitel: Doc. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.
Školitel specialista: Doc. MUDr. Alena Měchurová, CSc.

Olomouc 2010

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Martinu Procházkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a metodické vedení během postgraduálního studia.

Děkuji rovněž své školitelce Doc. MUDr. Aleně Měchurové, CSc. za cenné připomínky a dlouhodobou podporu.

Děkuji vedení Fakultní nemocnice v Ostravě za vytvoření vynikajících podmínek ke studiu.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a že jsem v ní uvedl veškerou literaturu a ostatní zdroje, z nichž jsem čerpal při zpracování tématu.

MUDr. Ondřej Šimetka

V Opavě 28. dubna 2010

Obsah

Seznam použitých zkratek

1.	Úvod	str. 8
2.	Současný stav problematiky HELLP syndromu	str. 9
2.1.	Historie	str. 9
2.2.	Incidence	str. 10
2.3.	Klasifikace preeklampsie.	str. 10
2.4.	Diagnostická kritéria HELLP syndromu a klasifikace ...	str. 12
2.5.	Rizikové faktory preeklampsie a HELLP syndromu	str. 14
2.6.	Protektivní faktory preeklampsie a HELLP syndromu ...	str. 14
2.7.	Odlišnosti HELLP syndromu a preeklampsie	str. 14
2.8.	Diferenciální diagnostika HELLP syndromu	str. 16
2.9.	Klinický průběh HELLP syndromu	str. 20
2.10.	Komplikace HELLP syndromu	str. 21
2.11.	Léčba HELLP syndromu	str. 25
3.	Etiologie syndromu HELLP	str. 27
3.1.	Úvod.	str. 27
3.1.1.	Abnormální placentace u preeklampsie	str. 28
3.1.2.	Genetické faktory	str. 29
3.1.3.	Porucha imunologické adaptace	str. 30
3.1.4.	Teorie změny parciálního tlaku kyslíku.	str. 31
3.1.5.	Dvoustupňové onemocnění.	str. 32
3.1.6.	Časná versus pozdní preeklampsie.	str. 34
3.1.7.	Co je spouštěčem změn a které období je pro rozvoj preeklampsie kritické?	str. 35
3.1.8.	Systém odstraňování starých částí trofoblastu ...	str. 37
4.	Endotel.	str. 41
4.1.	Současný stav znalostí k dané problematice.	str. 41
4.2.	Produkty endotelových buněk	str. 41
4.3.	Predikce syndromu HELLP	str. 46

5.	Vlastní výzkumný projekt	str. 50
5.1.	Cíl práce	str. 50
5.2.	Pracovní hypotéza	str. 50
5.3.	Očekávané výsledky a přínos pro lékařskou praxi	str. 50
5.4.	Charakteristika souborů	str. 51
5.4.1.	Dotazník	str. 53
5.5.	Limitující faktory vlastní výzkumné práce.	str. 54
5.6.	Statistické metody	str. 54
5.7.	Laboratorní vyšetření	str. 54
5.7.1.	Metodika laboratorních vyšetření	str. 55
5.8.	Výsledky	str. 57
5.8.1.	Charakteristika souboru	str. 57
5.8.2.	Laboratorní výsledky.	str. 58
	5.8.2.1.Laboratorní výsledky souboru žen s fyziologickou graviditou . . .	str. 58
	5.8.2.2.Laboratorní výsledky souboru žen s preeklampií . . .	str. 65
	5.8.2.2.1. Srovnání výsledků preeklampsie a kontrolní skupiny . . .	str. 65
	5.8.2.3.Laboratorní výsledky souboru žen s HELLP syndromem	str. 69
	5.8.2.3.1. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem	
	oproti skupině žen s fyziologickou graviditou v I. a II.	
	trimestru	str. 69
	5.8.2.3.2. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem	
	oproti skupině zdravých těhotných ve III. trimestru	str. 70
	5.8.2.3.3. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem	
	oproti skupině preeklampsie v I. a II. trimestru	str. 70
	5.8.2.3.4. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem	
	oproti skupině preeklampsie ve III. trimestru	str. 71
6.	Diskuse	str. 82
6.1.	Fyziologická gravidita	str. 82
6.2.	Skupiny těhotných s preeklampií a syndromem HELLP .	str. 84

7.	Závěr	str. 88
8.	Souhrn	str. 89
9.	Summary	str. 95
10.	Seznam tabulek a grafů	str. 100
11.	Literatura	str. 102
12.	Příloha – publikace	str. 112
12.1.	Publikace a přednášky k tématu vědecké práce.	str. 112
12.2.	Publikace a přednášky mimo téma vědecké práce	str. 115
13.	Anglický název práce, anglická klíčová slova	str. 122

Seznam použitých zkratk

ALT – alanin aminotransferáza
AST – aspartát aminotransferáza
DIC - diseminovaná intravaskulární koagulace
EDRF - endothelium derived relaxing factor
EMP – endotelové mikropartikule
EPCR – endoteliální receptor proteinu C
HELLP syndrom – syndrom charakterizovaný hemolýzou (H), elevací jaterních testů (EL - elevation of the liver enzymes) a trombocytopenií (LP – low platelets)
ICAM – 1 intercellular adhesive molecules
IUGR – intrauterine growth retardation – intrauterinní růstová retardace
LDH – laktát dehydrogenáza
MAHA - mikroangiopatická hemolytická anémie
MMP - metaloproteináza
NO - oxid dusnatý
PAI-1 – inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PGI2 - prostaglandin I2 či prostacyklin
SGA – small for gestational age
SK – syncytiální uzly (syncitial knots)
STBM – syncytiotrofoblast microvilli
TIMP-2 - tkáňový inhibitor metaloproteinázy 2
TM - trombomodulin
t-PA - tkáňový aktivátor plazminogenu
u-PA - urokinázový aktivátor plazminogenu
VCAM – 1 vascular cell adhesive molecules
vWf – von Willebrandův faktor
XOR - Xantinoxidoreduktáza

1. Úvod

Syndrom HELLP je vzácnou, ale jednou z nejzávažnějších komplikací těhotenství. Jedná se o komplikaci vázanou na těhotenství, projevující se buď v kombinaci s klasickými příznaky preeklampsie (hypertenze, proteinurie, otoky, retence tekutin) nebo bez těchto známek jako zcela odlišný klinický stav projevující se nejčastěji bolestí hlavy, poruchou visu, epigastrickou bolestí, otoky a/nebo nauzeou, s typickým laboratorním nálezem hemolýzy, elevace jaterních testů a trombocytopenie. Všechny tyto příznaky mohou být vyjádřeny v různé míře. Syndrom HELLP je spojen se signifikantně horšími perinatologickými výsledky – mateřské a novorozenecké morbidity a mortality. Přes intenzivní výzkum je jeho predikce zatím nemožná a diagnóza bývá stanovena až na základě klinických příznaků. Kauzální terapií je ukončení gravidity a symptomatická terapie ženy před a po porodu.

Vzhledem k závažnosti HELLP syndromu je jednou z priorit moderní perinatologie v rozvinutých zemích snaha o pochopení patofyziologických mechanismů spojených s preeklampií a HELLP syndromem se zaměřením se na nalezení screeningových testů k časně identifikaci žen s rizikem rozvoje těchto komplikací, které by mohly následně profitovat z dispenzarizace a časně léčby.

HELLP syndrom i preeklampsie jsou spojeny s výraznou aktivací endotelu a endotel je tudíž oblastí, kam se upíná primární výzkum.

2. Současný stav problematiky HELLP syndromu – obecná část

2.1. Historie

Skutečnost, že se preeklampsie může komplikovat poruchou funkce jater a krvácením je známa již dlouho, nicméně poprvé pojmenovala HELLP syndrom Louise Weinsteinová v roce 1982. Postižení funkce jater popsal na 3 případech těhotných žen s preeklampií poprvé Pritchard už v roce 1954 [82] a asociaci trombocytopenie s preeklampií popsal poprvé Stahnke v roce 1922. Už dlouho je předmětem zkoumání, zda se jedná o samostatnou nosologickou jednotku nebo variantu preeklampsie. Tato otázka není stále dořešena, ale ze studia patogeneze se na základě dnešních poznatků dá prohlásit, že HELLP syndrom je nejčastěji spojen s preeklampií, bývá často její komplikací a patofyziologie obou chorob je v podstatě identická. Nicméně, důvody proč u některých pacientek dojde k rozvoji HELLP syndromu a u jiných nikoliv, nejsou doposud zcela známy.

Na druhé straně existují práce, které poukazují na odlišnost HELLP syndromu a preeklampsie [23,109] a je velmi pravděpodobné, že na tomto poli se dočkáme ještě mnohých překvapení.

Před 70. lety byla poprvé vyslovena domněnka, že snížená placentární perfuze je příčinou rozvoje preeklampsie [73]. Změny, které byly pozorovány, byly změny zejména v oblasti remodelace cév, tzn. nedostatečného zvětšení průsvitu cév u pacientek s preeklampií. Další souvislosti byly nalezeny u pacientek s predisponujícím onemocněním, zejména u žen s diabetes mellitus a hypertenzí, u kterých je známo, že se mohou manifestovat mikrovaskulární chorobou a mohly by tudíž vést k redukci perfuze placenty a přímo se tak podílet na vzniku preeklampsie. Preeklampsie byla rovněž sledována u pacientek s obrovskou placentou, kde se předpokládá, že vzhledem k velikosti placenty se jedná spíše o hypoperfuzi relativní.

2.2. Incidence

HELLP syndrom komplikuje přibližně 0,5 – 0,9% všech těhotenství a vyskytuje se u 10 až 20% žen, jejichž těhotenství je komplikováno těžkou preeklampsí [28,37,54]. Přibližně dvě třetiny všech případů syndromu HELLP se rozvíjí před porodem, k jedné třetině všech případů pak dojde v časném postpartálním období. K rozvoji nemoci v období před porodem dochází nejčastěji v období mezi 27. a 37. týdnem gravidity, 10% případů se rozvíjí ještě před 27. týdnem a 20% případů po 37. týdnu [79].

Přibližně třetina všech případů syndromu HELLP se rozvíjí v časném postpartálním období, v drtivé většině případů do 24 až 48 hodin, vesměs u pacientek s hypertenzí a proteinurií před porodem, může se ale jednat i o náhodný nález u zcela asymptomatické pacientky po porodu. Většina žen s HELLP syndromem má zároveň přítomné známky preeklampsie (hypertenze, proteinurie), ale až u 10 - 20% tyto známky chybí, a u více než 50% žen je přítomný excesivní nárůst hmotnosti před nástupem symptomů [93].

2.3. Klasifikace preeklampsie:

Preeklampsie a její varianta HELLP patří podle současné platné klasifikace mezi hypertenzní onemocnění v graviditě. Hypertenzní nemoci v graviditě dělíme dle následující klasifikace:

Tab. 1: Modifikovaná klasifikace dle Americké národní skupiny pro výchovný program hypertenze (1990), dle ACOG 2002 (převzato z habilitační práce Doc. MUDr. Aleny Měchurové, CSc.)

I. Preeklampsie	Vznik HT s proteinurií event. edémy v graviditě po 20. týdnu
1. Mírná	Pokud nejsou symptomy těžké preeklampsie (TK 140/90-160/110, proteinurie 0,3 až 5g/24 hodin)
2. Těžká	TK v klidu > 160/110 proteinurie > 5g/24 hodin oligurie < 400 ml/24 hodin epigastrická bolest či bolest v pravém hypochondriu, hepatocelulární postižení, cefalea, poruchy visu, plicní edém, cyanóza, trombocytopenie
II. Eklampsie	
III. Chronická HT předcházející těhotenství	Trvalá hypertenze před 20.t.grav. (není-li zároveň mola hydatidosa), či trvalá HT po 6. týdnu po porodu
IV. Preeklampsie superponovaná na chronickou HT	
V. Přechodná – tranzitorní HT	objeví se v těhotenství, vymizí před porodem či do 10 dnů po porodu (nejspíše latentní esenciální HT)
VI. Neklasifikovaná HT	HT zjištěná při jednom vyšetření v těhotenství

2.4. Diagnostická kritéria HELLP syndromu a jeho klasifikace

Typickým laboratorním obrazem, ze kterého pramení i samotný název syndromu, jsou hemolýza (H), elevace jaterních testů (EL) a trombocytopenie (LP). Nejsou-li vyjádřena všechna tři kritéria, hovoříme o parciálním H nebo EL nebo ELLP syndromu. Nejtypičtější průběh má kompletní HELLP syndrom. Všechny výše uvedené patofyziologické jevy jsou predisponujícím faktorem k rozvoji diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a mnozí autoři jsou názoru, že HELLP syndrom je pravděpodobně vždy spojen s určitým stupněm DIC [2,3,7]. Diagnostická kritéria HELLP syndromu jsou poměrně jasně definovaná ve dvou různých klasifikačních systémech (Tennessee a Mississippi), přesto je HELLP syndrom zdrojem mnoha kontroverzí [92]. Tíže syndromu HELLP nemusí plně korespondovat s počtem trombocytů ani s hladinou transamináz, hladina trombocytů nemusí korelovat s tíží postižení jater. Přibližně jedna třetina všech případů syndromu HELLP se klinicky manifestuje až po porodu a tyto případy mívají těžší průběh [92]. Syndrom HELLP může být buď kompletní (při pozitivitě všech 3 laboratorních nálezů), nebo parciální, při pozitivitě 2 nebo 1 příznaku. Podle klasifikace **Tennessee** jsou ke stanovení diagnózy kompletního HELLP syndromu nutná následující kritéria:

- hladina trombocytů nižší než $100 \times 10^9/l$
- elevace AST (aspartát aminotransferázy) nebo ALT (alanin aminotransferázy) nad 70 U/l, tzn. $1,17 \mu\text{kat /l}$
- sérová hladina laktát dehydrogenázy (LDH) nad 600 U/l, tzn. 10 ukat/l .

Z podrobnějších klasifikačních schémat je nejčastěji používána klasifikace **Mississippi**, která dělí HELLP syndrom do tří tříd podle počtu trombocytů - méně než $50 \times 10^9/l$ trombocytů, $50-100 \times 10^9/l$ trombocytů a více než $100 \times 10^9/l$ trombocytů, v případě 3. třídy pak platí i měkkší kritéria pro hodnoty jaterních testů – ALT a AST (40 IU/l místo 70 IU/l , tzn. $0,69 \mu\text{kat /l}$ místo $1,17 \mu\text{kat /l}$).

Přehled klasifikací uvádíme v tabulce č. 2 [37].

Tab. 2: Diagnostická kritéria HELLP syndromu

Tennessee klasifikace	Mississippi klasifikace			
	Třída	Trombocyty ($\times 10^9/l$)	AST, ALT ($\mu\text{kat /l}$)	LDH ($\mu\text{kat /l}$)
Trombocyty $< 100 \times 10^9/l$ AST $> 1.17 \mu\text{kat /l}$ LDH $> 10 \mu\text{kat kat/l}$	1	< 50	> 1.17	> 10
	2	50 – 100	> 1.17	> 10
	3	100 – 150	> 0.69	> 10

Hemolýza

Hemolýza je způsobena částečnou destrukcí, tzn. fragmentací červených krvinek při průchodu cévami s poškozeným endotelem a s fibrinovými depozity. Při rychlém průtoku červených krvinek takto poškozeným řečištěm dochází k poškození erytrocytů a vznikají nepravidelné buňky nazývané schistocyty, fragmentované červené krvinky (Burr cells). K tomuto jevu dochází na podkladě mikroangiopatické hemolytické anémie (MAHA). Destrukce erytrocytů vede k elevaci laktátdehydrogenázy (LDH) a snížení hladiny hemoglobinu. Uvolněný hemoglobin je konvertován na nekonjugovaný bilirubin ve slezině a nebo je vázán v plazmě haptoglobinem. Komplex haptoglobin-hemoglobin je eliminován cestou jater, výsledkem je nízká hladina haptoglobinu. Hladina haptoglobinu je velmi citlivý marker hemolýzy už při velmi nízkém stupni hemolýzy. Hemolýzu tak v praxi nejlépe diagnostikujeme potvrzením poklesu hladiny haptoglobinu. Elevace LDH a zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu jsou dalšími pomocnými kritérii [63,66,110,79]. Vyšetření schistocytů je možné, ale není nutné.

Trombocytopenie

Trombocytopenie je stav, při kterém se nachází méně než $150 \times 10^9/l$ destiček. Sibai, který definoval klasifikační kritéria Tennessee, udává jako hranici trombocytopenie nižší hodnotu, a sice $100 \times 10^9/l$. Klasifikace Mississippi dělí HELLP syndrom podle počtu trombocytů do 3 tříd.

K trombocytopenii v případě HELLP syndromu dochází na základě konsumpce, trombocyty jsou aktivované, adherují na poškozený endotel a dochází ke zkrácení délky přežití a rychlejšímu obratu destiček [86,98].

Elevace jaterních enzymů

Elevace LDH bývá spojena s buněčnou smrtí, v případě HELLP syndromu je elevace LDH projevem hemolýzy. Poškození jater je v případě HELLP syndromu prokazatelné nejlépe pomocí stanovení hladiny alfa-glutathion S-transferázy-a1. Tento test není ovšem běžně dostupný a proto jsou za účelem zjištění zhoršení jaterních funkcí sledovány hodnoty alanin aminotransferázy a aspartát aminotransferázy, což jsou sice velmi citlivé markery, ale na poškození hepatocytů dříve upozorní právě hladina alfa-glutathion S-transferázy-a1 [58].

2.5. Rizikové faktory preeklampsie

Vzhledem k etiopatogenezi preeklampsie a HELLP syndromu není překvapením, že jedinci s predispozicí k vaskulární insuficienci, jako jsou osoby s diabetem mellitus, trombofilními stavy, lupus erythematosus a chronickou hypertenzí, jsou rizikovou skupinou pro rozvoj preeklampsie. Dalšími rizikovými faktory vzniku preeklampsie je výskyt preeklampsie v anamnéze, primiparita, obezita, rodinná anamnéza preeklampsie. Ženy s malou placentou nebo ženy s relativní redukcí průtoku placentou, jako např. ženy s vícečetnou graviditou jsou další rizikovou skupinou [52]. Rovněž pacientky s trombofilními stavy jsou náchylnější k rozvoji preeklampsie.

2.6. Protektivní faktory

Je zajímavým faktem, že kouření cigaret je protektivním faktorem preeklampsie. Vzhledem k jiným nežádoucím efektům kouření však tuto aktivitu samozřejmě nelze doporučit jako všeobecné preventivní opatření [52].

2.7. Odlišnosti HELLP syndromu a preeklampsie

Už dlouho je předmětem zkoumání, zda se v případě HELLP syndromu jedná o samostatnou nosologickou jednotku nebo o variantu preeklampsie. Tato otázka není

stále dořešena. Ačkoliv se patofyziologie jeví identická, nejsou jasné důvody proč u některých pacientek dojde k rozvoji HELLP syndromu a u jiných nikoliv.

Existují práce, které poukazují na odlišnost HELLP syndromu a preeklampsie [23,46,109] a je velmi pravděpodobné, že na tomto poli se dočkáme ještě mnohých nových zjištění. Na základě dnešních znalostí je HELLP v klasifikaci řazen do skupiny preeklampsie.

Základní odlišností je skutečnost, že cca 10-20% jinak zcela typických případů syndromu HELLP není provázeno ani hypertenzí ani proteinurií [92,93] a nesplňuje tak v podstatě vůbec kritéria preeklampsie.

Fischer, vzhledem ke známým strukturálním a funkčním změnám systémového cévního řečiště u preeklampsie a HELLP syndromu, zkoumal vaskulární reaktivitu u zdravých těhotných, u pacientek s preeklampií a pacientek s HELLP syndromem. Zatímco v klidu byl střední arteriální tlak a vaskulární reaktivita zvýšená u pacientek s preeklampií i HELLP syndromem proti zdravým těhotným, tak v reaktivní hyperemické fázi byl průtok krve statisticky významně nižší pouze u preeklampsie, nikoliv u HELLP syndromu proti skupině zdravých těhotných. Změny v reaktivní hyperemické fázi jsou přitom známkou maximální vasodilatační kapacity. Tyto statisticky významné výsledky nepodporují teorii shodné etiopatogeneze HELLP syndromu a preeklampsie. Mechanismy vasodilatace u reaktivní hyperemické fáze při pletysmografii nejsou příliš jasné, předpokládá se ale, že endoteliální faktory ani NO u tohoto jevu nehrají hlavní roli, ta se naopak přikládá strukturálním změnám cév (vyjádřené poměrem tunica media/lumen), což znamená, že strukturální změny cév jsou mnohem více vyjádřeny u pacientek s preeklampií než HELLP syndromem [23].

V retrospektivní švédské studii autorky Vinnars byla studována histopatologie placent a incidence SGA u pacientek s těžkou preeklampií (117 případů) a HELLP syndromem (82 případů). Bylo zjištěno, že placenty pacientek ve skupině preeklampsie měly signifikantně častější výskyt infarktů, intervillózních trombóz a abrupcí, což by mohlo být důkazem závažnějšího vlivu preeklampsie na cévní řečiště než v případě HELLP syndromu. Ve skupině HELLP byla vyšší průměrná váha placenty a méně SGA plodů (71,9% vs. 23,5%) [109].

Je docela možné, že spouštěcí mechanismus HELLP syndromu a preeklampsie může být velmi podobný a že odlišná může být pouze reakce mateřského organismu.

Rovněž poslední výzkum na placentách in vitro ukazuje na některé zásadní odlišnosti mezi HELLP syndromem a preeklampsií, i když tyto práce nebyly doposud publikovány. (Huppertz B.– osobní sdělení).

2.8. Diferenciální diagnostika HELLP syndromu

Při přítomnosti typických subjektivních a objektivních potíží těhotné (cefalea, epigastrická bolest, nauzea, poruchy visu, typické laboratorní poruchy ve spojení s graviditou) je stanovení diagnózy poměrně snadné. Je ovšem nutno pomýšlet i na jiné choroby, jenž mohou imitovat HELLP syndrom nebo jeho diagnostiku ztěžovat. Všechny choroby, které se projevují podobným laboratorním obrazem je nutné mít na paměti, stejně jako choroby projevující se podobnými klinickými známkami (epigastrická bolest, poruchy visu, cefalea apod.).

Nebezpečím HELLP syndromu je skutečnost, že opakovaně dochází k podcenění prvních subjektivních stesků těhotné, jako jsou nevolnost, cefalea a epigastrická bolest. Tyto příznaky ve spojení s graviditou jsou varovné, obzvlášť s ohledem na skutečnost, že rozvoj syndromu HELLP bývá většinou velmi rychlý.

Diferenciální diagnostika trombocytopenie

Jako trombocytopenii označujeme počet krevních destiček pod 150×10^9 v litru periferní krve. Nacházíme ji přibližně u 7-10% těhotných žen. Etiologicky je výskyt některých trombocytopenií spojen jen s graviditou, jiné se mohou vyskytovat u žen všech věkových kategorií a těhotenství pak klade zvýšené nároky na diagnostiku a rozhodování o léčebném postupu. Závažná trombocytopenie s počtem destiček nižším než $50 \times 10^9/l$ se objevuje u méně než 0,1% všech těhotných a může ohrozit život matky i plodu [62].

Znalost různých příčin trombocytopenie a diagnostická kritéria jsou v moderním porodnictví nutností, neboť tento stav komplikuje jinak rutinní situace (krvácení v těhotenství, porodnické krvácení, indikace k epidurální analgesii a císařskému řezu). Jiné příčiny trombocytopenie jsou:

Pseudotrombocytopenie

Jedná se o nepravou trombocytopenii, zjištěnou in vitro, neodpovídající skutečnému počtu in vivo. Jsou známy dva základní typy:

A: Shlukování (aglutinace) krevních destiček in vitro, v případě použití antikoagulačního činidla EDTA. Do této skupiny patří rovněž chladová aglutinace trombocytů a tvorba rozet kolem leukocytů. Tento typ trombocytopenie nacházíme u 0,11 - 0,9% pacientů, v důsledku přítomnosti protilátek třídy IgG proti epitopům trombocytární membrány (GP IIb/III).

B: Nesprávné sečtení krevních destiček automatickým počítačem krvinek způsobené morfologickými změnami trombocytů. Příkladem jsou vrozené trombocytopatie s výskytem gigantických trombocytů a získané poruchy, u kterých v rámci anizocytózy dochází k vyplavování obrovských trombocytů [6].

Nepravá trombocytopenie je klinicky nevýznamná. Vyloučíme ji mikroskopickým odečtením počtu trombocytů v nátěru nebo ze vzorku odebraného do jiného antikoagulačního činidla, popřípadě vyšetřením krevního vzorku transportovaného do laboratoře v lázni teplé 37 stupňů Celsia.

Benigní gestační trombocytopenie

Vyskytuje se zhruba u 5-7 % těhotenství. Většinou začíná ve třetím trimestru a obvykle nezpůsobuje u matky ani plodu žádné komplikace. Množství destiček bývá mezi $100-150 \times 10^9/l$, většinou neklesají pod $80 \times 10^9/l$. Anamnesticky nenacházíme trombocytopenii před graviditou ani v přímém příbuzenstvu, počet destiček je před i na začátku těhotenství normální, koagulační vyšetření je bez odchylek, nejsou přítomné antitrombocytární protilátky. Léčba není indikována, po porodu se počet destiček normalizuje [9].

Trombocytopenie při preeklampsii

Výskyt trombocytopenie je prokázán u 15% všech žen s preeklampií. Destičky jsou obvykle v množství nad $50 \times 10^9/l$, pouze u 5% případů jejich počet klesá pod tuto hodnotu a nemusí být spojen se změnami v koagulaci. Diagnosticky může dojít k záměně s idiopatickou trombocytopenickou purpurou a tím i k odložení ukončení těhotenství.

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko –uremický syndrom (HUS)

Další dvě onemocnění, která mohou během těhotenství napodobovat preeklampsii a HELLP syndrom, jsou trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko –uremický syndrom (HUS). Zařazují se s nimi do skupiny trombotických mikroangiopatií.

Pro obě onemocnění je typická trombocytopenie, hemolytická anémie a různý stupeň postižení renálních funkcí a CNS, může dojít až k multiorgánovému selhání. Vyskytují se v četnosti 1:25 000 těhotenství. V terapii se uplatňuje výměnná plazmaferéza [19,67]. HUS nebývá spojen s elevací jaterních testů. HUS v souvislosti s těhotenstvím je velmi závažná diagnóza provázená vysokou morbiditou i mortalitou [6].

Idiopatická trombocytopenická purpura (ITP)

Jedná se o autoimunní onemocnění, při kterém jsou destičky destruovány protideštičkovými protilátkami (patřícími do skupiny IgG protilátek, jsou vytvářeny buňkami retikuloendotelového systému matky, především sleziny a kostní dřeně), tyto procházejí placentární bariérou a následně mohou, ale nemusí způsobit trombocytopenii u plodu. Závažná fetální trombocytopenie (méně než $50 \times 10^9/l$) je popsána u 10% případů. Intrakraniální krvácení u novorozence se vyskytuje v 1% případů. Korelace mezi počtem destiček u matky a plodu je nevýrazná. Záchyt antitrombocytárních protilátek podporuje diagnosu ITP, ale negativní nález ji nevylučuje. U většiny pacientek je průběh onemocnění asymptomatický, ke krvácení ve formě hemorhagické diatézy dochází až při poklesu trombocytů pod $20-30 \times 10^9/l$. Terapie je indikována při poklesu trombocytů pod tuto hodnotu.

Lékem první volby jsou kortikoidy. Při selhání této terapie nebo nutnosti rychlého vzestupu krevních destiček (porod, operační zákrok) volíme lidský imunoglobulin. Při neúspěchu je možno zkusit jiná terapeutická schémata, eventuálně splenektomii [74,79,80]. Vzhledem k nízkému riziku postižení plodu při porodu se dnes doporučuje běžná porodnická péče a císařský řez je indikován jen z jiných porodnických příčin. Vzhledem k přestupu antitrombocytárních protilátek přes placentu je vhodné vyšetření trombocytů u novorozence, i když je těžká trombocytopenie nalézána výjimečně.

Infekční a polékové příčiny trombocytopenie

Mateřskou trombocytopenii mohou vyvolat mnohé virové a bakteriální infekce, které s těhotenstvím vůbec nemusí souviset. Příkladem mohou být infekce cytomegalovirové, virus Epstein – Barrové, hepatitida B a C, borelióza. U 10% HIV pozitivních pacientek může trombocytopenie představovat první klinický příznak. Léky navozená trombocytopenie je ve většině případů vyvolána imunitní reakcí a může ji vyvolat široké spektrum léků.

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT)

Obvykle se vyskytuje 4. až 10. den od začátku léčby. HIT I je charakterizována mírnou trombocytopenií, normalizující se v průběhu další léčby. HIT II je mnohem nebezpečnější poruchou charakterizovanou různě závažnou trombocytopenií a trombotickými komplikacemi. Příčinou onemocnění je tvorba protilátok (nejčastěji třídy IgG) proti komplexu heparin + trombocytární faktor 4 (H–PF4), následně vzniká trombocytární hyperagregace, jejímž důsledkem je trombocytopenie a trombotizace. Tyto aktivační pochody, při současné zvýšené tvorbě trombinu a endoteliálním poškození (vazba komplexu H–PF4 na endotel), navozují hyperkoagulačně-protrombotický stav. Trombocytopenie kolísá mezi $20-50 \times 10^9/l$. Pacientku ohrožují hlavně trombotické příhody. Léčebný postup zahrnuje okamžité ukončení aplikace heparinu a zahájení alternativní antikoagulační terapie. Výskyt HIT II je závislý na typu použitého heparinu. Při aplikaci frakciovaných, nízkomolekulárních heparinů, které se nyní rutinně u těhotných používají, je výskyt tohoto syndromu méně častý a nedosahuje ani 1% pacientek [6,74,99].

Diferenciální diagnostika postižení jater

Vedle virových hepatitid je nutno pomýšlet na následující onemocnění:

Těhotenská cholestatická hepatóza (intrahepatic cholestasis of pregnancy – ICP)

ICP je relativně častou komplikací gravidity, vyskytuje se až u 1% těhotenství. Je typická svěděním kůže, zejména v noci. Pro rodičku není onemocnění nebezpečné, ohrožuje více plod, zejména prematuritou a vyšším výskytem hypoxických komplikací. Nejzávažnější komplikací je náhlé intrauterinní úmrtí plodu. Příčinou je porucha transportních systémů žlučových kyselin, hromadící se žlučové kyseliny pak působí toxicky na membrány jaterních buněk a vedou k elevaci JT. Působí

rovněž vasokonstrikčně. Onemocnění se často vyskytuje familiárně. V léčbě se uplatňuje kyselina ursodeoxycholová a časování ukončení gravidity indukcí porodu nebo císařským řezem. Po ukončení gravidity se onemocnění rychle upravuje [6].

Akutní steatóza jater (acute fatty liver of pregnancy – AFLP)

AFLP je vzácné onemocnění vyskytující se ve III. trimestru, jehož etiologie není známá, ale v něčem se podobá preeklampsii. Jedná se o onemocnění spojené s vysokou mortalitou. Nemoc se projevuje bolestmi v pravém epigastriu, nechutenstvím, nevolností, bolestí hlavy, apatií. V laboratorních ukazatelích dominuje zvýšení hladiny transamináz, hraniční hyperbilirubinémie, vysoké hladiny ALP, amoniaku a porucha koagulace. Léčba spočívá v rychlém stanovení diagnózy a rychlém ukončení gravidity, symptomatické terapii a úpravě koagulačních parametrů [6].

2.9. Klinický průběh HELLP syndromu

Klinický průběh HELLP syndromu je obtížně předvídatelný a vesměs velmi rychlý. Typickými známkami jsou bolest hlavy (cefalea), trpí jimi přibližně 30-60% pacientek a přibližně 20% pacientek trpí poruchami vizu [93]. Tyto příznaky mohou být zevním projevem počínajícího otoku mozku. Častá je rovněž epigastrická kolikovitá bolest, která bývá způsobena napínáním glissonskeho pouzdra při postižení jater. Mnoho pacientek udává rovněž únavu, slabost, spavost několik dnů před projevem HELLP syndromu. Další pacientky mohou mít velmi mírné projevy charakteru počínajícího virového onemocnění (flu-like) – bolesti kloubů, únava, slabost. Příznaky preeklampsie bývají rovněž častými průvodními jevy – hypertenze, otoky, proteinurie. Pacientky s parciálním HELLP syndromem mívají vesměs nevýrazné příznaky a průběh choroby bývá mírnější [92,93]. HELLP syndrom se může ale projevit i velmi nenápadně a atypicky, např. epistaxí či bezvědomím. Průběh onemocnění je obtížně předvídatelný a přibližně ve třetině případů dochází ke zhoršení průběhu nebo nástupu symptomů nemoci do 48 hodin po porodu.

V některých případech může mít nemoc čistě laboratorní průběh bez alterace klinického stavu pacientky.

2.10. Komplikace HELLP syndromu

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)

Nejzávažnější komplikací HELLP syndromu je vedle úmrtí pacientky porucha krevní srážlivosti v podobě DIC se všemi důsledky – krvácením komplikujícím operační a pooperační průběh, tvorbou hematomů v subfasciální oblasti nebo v dutině břišní nebo vznikem subkapsulárního hematomu jater či intracerebrálním krvácením.

Role DIC v patogenezi HELLP syndromu je kontroverzní. V klinické praxi bývá DIC běžně stanovován na základě přítomnosti trombocytopenie, prodloužení protrombinového času a aktivovaného parciálního tromboplastinového času a nízké hladiny fibrinogenu. Na základě těchto diagnostických kritérií stanovila Weinsteinová diagnózu DIC pouze u 4% patientek s HELLP syndromem. Nicméně mnoho autorů předpokládá, že v případě užití citlivých koagulačních testů zjistíme známky DIC u každé pacientky s HELLP syndromem a že určitý, byť subklinický stupeň DIC je součástí diagnózy HELLP syndrom. Někteří autoři pokládají HELLP syndrom za specifickou formu DIC [6].

Subkapsulární hematom jater a ruptura jater

Sibai ve své studii popsal výskyt subkapsulárního hematomu jater u 0,9% případů [92]. Ruptura jater je ještě vzácnější. Příčinou je ischemie jater při zvýšeném intrahepatálním tlaku, z důvodů drobných hemorragií v jaterním parenchymu. Ruptura jater je spojena až s 39% mateřskou mortalitou [85]. Při podezření na hematom nebo rupturu jater v průběhu těhotenství je indikováno ukončení gravidity císařským řezem a explorace dutiny břišní a jater. Při podezření v období po porodu je možné při podezření na hematom jater postupovat konzervativně za pečlivého monitoringu stavu pacientky (CT, UZ, MRI, koagulace apod.).

Plícní edém

Plícní edém je relativně častou komplikací preeklampsie a HELLP syndromu obzvlášť. Vyskytuje se až ve 3% všech případů preeklampsie [93]. Ke většině případů plícního edému dochází v období postpartálním. Příčin je několik:

hypertenze, zvýšená permeabilita plicních kapilár, incipientní levostranné srdeční selhávání, snížení osmotického tlaku a následný únik tekutin do třetího prostoru. Pro oběh ženy s preeklampií je typická vasokonstrikce, redukce intravaskulárního objemu a retence tekutin extravaskulárně. Ženy s preeklampií mohou špatně tolerovat i relativně malý intravenózní přísun tekutin a může velmi rychle dojít k rozvoji plicního edému. Při managementu těžké preeklampsie a HELLP syndromu je naší snahou dosažení negativní bilance tekutin forsírováním diurézy a zároveň udržovat dostatečný přísun tekutin. Symptomy plicního edému jsou typické – tachypnoe, dyspnoe, bolest na hrudi. V diferenciální diagnostice je nutné vyloučit trombembolickou příčinu potíží. V managementu se uplatňují zejména diuretika, terapie kyslíkem, polohování. Ve většině případů se objedeme bez nutnosti invazivního monitoringu a k úpravě dochází poměrně rychle.

Abrupce placenty

Abrupce placenty je dramatická komplikace těhotenství ohrožující na životě plod i matku. Výrazným rizikovým faktorem jsou hypertenzní stavy. K abrupci placenty dochází až u 16% případů HELLP syndromu. Abrupce placenty u HELLP syndromu a preeklampsie tvoří až 25% všech případů abrupcí [92]. Příčinou zvýšeného výskytu abrupce placenty u žen s preeklampií a pacientek s HELLP syndromem jsou pravděpodobně trombotické léze v placentárních cévách, které vedou k deciduálním nekrotickým, separaci a krvácení.

Akutní renální selhání

K akutnímu renálnímu selhání dochází až u 8% pacientek s HELLP syndromem [93]. Bývá většinou výsledkem akutní tubulární nekrózy, ve většině případů dobře reaguje na terapii a dlouhodobé komplikace bývají vzácné. Výjimkou jsou ženy s preexistujícím renálním onemocněním nebo pregestační hypertenzí, u kterých dochází v průběhu gravidity vesměs ke zhoršení stavu s mírným zlepšením po ukončení gravidity, ale už vesměs ne na původní úroveň.

Zhoršené perinatální výsledky

HELLP syndrom je spojen s výrazně horšími perinatologickými výsledky, a to jak ze strany matky, tak ze strany plodu [2,92].

2.11. Výsledky těhotenství komplikovaných HELLP syndromem

Dle literárních údajů je HELLP syndrom provázen zhoršenými perinatologickými výsledky [92]. Incidence jednotlivých komplikací HELLP syndromu se nicméně v literatuře liší velmi výrazně a četnost výskytu závisí na populaci, typu porodnického zařízení poskytující údaje, velikosti centra a managementu choroby.

Závažná je dle literárních zdrojů neonatologická mortalita a morbidita – perinatální úmrtí je udáváno v rozmezí 7,4 - 34%, IUGR s incidencí 38-61% , předčasný porod v 70% všech případů HELLP syndromu (a až v 15% se jedná o porod před 28. týdnem). Neonatální trombocytopenie bývá popisována v 15-50% případů a IRDS v 5,7-40% případů [51,55,56,60,61]. Mateřská mortalita je v různých literárních zdrojích udávána mezi 1 až 25% [20,21].

Tento značný rozsah hodnot je dán kvalitou péče v daném prostředí a velmi se liší mezi zeměmi s kvalitní prenatalní péčí a zeměmi s hůře dostupnou péčí, stejně tak se liší výsledky mezi menšími zařízeními a perinatologickými centry schopnými poskytnout komplexní intenzivní terapii. Včasnost diagnostiky, aktivní management a zázemí zdravotnického zařízení se bezpochyby podílí největší měrou na kvalitě perinatologických výsledků.

V České republice neexistují celorepubliková data o výsledcích gravidit s HELLP syndromem a v české literatuře byla publikována jediná přehledná práce o výsledcích těchto těhotenství v podmínkách kvalitní porodnické péče v ČR (šimetka, in print). Ve srovnání s literárními údaji jsou výsledky péče lepší. Vzhledem ke skutečnosti, že se nejedná o multicentrickou studii, je limitujícím faktorem této studie fakt, že odráží místní praxi jednoho pracoviště.

Tab. 3: Mateřská morbidita a mortalita

	PC FN Ostrava	Literární údaje [5,19,20,21,33,36]
Mateřská mortalita	0%	1-25%
Eklampsie	0%	4-9%
Abrupce placenty	2,9%	9-20%
Plícní edém	8,8%	3-10%
Hematom v ráně po SC	17,6%	7-14%
DIC	23,5%	5-56%

Tab. 4: Neonatologická mortalita a morbidita

	PC FN Ostrava	Literární údaje [5,19,20,21,33,36]
Prematurita	82,3%	70%
Prematurita < 28. týden	0%	15%
Hypotrofie	54%	38-61%
Perinatální mortalita	29 promile (ČNÚ 0, MR 29 promile)	74-340 promile
IRDS	33,3%	-
Chronické plícní onemocnění	2,8%	-
Pneumothorax	2,8%	-
Intersticiální plícní edém	2,8%	-
Jiné – ileus, sepse, trombóza	8,3%	-

2.12. Léčba HELLP syndromu

Jedinou kauzální léčbou syndromu HELLP je ukončení gravidity. Těhotenství by mělo být ukončeno v co nejkratším časovém intervalu od stanovení diagnózy a po základní stabilizaci pacientky (úpravy počtu krevních destiček, koagulopatie) a po zajištění krevních náhrad. U těhotenství nižší než 34 týdnů je možné zvážit odložení porodu po dobu nezbytně nutnou k podání kortikoidů za účelem maturace plicní tkáně plodu [92]. Podmínkou takového postupu je stabilní zdravotní stav těhotné, tzn. krevní tlak reagující na antihypertenzní terapii, dobrý subjektivní stav těhotné, nevyjádřené poruchy krevní srážlivosti a absence jiné závažné morbidit (edém plic apod.)

Ostatní léčba je pouze podpůrná či substituční. Při péči o ženy s těžkým HELLP syndromem je nutná mezioborová spolupráce porodníka s hematologem a anesteziologem [101].

Bezpečný počet trombocytů pro vaginální porod je nad $50 \times 10^9/l$, pro císařský řez nad $70 \times 10^9/l$, množství destiček nad $100 \times 10^9/l$ umožňuje provést bez komplikací všechny druhy anestézie [6].

Všem pacientkám je podávána infuze s magnéziem (magnézium sulfuricum) po dobu minimálně 24 (až 48) hodin po porodu nebo od posledního záchvatu v případě doprovázející eklampsie.

V případě nutnosti korekce hypertenze je nutné korigovat krevní tlak perorálními nebo intravenózními antihypertenzivními přípravky. Pacientkám s hladinou trombocytů nižší než $50 \times 10^9/l$ před porodem je indikováno podání trombocytárního náplavu. V případech poklesu trombocytů pod $50 \times 10^9/l$ v poporodním období náplav indikován většinou není. Peroperačně je u všech pacientek s potvrzeným či suspektním HELLP syndromem indikováno zavedení 2 Redonových drenů – do peritoneální dutiny k sutuře dělohy a do subfasciálního prostoru. V pooperačním průběhu je zcela nezbytné monitorovat bilanci tekutin se snahou o dosažení negativní bilance tekutin v pooperačním období. Otázka miniheparinizace je sporná, obecně se dá doporučit všem pacientkám s hladinou trombocytů nad $50 \times 10^9/l$, i když někteří autoři považují podání heparinu pacientkám s HELLP syndromem za rizikové [19].

Sporná je otázka plazmaferézy. Plazmaferéza bývá indikována hematologem u pacientek, u kterých ani po 48 (nebo 72 hod.) hodinách nedochází k trendu úpravy laboratorních hodnot. Vzhledem k invazivitě metody, potenciálnímu riziku přenosu infekcí, vysoké ceně metody a při nedostatku přesvědčivých důkazů o benefitu nelze doporučit plazmaferézu jako rutinní metodu léčby pacientek s HELLP syndromem a měla by zůstat jako rezervní metoda vyčleněná pro těžké případy, zejména postpartálně se rozvíjející HELLP syndromy [92] a měla by být vždy indikována hematologem. Smyslem plazmaferézy je odfiltrování působků, cirkulujících mediátorů, které jsou zodpovědné za klinické projevy HELLP syndromu [38,56].

3. Etiologie syndromu HELLP

Etiologie syndromu HELLP není doposud plně objasněna. Bývá zvykem popisovat etiologii HELLP syndromu v souvislosti s preeklampsií, nebylo ale dosud dokázáno, že se jedná o jednu a tutéž nosologickou jednotku. Faktem je, že mnohé patofyziologické mechanismy jsou u obou onemocnění podobné. Dnes máme mnohem více poznatků o preeklampsii než o HELLP syndromu.

Etiopatogeneze preeklampsie je předmětem intenzivního výzkumu a lze předpokládat, že se jedná o etiologii multifaktoriální. Preeklampsie, stejně jako HELLP syndrom, se rozvíjí pouze v přítomnosti těhotenství a je známo, že k rozvoji je nutná přítomnost placenty, nikoliv plodu. Důkazem tohoto tvrzení je možnost rozvoje preeklampsie u těhotenství s kompletní molární graviditou bez přítomnosti plodu [15].

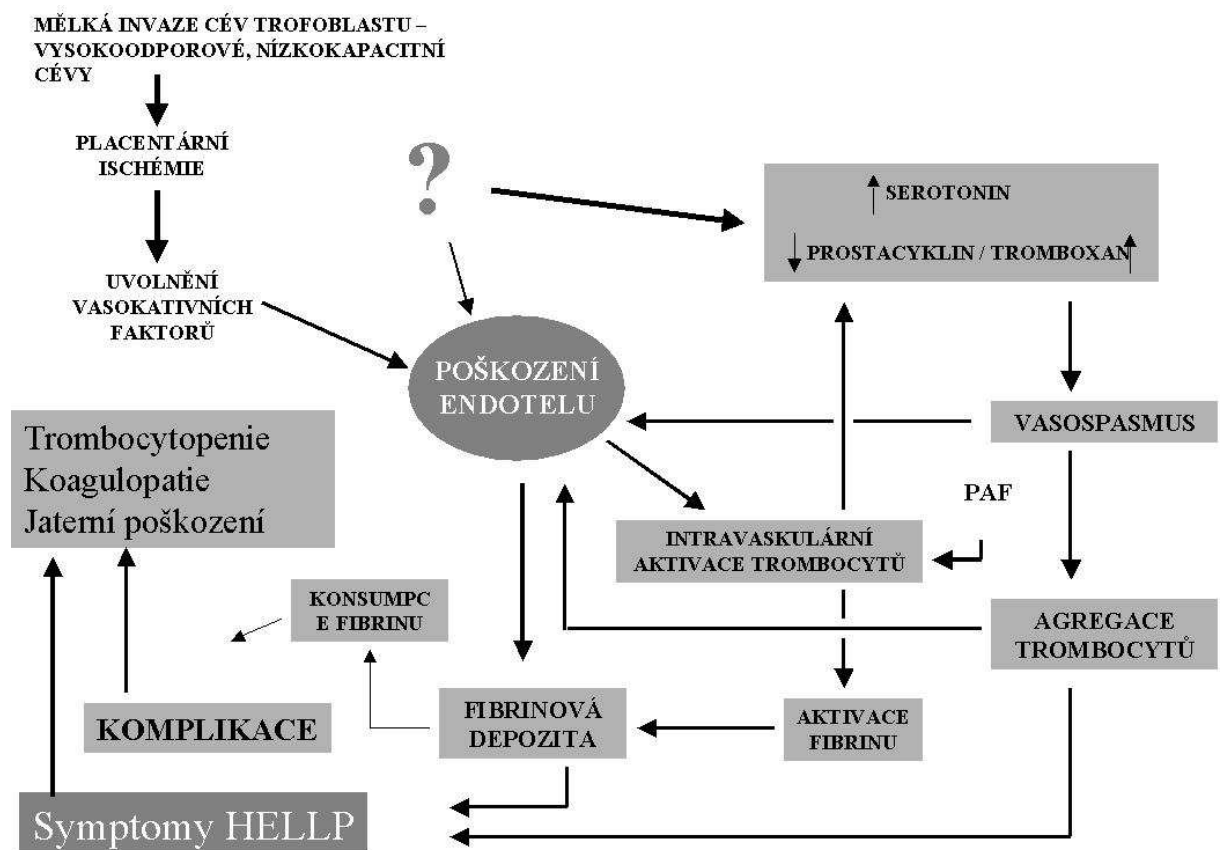
3.1. Úvod

Dnes již klasická teorie příčiny vzniku preeklampsie udává, že podstatou onemocnění je poškození endotelu s generalizovaným vazospasmem v důsledku poruchy cytotrofoblastické invaze do spirálních arteriol. Za fyziologických okolností dochází při invazi trofoblastu ke vzniku vysokokapacitních, nízkorezistentních cév schopných zajistit dostatečnou placentární perfuzi. U žen, u kterých v pozdějším stadiu gravidity dojde k rozvoji HELLP syndromu nebo preeklampsie dochází z ne zcela známých důvodů pouze k mělké invazi cév, které navíc zůstávají vysokoodporovými a nízkokapacitními, což ve svém důsledku vede k poruše uteroplacentární cirkulace, vzniku placentárního oxidativního stresu a následné placentární ischémii. V důsledku tohoto stavu dochází k uvolnění vasoaktivních faktorů do mateřské cirkulace, které způsobují další aktivaci endotelu a alteraci vaskulární reaktivity.

Generalizovaná endoteliální dysfunkce je příčinou klinických projevů preeklampsie a HELLP syndromu. Vede k hypertenzi, zvýšené vaskulární permeabilitě, způsobující proteinurii, a ke koagulopatii. U pacientek s HELLP syndromem vede vasokonstrikce a ischémie v důsledku trombotické mikroangiopatické vaskulopatie k jatrnímu poškození, ukládání fibrinu v jatrních sinusoidch a vzniku hepatálních

nekrózu v důsledku drobných krvácení do Disseho prostoru. Drobná intrahepatální krvácení napínají kapsulu jater a projevují se epigastrickou bolestí. Důvody, které u některých pacientek s preeklamsií vedou k rozvoji HELLP syndromu a u jiných nevedou, nejsou zatím plně pochopeny.

Obr. 1: Zjednodušené schéma etiopatogeneze HELLP syndromu



3.1.1. Abnormální vývoj placenty – nedostatečná invaze trofoblastu a insuficientní remodeling artérií

Při normálním vývoji placenty dochází k invazi cytotrofoblastu do mateřských spirálních cév a náhradě hladkých svalových buněk v těchto cévách. Náhrada hladkých svalových buněk je naprosto klíčovým momentem. Cévy se v důsledku

tohoto procesu stávají nízkoodporovými, vysokokapacitními a vzhledem k absenci hladkých svalových buněk nejsou schopny reagovat vasokonstrikčně na eventuální přítomnost vazokonstrikčních působků. Tento stav se nazývá remodeling artérií a začíná na konci prvního trimestru a končí kolem 18. až 20. týdne gestace.

Klíčovým okamžikem při vzniku preeklampsie je tedy nedostatečná invaze trofoblastu a nedostatečný remodeling artérií. Už v roce 1979 Brosens [14] popsal v bioptických vzorcích z placentárního lůžka přítomnost zvláštních struktur, které nazval spirálními artériemi a které se nacházely pouze u těhotenství fyziologických a jejichž anatomický původ vystopoval až do radiálních artérií hluboko v myometriu. Pro tyto cévy bylo typické, že hladké svalové buňky byly nahrazeny fibrinoidní matrix s vnořenými buňkami, o kterých předpokládal, že mají svůj původ v trofoblastu. Tento remodeling artérií vede k dilataci těchto spirálních artérií a jejich menšímu ovlivnění působky vazokonstrikčními. Všechny tyto změny ve svém důsledku zajišťují dostatečný přísun krve, potažmo kyslíku k placentě.

U těhotenství postižených preeklampií Brosens tyto struktury nenašel, našel ale běžné arteriální struktury, které neprošly touto fyziologickou změnou remodelingu z důvodu nedostatečné invaze trofoblastu. V těchto artériích zůstala zachovaná složka hladkých svalových buněk, které jsou schopny reagovat vasokonstrikčně a tím pádem jsou schopny redukovat tok krve do placenty.

Tento složitý jev invaze trofoblastu a remodeling spirálních artérií se někdy nazývá pojmem „pseudovaskulogeneze“ a je základním předpokladem normálního vývoje placenty a následně celé gravidity.

Zásadní otázkou zůstává, co je příčinou poruchy remodelingu. Doprovodným jevem při tomto složitém procesu je exprese určitých cytokinů, adhezivních molekul, extracelulární matrix a metaloproteináz [47]. Bylo vysloveno mnoho teorií příčiny insuficientní trofoblastické invaze, včetně teorií o vlivu zevního prostředí, genetických, imunologických, ale zásadní příčina mělké trofoblastické invaze zůstává neobjasněna [47].

3.1.2. Genetické faktory

Preeklampsie je onemocnění, které se v rodinách opakuje s větší frekvencí než v běžné populaci. O genetické predispozici preeklampsie tak není pochyb. Genetická predispozice je ovšem pouze jedním z faktorů vzniku preeklampsie. Zatímco riziko

vzniku preeklampsie v běžné populaci je cca 2-9%, pak u dcer preeklamptických matek stoupá riziko na 4 až 5-ti násobek a u sester nemocných žen je až 8x větší. Bylo formulováno několik možností genetické příčiny vzniku preeklampsie, mimo jiné byl popsán lokus mateřské náchylnosti k preeklampsii na chromozomu 2p13, defekt NADH ubichinonreduktázy vedoucí k vyšší produkci superoxidu [104]. Předpokládá se, že genetické faktory se spolupodílí na vzniku preeklampsie, ale nejsou rozhodujícím faktorem.

Genem, který byl zkoumán v souvislosti s HELLP syndromem je gen FAS, který kóduje několik důležitých proteinů uplatňujících se v apoptóze, programované buněčné smrti. Ve studii zkoumající A>G polymorfismus na tomto genu v pozici 670 (TNFRSF6 - Tumour necrosis factor receptor superfamily, member 6) bylo prokázáno, že substituce nukleotidů na tomto genu je spojená se signifikantně vyšším výskytem HELLP syndromu (OR 2,7, CI 95%) [100].

3.1.3. Porucha imunologické adaptace

Fetoplacentární jednotka je z imunologického pohledu do jisté míry tolerovaným štěpem, který obsahuje cizí, otcovské antigeny. Existuje teorie, dle které je porucha tolerance k tomuto štěpu provázena zpomalením invaze trofoblastu do myometria a nastartováním celé kaskády změn vedoucím ve svém důsledku ke známému mechanismu vzniku preeklampsie, tzn. porušené remodelaci cév a oxidativnímu stresu.

Preeklampsie postihuje daleko častěji primipary než ženy s anamnézou předchozí gravidity, nebo dokonce spontánního potratu. Protektivní účinek multiparity však zaniká se změnou partnera. Z toho lze usuzovat na to, že preeklampsie je spíše problém primipaternity než primigravidity [36]. Tento fakt dále podporuje hypotézu, že selhání imunitní tolerance vůči paternálním antigenům plodu má význam v patogenezi preeklampsie. Porucha imunologické tolerance zpomalí invazi trofoblastu. Ukazuje se, že nedostatečná tolerance fetoplacentární jednotky je způsobena poruchou exprese glykoproteinu HLA-G na extravilózním trofoblastu a přítomností anti - Gal protilátek, které by mohly inhibovat invazi trofoblastu do myometria. V placentě se aktivují neutrofilní leukocyty, které z granulí uvolní do plazmy elastázu a poškodí tak endotel. Aktivované neutrofily by mohly přispět k oxidačnímu stresu, který preeklampsii provází.

Také některé změny v imunologických ukazatelích jsou spojovány s preeklampsií a těhotenstvím indukovanou hypertenzí. Jedná se o změny v množství imunoglobulinů, cirkulujících imunokomplexů a aktivaci komplementu. Jedná se však spíše o následky změn v okludovaných cévách než o příčinu poruchy. Tyto představy o účasti imunologických změn v patogenezi preeklampsie jsou spíše na úrovni hypotéz než prokázaných faktů.

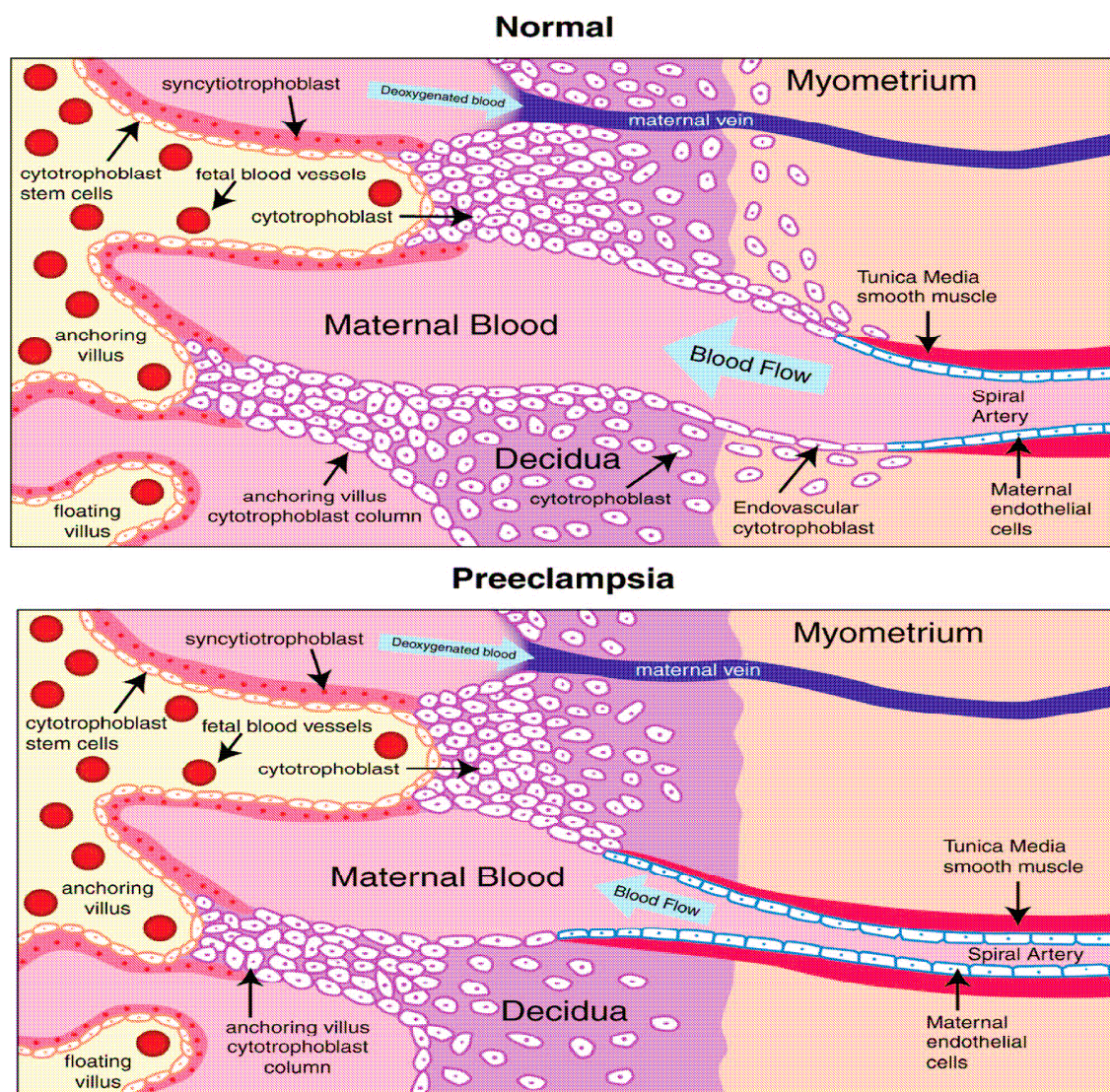
3.1.4. Teorie změny parciálního tlaku kyslíku

Odchylky parciálního tlaku kyslíku mohou regulovat invazivitu trofoblastu, jak prokázala Genbacevová ve svých studiích. [29,30]. Později byla Caniggiem a Rajakumarem popsána přítomnost transkripčních faktorů indukovaných hypoxií u placent preeklamptických matek [16,84].

Není zatím jasné, zda tato hypoxie je primárním nebo sekundárním fenoménem [53]. Genová exprese z placent preeklamptických matek vykazovala shodné známky s genovou expresí od matek, které porodily ve vysoké nadmořské výšce [95]. Abnormální placentace a následná hypoxie vedou ke vzniku rozpustných faktorů, které později působí na mateřský cévní systém a vyvolávají endoteliální dysfunkci a klinické syndromy preeklampsie.

Byla rovněž studována role xantinoxidoreduktázy (XOR) při poškození endotelu, která by se mohla uplatnit jako primární zdroj reaktivních forem kyslíku. Z primárního místa poškození se pak tato porucha může postupně šířit i na cévní endotel jiných orgánů - jater, GIT, ledvin [65]. XOR tak funguje jako zdroj superoxidu, který reaguje s kyslíčnickem dusnatým (NO) na peroxynitrit, oxidující se na nitrity a nitráty. Tím může dojít ke snížení kyslíčnicku dusnatého vedoucí k vazokonstrikci a hypertenzi [103,104].

Obr. 2: Abnormální placentace u preeklampsie [47]



3.1.5. Dvoustupňové onemocnění

V 90. letech byla Redmanem poprvé vyslovena hypotéza, že preeklampsie je dvoustupňová porucha [15].

3.1.5.1. První stadium

První stadium bylo definováno jako snížení placentární perfuze provázené tvorbou různých rozpustných působků, které vstupují do mateřské cirkulace a mohou způsobovat rozsáhlou endoteliální dysfunkci [22,88].

3.1.5.2. Druhé stadium

Druhé stádium je klasicky popisováno jako stadium klinických příznaků u ženy. Prvním zjevným zevním měřitelným projevem preeklampsie je vesměs hypertenze. Bylo by příliš zjednodušující redukovat hlavní závažnost preeklampsie a HELLP syndromu na přítomnost hypertenze. Preeklampsie je multiorgánovým onemocněním, pro které je typická generalizovaná redukce perfúze orgánů [87]. K této redukci dochází v důsledku generalizované vazokonstrikce, aktivaci koagulační kaskády, pravděpodobnou tvorbou mikrotrombů a redukcí intravaskulárního objemu. K vasokonstrikci dochází zejména v důsledku zvýšené vaskulární reaktivity na vasokonstrikční působky. Redukce intravaskulárního objemu je částečně způsobena únikem tekutiny extravaskulárně v důsledku zvýšené permeability cévní stěny a v důsledku hypalbuminémie.

3.1.5.3. Mechanismy přechodu mezi stádii 1 a 2

Vzhledem k tomu, že všechny stavy se sníženou placentární perfúzí nerezultují v preeklampsi či HELLP syndrom (např. IUGR), je zjevné, že se musí vyskytovat další rizikové faktory, které podnítlí rozvoj mateřského syndromu. Mnoho z těchto faktorů, které vedou k rozvoji mateřského preeklamptického syndromu jsou přitom shodné s rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob.

Za přímou spojkou mezi 1. a 2. stadiem byly označeny „toxiny“ vzniklé v placentě – mezi tyto toxiny byly zařazeny cytokiny, antiangiogenní faktory a mikropartikule syncytiotrofoblastu (STBM). Vzhledem k přítomnosti oxidativního stresu se předpokládala i přítomnost reaktivních metabolitů kyslíku (reactive oxygen species), volných radikálů.

Všechny tyto změny naznačují, že ústředním patofyziologickým momentem je endoteliální dysfunkce se systémovou provázená systémovou zánětlivou odpovědí. Hlavní výzkum se tak zaměřuje především na tuto skutečnost, na rozdíl od předchozích výzkumů, které se snažily zejména objasnit všechny faktory vedoucí ke změnám krevního tlaku. Zajímavou skutečností je rovněž fakt, že zvýšená endoteliální dysfunkce provázená systémovou zánětlivou odpovědí vede mimo jiné k redukci intravaskulárního objemu a redukci toku krve k orgánům včetně uterinních artérií a tím dále zhoršuje placentární průtok se zacyklením celé situace. Jakmile jednou dojde k rozvoji preeklampsie a HELLP syndromu, nedojde nikdy k

úpravě stavu a naopak dochází často k velmi rychlé progresi, zejména v případech časně a těžké preeklampsie.

Vaskulární změny u preeklampsie jsou doprovázeny závažnými metabolickými změnami, které odpovídají změnám při metabolickém syndromu, jako např. zvýšená inzulinová rezistence, vyšší hladiny LDL cholesterolu, triglyceridů, snížené hladiny HDL [87].

Placentární hypoperfuze s hypoxií je nezbytným faktorem vzniku preeklampsie, nikoliv ovšem jediným. Ne všechny stavy rezultují v preeklampsii, jako např. případy nitroděložní růstové retardace (IUGR). Khong v roce 1986 našel u žen s IUGR a bez preeklampsie poruchu remodelingu cév stejnou jako měly pacientky s preeklampií [57]. Je tedy zjevné, že samotná porucha remodelingu artérií nevede ke vzniku preeklampsie a je zapotřebí dalších faktorů. Těmito faktory mohou být příčiny genetické, enviromentální, dietní a jiné. Mateřské predisponující faktory jsou v podstatě identické s rizikovými faktory pro rozvoj kardiovaskulárních komplikací později v životě. Je zajímavým zjištěním, že zatímco tyto prediponující faktory se projeví v průběhu gravidity a vedou k rozvoji a zhoršení průběhu preeklampsie a HELLP syndromu a po ukončení gravidity odezní, tak mimo těhotenství je zapotřebí mnohem delšího časového úseku než vzniknou závažné kardiovaskulární komplikace.

3.1.6. Časná versus pozdní preeklampsie

V posledních několika letech se intenzivně rozvíjí koncept časně a pozdní preeklampsie (před a po dokončeném 34. týdnu), u kterých někteří autoři předpokládají, že mohou mít různou etiologii a že se v podstatě jedná o dvě, relativně málo podobné jednotky. Přes stále probíhající a nedokončený výzkum je zřejmé, že mezi těmito dvěma skupinami jsou zřetelné rozdíly, i když Huppertz některé tyto teorie kriticky rozebírá a vznáší námitky [46].

3.1.6.1. Pozdní preeklampsie

Pozdní preeklampsie představuje více než 80% případů preeklampsie. Většina z těchto případů je spojena s normální velikostí plodu, normálními průtoky nebo jen mírnými odchylkami v průtoku krve uterinními artériemi a nezměněným poměrem S/D v umbilikálních artériích. Riziku rozvoje pozdní formy preeklampsie jsou

vystaveny zejména ženy se zvětšenou placentární masou nebo povrchem (diabetes, vícečetná těhotenství, anémie, těhotenství probíhající ve vysoké nadmořské výšce apod.). Klinicky se pozdní forma projevuje hlavně hypertenzí a proteinurií, stejně jako časná forma, která je ale navíc doprovázena IUGR.

3.1.6.2. Časná preeklampsie

K rozvoji časně formy dochází před 34. týdnem gravidity, tvoří sice pouze 5-20% všech případů, je ale mnohem závažnější. Typický je pro ni rovněž neadekvátní a nekompletní invaze trofoblastu do mateřských spirálních artérií, ale dominuje zvýšená periferní rezistence placentárních cév, která vede jednak k změnám toku krve v uterinních artériích (notches) a jednak k abnormálnímu průtoku krve umbilikálními cévami, ke zvýšení systolicko-diastolického poměru (S/D ratio) a následně k závažné růstové retardaci.

Všechny výše zmíněné projevy vidíme ovšem rovněž u těhotenství komplikovaných pouze IUGR, bez preeklampsie [46]. Tento fakt vedl Huppertze k myšlence, že se vůbec nemusí jednat o rysy, které mají co do činění s preeklampií, ale jedná se o skutečnosti, které jsou spojeny s IUGR a že časná preeklampsie se nijak neliší ve svém etiopatogenezi od pozdní preeklampsie, je pouze závažná tím, že je spojena vždy s IUGR. V Ostatních parametrech (proteinurie a hypertenze) jsou časná a pozdní forma identické a u obou forem vidíme často extrémní hodnoty, tzn. že v „klasických“ projevech, jako je proteinurie a hypertenze, jsou stejné. Podporou Huppertzovy teorie jsou studie popisující možnost predikce preeklampsie dopplerovskou ultrazvukovou technikou, kde metoda byla schopna predikovat časný vznik IUGR se 100% detekční jistotou, časnou formu preeklampsie ovšem jen s detection rate 33%, resp. 40% [70,77].

3.1.7. Co je spouštěčem změn a které období je pro rozvoj preeklampsie kritické?

V posledních letech byly publikovány práce mírně modifikující původní Redmanovu dvoustupňovou teorii a hlavní otázkou zůstává, ve kterém stádiu gravidity k poruše trofoblastu skutečně dochází. Zatímco doposud platné teorie počítaly s poruchou extravilózního trofoblastu, která následně vedla k selhání extravilózního trofoblastu adekvátně transformovat mateřské spirální artérie, tak dle

nejnovějších publikovaných prací se zdá, že k poruchám placentace dochází dříve než se původně předpokládalo (107). Huppertz na základě svých vlastních výzkumných prací vyslovil teorii, že abnormality placenty, ke kterým dochází u preeklampsie vznikají ještě před remodelingem cév. Poukazuje na možnost abnormálního vývoje už ve stádiu diferenciacie moruly na trofoblast nebo lehce opožděné diferenciacie trofoblastu na cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. Tuto teorii podporují zejména studie zaměřující se na hledání časných biochemických markerů, různých placentárních proteinů u žen, u kterých v pozdějším stadiu dojde k rozvoji preeklampsie, přičemž některé tyto sérové markery, zejména PP13, jsou detekovatelné již v 7. týdnu gravidity [45], tzn. ještě před obdobím, kdy dochází k toku krve do intervilózního prostoru. Huppertz předpokládá, že změny ve vývoji placenty v časně graviditě jsou sice základní příčinou abnormální placentace v pozdější graviditě, posouvá ale počátek těchto změn do ještě dřívějšího stádia placentace, neboť poruchy transformace spirálních artérií se mohou projevit až na konci prvního trimestru, tzn. v době, když už je založený tok krve do intervilózního prostoru.

Na základě výše uvedeného je pravděpodobné, že ke změnám vedoucím později k rozvoji preeklampsie, dochází již v období implantace nebo dokonce i dříve. Podle období, ve kterém dojde k inzultu trofoblastu, dochází pak k následujícím situacím [46]:

1. inzult trofoblastu v době vývoje moruly v blastocystu, vede k poruše celé vrstvy trofoblastu a výsledkem může být kombinace IUGR s preeklampií, u těžších inzultů pak abort.
2. dojde-li k inzultu mírně později, v době kdy dochází k prvnímu dělení na cytotrofoblast a syncytiotrofoblast, dojde ke stejné situaci jako v bodě 1
3. dojde-li k inzultu v době diferenciacie extravilózního trofoblastu, může se později vyvinout „čistý“ IUGR se všemi typickými charakteristikami jako jsou změny v toku uterinními artériemi apod.
4. insult v době diferenciacie vilózního trofoblastu vede k rozvoji preeklampsie s typickými průvodními jevy jako jsou uvolnění STBM a rozvojem mateřské zánětlivé odpovědi.

3.1.8. Fyziologický systém odstraňování starých částí trofoblastu

Během normálního těhotenství dochází k hromadění starých buněk syncytiotrofoblastu podléhajících apoptóze do apikálních protruzí syncytiotrofoblastu, tyto struktury se nazývají syncytiální uzly (SK – syncytial knots). Tyto uzly jsou relativně velké, ohraničené membránou, vznikají při apoptóze starých buněk a jsou uvolňovány do mateřského oběhu a krevním oběhem dorazí do prvního kapilárního řečiště, kterým jsou plíce matky. Vzhledem ke své velikosti jsou zde vychytány plícními makrofágy a do dalšího mateřského oběhu se již nedostávají a nemohou být tudíž detekovány a nemohou tudíž ani způsobit aktivaci endotelu a systémovou zánětlivou odpověď [46].

3.1.8.1. *Porucha systému odstraňování trofoblastu - vnitřní faktory*

V případě preeklampsie se uvolňování částic syncytiotrofoblastu neřídí výše uvedenými pravidly. Hlavním mechanismem odstraňování starých buněk již není cesta syncytiálních uzlů, ale uplatňuje se hlavně nekróza a aponekróza, což je výraz pro narušený systém apoptózy – výsledkem je vylučování trofoblastického materiálu, štěpeného, volného, neohrazeného membránou, tzv. STBM (syncytiotrofoblast microvilli). Vzhledem ke své velikosti, cca 200-600 nm, může tento materiál procházet kapilárním systémem plic a je detekován v oběhu matky a způsobuje systémovou zánětlivou odpověď a změny endotelu. Proč dochází k projevům preeklampsie až po 20. týdnu může být vysvětleno množstvím vylučovaných STBM, které je výrazně vyšší na konci těhotenství než na začátku, kdy dochází zejména k rychlé tvorbě trofoblastu, zatímco v pozdějších stádiích už jen k udržování rovnovážného stavu a na konci gravidity pak už spíše převládá odlučování nad tvorbou nových struktur. Popsaný mechanismus je vnitřním mechanismem, který sám o sobě nestačí k rozvoji preeklampsie a je ovlivněn i vnějšími faktory [43,44,48,50,51,59].

3.1.8.2. Porucha systému odstraňování trofoblastu – vnější faktory

Vnější faktory jsou v zásadě dvojí:

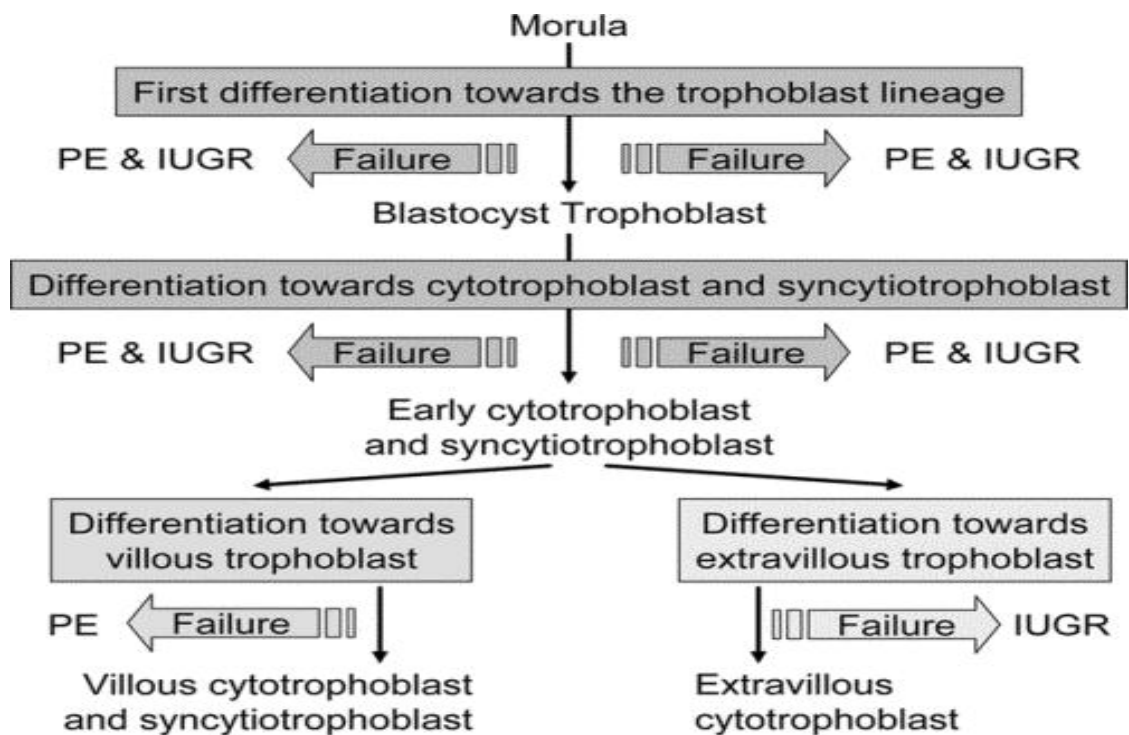
1. situace provázené větší placentární masou nebo povrchem (diabetes mellitus, mnohočetná těhotenství, vyšší nároky na kyslík – např. anémie, vysoká nadmořská výška) – v tomto případě se jedná v podstatě o situaci, která je způsobena uvolňováním většího množství syncytiálních uzlů (SK). V případě, že se matka neumí vypořádat se zvýšenou náloží SK, mohou některé z nich podlehnout sekundární nekróze, projít přes kapilární plicní systém do oběhu a způsobit preeklamptický syndrom [3,24,26,32,34].
2. situace, kdy mateřská zánětlivá odpověď je neadekvátní (zvýšená) nebo je snižená akceschopnost plicních makrofágů vychytávat SK. Výsledkem je uvolnění většího množství STBM do oběhu matky a rozvoj preeklampsie [43,44,45,60,90,94,97].

Preeklampsie je tedy výsledkem selhání poruchy diferenciací vilózního syncytiotrofoblastu, které na placentární straně vede k abnormálnímu uvolnění trofoblastického materiálu do mateřské cirkulace. Tímto materiálem jsou nekrotické a aponekrotické fragmenty trofoblastu způsobující zánětlivou odpověď matky a ve svém důsledku vedoucí k vyjádření mateřského syndromu preeklampsie.

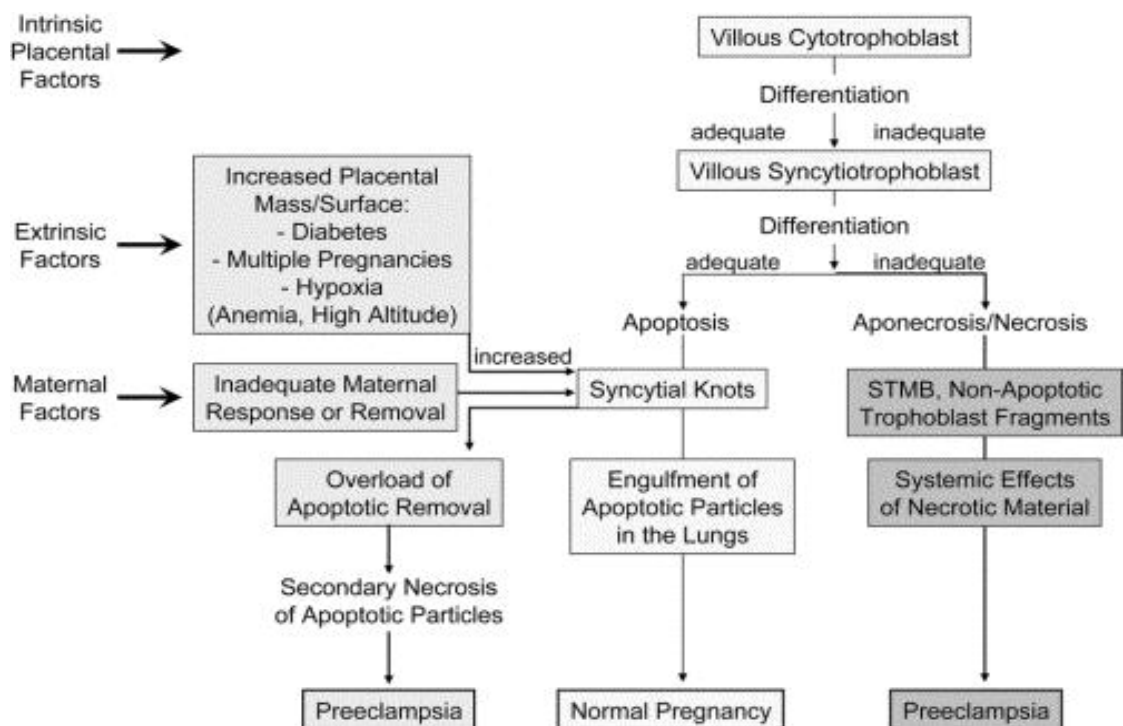
Porucha invaze extravilózního trofoblastu vede k rozvoji IUGR. Touto teorií je poměrně přesně oddělen původ preeklampsie a IUGR [46].

Výše uvedená teorie je shrnutá v následujících schématech. (Publikováno se souhlasem autora – Huppertz B. [46]).

Obr. 3: Schéma časného vývoje trofoblastu a vývoj jednotlivých komplikací na podkladě poruchy v různých časových obdobích.



Obr. 4: Přehled událostí v časném stádiu normálního těhotenství a v situaci vedoucí k preeklampsii



Přes odlišnosti uvedené v předchozích etiopatogenetických modelech je zjevné, že ústředním patofyziologickým momentem je endoteliální dysfunkce. K pochopení změn probíhajících v endotelu je nutná znalost normální endoteliální funkce.

4. Endotel

4.1. Současný stav znalostí k dané problematice

Endotelové buňky tvoří spolu s buňkami hladkého svalstva a fibroblasty cévní stěnu. Jsou umístěny v jedné vrstvě na luminálním povrchu cév. Netvoří jen pasivní výstelku cévního lumen, ale naopak jsou extrémně metabolicky aktivním orgánem tvořícím bariéru mezi krví a tkáněmi. Lze je považovat jak za senzorické struktury přijímající hemodynamické a humorální signály, tak za efektorové buňky, produkující celou řadu působků s vlivem jak na sousední vrstvu svalových buněk, tak cestou cirkulace na celý organismus. V organismu dospělého člověka se nachází 6 triliónů endotelových buněk, tyto tvoří orgán vážící 1 kg a zaujímající plochu 5000 m² [17]. Jako první objevil díky užití primitivního mikroskopu existenci bariéry mezi krví a tkáněmi Malpighi, který rovněž popsal kapilární spojení mezi drobnými artériemi a žilami [17]. Endotelové buňky nejsou uniformní hmotou, ale vykazují výraznou orgánovou specifitu. Fenotyp endotelií se liší v závislosti na umístění v jednotlivých orgánech a dokonce i v různých segmentech cév jednoho orgánu [39]. Regulace fenotypu dokonce umožňuje odlišné složení endoteliálních struktur v jednom místě v různých časových úsecích [39].

Intaktní endotel má za fyziologických podmínek silný inhibiční vliv na koagulaci prostřednictvím faktorů, které syntetizuje a uvolňuje či exprimuje na svém povrchu. Dva z těchto faktorů – prostaglandin I₂ (PGI₂ či prostacyklin) a oxid dusnatý (NO či endothelium derived relaxing factor – EDRF) – mají silnou vazodilatační aktivitu [39]. Působí na buňky hladké svaloviny v cévní stěně a ovlivňují tak krevní průtok. Obě substance též inhibují agregaci destiček a adhezi leukocytů.

Endotelové buňky obsahují na svém povrchu celou řadu receptorů, kterými přijímají jak hemodynamické signály (intenzitu pulsace, proudění a roztažení cévní stěny), tak humorální působky (receptory cytokinů, růstových faktorů, bakteriálních substancí, angiotenzinu II, koagulačních faktorů II, V, IX, X apod.) [76]. Na základě těchto podnětů dojde k aktivaci endotelu, což vede k uvolňování celé řady produktů, kterými endotelové buňky řídí vazomotoriku (cévní tonus, krevní tlak, perfuzi orgánů), koagulaci (adhezi a agregaci trombocytů, aktivaci koagulační kaskády a fibrinolýzy), udržování reologických vlastností krve a v neposlední řadě zánětlivou

reakci (migraci a chemotaxi leukocytů, monocytů a makrofágů, fagocytózu, cévní permeabilitu) [7,17]. Všechny tyto děje potom hrají klíčovou roli v regulaci buněčného metabolismu. Produkty endotelových buněk jsou uvedeny níže.

V poslední době dochází k prudkému rozvoji poznatků o funkci produktů aktivace endotelových buněk a snaží se vyvinout laboratorní metody k jejich detekci. V minulosti již byl prokázán význam markerů aktivace endotelu při jeho poškození následkem aterosklerózy (především v akutní fázi ischemie myokardu, dolních končetin a ischemických cévních mozkových příhod umožňuje vyšetření jejich hladiny předpovědět tíži příhody). Prediktivní potenciál markerů aktivace endotelových buněk ke stanovení rizika vývoje aterosklerózy v budoucnosti je teprve zkoumán. Stejně tak je zájem odborníků zaměřen na význam stanovení těchto markerů u dalších patologických stavů spojených s poškozením endotelu, jako je např. vznik maligních nádorů a jejich metastázování či patologické stavy v těhotenství (preeklampsie a diabetes mellitus). Hypertenzní onemocnění v těhotenství a preeklampsie jsou multisystémová onemocnění charakterizovaná hypertenzí, někdy s proteinurií a generalizovanou systémovou vazokonstrikcí. Při preeklampsii dochází na základě insuficientní trofoblastické invaze k hypoxii placenty a sekreci faktorů do mateřské cirkulace, které způsobují aktivaci endotelu a alteraci vaskulární reaktivity. Tyto cirkulující faktory však dosud nebyly přesně identifikovány.

Bylo již potvrzeno, že v klinické fázi onemocnění dochází k signifikantnímu zvýšení některých látek, které signalizují poškození endotelu – endotelin, vitronektin a endoteliální adhezivní molekuly VCAM – 1 (vascular cell adhesive molecules), ICAM – 1 (intercellular adhesive molecules) [102]. V posledních letech se prudce rozvíjejí laboratorní metody stanovující další markery aktivace endotelu, např. t-PA, PAI-1, vWf, EPCR, trombomodulin, metaloproteinázy a jejich inhibitory a endotelové mikropartikule s prokoagulační aktivitou, jejichž význam již byl prokázán např. při alteraci endotelu následkem aterosklerózy, méně jsou zatím prozkoumány jejich změny v průběhu těhotenství a při rozvoji preeklampsie. V následující části je uveden přehled některých vyšetřovaných markerů aktivace endotelu, jejich klinický význam a možnosti laboratorního stanovení.

4.2. Produkty endotelových buněk

Antikoagulační efekt

- o trombomodulin
- o protein C
- o protein S
- o heparin
- o tkáňový aktivátor plazminogenu
- o prostacyklin
- o oxid dusnatý

Prokoagulační efekt

- o von Willebrandův faktor
- o tkáňový faktor
- o tromboxan
- o inhibitor aktivátoru plazminogenu
- o faktor V

4.2.1. Tkáňový aktivátor plazminogenu

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je serinová proteáza s fibrinolytickou aktivitou. Je detekovatelná v celé řadě tělních tekutin (sliny, mléko, žluč, cerebrospinální mok, moč), nejvyšší koncentrace je v orgánech s bohatým cévním zásobením (děloha, ledviny, plíce) [76]. Sekrece t-PA v klidovém stavu je velmi nízká, stejně tak jako jeho hladina v cirkulaci, odkud je rychle degradován, ale syntéza stimulovaná různými podněty je velmi rychlá. Endotelové buňky jsou hlavním místem jeho produkce v organismu, dalším zdrojem jsou aktivované monocyty a megakaryocyty [76]. Tkáňový aktivátor plazminogenu je hlavním aktivátorem fibrinolýzy a jediným specifickým aktivátorem plazminogenu. Aktivace plazminogenu prostřednictvím t-PA je potencována fibrinem – pouze v jeho přítomnosti může t-PA aktivovat plazminogen štěpením na aktivní molekuly plazminu [76]. Plazmin potom odbourává fibrin obsažený v trombech. V plazmě se t-PA nachází v koncentraci 2-8 ng/ml, nicméně 95% tohoto množství je vázáno v komplexech s PAI-1 a pouze 5% tvoří volná forma. Zvýšené hodnoty t-PA

nacházíme po chirurgických zákrocích, traumatech, při zánětech, postižení cév aterosklerozou, léčbě heparinem, ale i po větší fyzické zátěži, a stresu, takže odběr krve je nutno provádět za klidových podmínek k vyloučení falešně pozitivních výsledků. Další příčinou zvýšené hladiny t-PA je těžší jaterní onemocnění, protože játra jsou hlavním místem odbourávání [61]. Hladina t-PA bývá nejčastěji vyšetřována metodou ELISA.

4.2.2. Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1

Inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1) je přirozený inhibitor t-PA a urokinázy a je produkován aktivovanými endotelovými buňkami, hepatocyty a megakaryocyty [76]. V plazmě se vyskytuje ve dvou formách – ve funkčně aktivní volné formě, která je stabilizována vazbou na vitronektin a ve funkčně inaktivní formě v komplexu s t-PA či urokinazou – 80% celkového množství.

PAI-1 je rovněž skladován v alfa - granulích trombocytů [76]. Bazální hladina v plazmě je nízká, vykazuje diurnální cyklus s ranním peakem. PAI-1 je „proteinem akutní fáze“, jeho hladina se tedy zvyšuje při infekcích, malignitách a v pooperačních stavech [61]. Zvýšená hladina PAI-1 je nalézána u pacientů s projevy aterosklerozy, při léčbě heparinem, při zánětech a v těhotenství. Fyziologická koncentrace PAI-1 je za bazálních podmínek 7-23 ng/ml, je stanovována metodou ELISA.

4.2.3. Von Willebrandův faktor

Von Willebrandův faktor (vWf) je produktem převážně endotelových buněk (85% celkového množství) a tento je pak skladován ve Weibel-Paladeho tělískách. Zbývajících 15% je tvořeno v megakaryocytech a skladováno v alfa-granulích trombocytů. Von Willebrandův faktor hraje klíčovou roli v tvorbě primární hemostatické zátky – umožňuje adhezi trombocytů k místu poškození cévní stěny a dále stabilizuje koagulační faktor VIII, který chrání před degradací. Fyziologická hladina antigenu vWf je 61-158 % a zvyšuje se u celé řady stavů spojených s aktivací endotelu – trauma, operace, infekce, malignity. Stanovení antigenu vWf je možné imunoturbidimetricky.

4.2.4. Trombomodulin

Trombomodulin je transmembránový glykoprotein s významným inhibičním účinkem na proces koagulace. Je vázán na cévním endotelu. Jeho funkcí je inhibice trombinu, se kterým vytváří po vazbě inaktivní komplex [61]. Další klíčovou roli v inhibici koagulace hraje aktivací proteinu C, a to prostřednictvím komplexu s aktivovaným koagulačním faktorem II [61]. Aktivace proteinu C komplexem trombomodulin/trombin probíhá 1500-2000krát rychleji, než samotným trombinem [76]. Z povrchu endotelových buněk je trombomodulin uvolňován proteolytickým štěpením elastázou neutrofilů při jejich poškození [76]. Laboratorně lze hladinu trombomodulinu stanovit metodou ELISA, fyziologická koncentrace je u mužů 10-52 ng/ml, u žen 10-42 ng/ml.

4.2.5. Endoteliální receptor proteinu C

Endoteliální receptor proteinu C (EPCR) je transmembránový glykoprotein primárně lokalizovaný na endotelu velkých cév. Jeho funkce spočívá v umožnění vazby proteinu C (PC) na endotel a zde jeho interakci s komplexem trombin – trombomodulin, což výrazně urychluje aktivaci PC (až pětinasobně) a současně propůjčuje PC jeho protizánětlivou aktivitu [20]. Antikoagulační působení aktivovaného PC je zprostředkováno inhibicí aktivovaného koagulačního faktoru V. a VIII. Laboratorní stanovení solubilní formy EPCR je možné metodou ELISA, fyziologické rozmezí je 65-230 ng/ml.

4.2.6. Endotelové mikropartikule

Neporušený povrch endotelu hraje klíčovou roli v udržování integrity cévní stěny a hemostázy. Při alteraci endotelu a obnažení subendoteliálních struktur dochází k adhezi leukocytů a trombocytů na postižené místo, k aktivaci koagulačních faktorů a dalšímu poškozování endotelových buněk, což má za následek uvolňování jejich fragmentů (mikropartikulí) do cirkulace. Endotelové mikropartikule (EMP) jsou drobné ($\leq 1 \mu\text{m}$) vezikuly, jejichž množství a struktura nám umožňuje posoudit míru a povahu endoteliálního poškození. Pro vyšetření EMP je nejvýhodnější průtoková cytometrie s použitím celé řady monoklonálních protilátek, za fyziologických poměrů je nalézáno 1177-1765 částic/ μl .

4.2.7. Metaloproteinazy a inhibitory metaloproteináz

Metaloproteinazy (MMP) a jejich inhibitory (TIMP) představují skupinu proteolytických enzymů, které štěpí složky extracelulární matrix [78].

Při aktivaci MMP a TIMP jako následku aktivace endotelových buněk v důsledku jak fyziologických pochodů (růst a diferenciacie tkání a orgánů), tak patologických procesů (zánět, ischemie, nádorová transformace apod.) dochází k modifikaci extracelulární subendoteliální matrix těmito enzymatickými systémy, poté k migraci endotelových buněk s následnou neovaskularizací či zánikem cév v dané oblasti.

MMP a TIMP tedy hrají důležitou roli v procesu remodelace cévní stěny, při tvorbě kolaterál v ischemizované tkáni, při procesu metastazování a neovaskularizace nádorů a v neposlední řadě v rámci implantace embrya do děložní sliznice a vývoji utero-placentární jednotky.

4.3. Predikce syndromu HELLP

V kontrastu s relativně jasnými diagnostickými kritérii jsou limitované možnosti predikce onemocnění. V praxi bývá HELLP syndrom diagnostikován až na základě klinických projevů, což jsou již příznaky pokročilého stádia onemocnění. Zásadní změny, jako jsou endoteliální dysfunkce, metabolické změny, zvýšená reaktivita cév a generalizovaná vasokonstrikce, stejně jako aktivace koagulační kaskády, probíhají již podstatně dříve.

Vzhledem k závažnosti tohoto onemocnění existuje snaha nalézt testy s prediktivním významem. S ohledem na podstatu choroby není překvapením, že se výzkum v oblasti predikce preeklampsie a HELLP syndromu koncentruje především do další snahy o pochopení příčin patologické invaze trofoblastu a změn provázejících aktivaci endotelu.

V současné době existuje mnoho klinických, laboratorních a genetických testů, které byly použity pro predikci preeklampsie a HELLP syndromu. Žádný z nich nemá doposud významnější klinický význam [102].

4.3.1. Biochemické změny spojené s HELLP syndromem

Faktory způsobující aktivaci vaskulárního endotelu nebyly doposud přesně identifikovány. Bylo již potvrzeno, že v klinické fázi dochází ke zvýšení některých látek signalizujících poškození endotelu jako např. endotelinu, vitronektinu, E-selectinu (CD62E), platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31), P-selectinu (CD62P) a endoteliální adhezivní molekuly VCAM-1 (vascular cell adhesive molecules, CD106) a ICAM (intercellular adhesive molecules, CD54). U posledních dvou bylo prokázáno, že signifikantně zvýšené hodnoty u jinak zdravých těhotných mají vysoce prediktivní hodnotu pro časnou identifikaci žen, kterým hrozí rozvoj preeklampsie [7].

Zkoumán byl rovněž význam antiangiogenních peptidů – především molekuly soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), což je peptid produkovaný placentou neutralizující účinek proangiogenního efektu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a placentárního růstového faktoru (PlGF) [76]. V pokusu na krysách bylo prokázáno, že zvýšené hladiny sFlt-1 jsou spojeny se sníženou hladinou volného VEGF a volného PlGF a že antiangiogenní stav spojený s preeklampií může být zvrácen podáním zvýšeného množství VEGF a PlGF [40]. U pacientek s rozvinutou preeklampií byly potvrzeny elevace hladin sFlt-1, v jiných studiích byla prokázána přímá úměra mezi hladinou sFlt-1 a stupněm preeklampsie [39,61], nicméně u některých žen s preeklampií byly prokázány hodnoty sFlt1 zcela v mezích normy zpochybňujíc tak význam klinického využití sFlt1 v rámci predikce preeklampsie či HELLP syndromu [40]. Další nevýhodou je skutečnost, že sFlt-1 a PlGF jsou schopny predikovat preeklampsii jen relativně krátce před jejím rozvojem, nejsou specifické pouze pro preeklampsii, ale i pro IUGR a identifikují přibližně pouze 50% pacientek. [90,97]. Hladiny PlGF u žen, u kterých později dojde k rozvoji preeklampsie, začínají klesat 9 až 11 týdnů před rozvojem hypertenze a proteinurie s nejvýraznějším poklesem kolem 5 týdnů před nástupem příznaků. Podobný, ale méně výrazný pokles hladin byl zaznamenán u žen s nitroděložní růstovou retardací. V mnoha studiích bylo prokázáno, že intenzita poklesu PlGF koresponduje s tíží onemocnění [11]. PlGF je pro svou velikost, na rozdíl od sFlt-1, vylučován do moči a může být detekován. Jeho hladiny v moči byly u žen s preeklampií výrazně nižší než u zdravých žen, největší rozdíl byl

zaznamenán 5 týdnů před nástupem preeklampsie [8]. Všechny pacientky, u kterých došlo do 5 týdnů k rozvoji preeklampsie mohly být odlišeny od kontrolní skupiny zdravých žen na základě poměru biochemických markerů sFlt-1 a močového PlGF v hodnotách deset ku jedné a více [76].

U pacientek s preeklampií dochází k uvolňování fragmentů mikrovilózního syncytiotrofoblastu do mateřské cirkulace. Tento stav vede k poškození endoteliálních buněk a pod nimi lokalizované extracelulární matrix (ECM), která je modifikována metaloproteinázami (MMP). Regulace aktivace MMP je zajištěna především tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMP) a rovnováha mezi MMP a TIMP je nezbytnou podmínkou pro úspěšnou placentaci [78]. U žen s preeklampií byly zjištěny vysoké hladiny MMP-2 ovlivňujících štěpení velkého endotelinu na střední endotelin, který má silné vasokonstrikční účinky. Stejně tak byly prokázány i poruchy hladin MMP-9 u pacientek s těžkou preeklampií [102].

Další z markerů, kterému je věnována pozornost je placentární protein PP13, který je uvolňován při procesu placentace. Hodnoty PP13 byly signifikantně nižší u pacientek, u kterých později došlo k rozvoji preeklampsie, prediktivní hodnota tohoto markeru je tím silnější, čím časnější a závažnější je preeklampsie [45,89].

4.3.2. Nebiochemické možnosti predikce

Vedle predikce na základě biochemických markerů existují i další formy predikce, např. ultrazvukové či kombinované ultrazvukové a anamnestické.

Ultrazvuková predikce vychází z jednoduchého předpokladu, že průtok krve uterinními artériemi bude ovlivněn u pacientek s preeklampií, hypertenzí a IUGR. Nikolaidesovy práce z roku 2006 prokázaly jen nízkou detekci pro identifikaci preeklampsie (40%) při relativně vysoké falešné pozitivitě 10%. Větší práce Pilalisova prokázala pouze 33% sensitivitu pro detekci časně preeklampsie, ale 100% sensitivitu pro detekci IUGR.

Poslední práce Poona z října 2009 nabízí výsledky o něco málo nadějnější. Složitým kombinovaným testem posuzujícím pulzatilní index uterinní artérie měřený mezi 11. a 13. týdnem se středním arteriálním tlakem měřeným v klidu a ostatními rizikovými faktory (věk matky, body mass index, rasa, preeklampsie v anamnéze, chronická hypertenze a způsob koncepce) při nastavené 10% falešné pozitivitě

přinesla detection rate pro časnou preeklampsii 81%, pro pozdní preeklampsii 45% a 35% pro gestační hypertenzi [81].

Z uvedeného přehledu vyplývá, že přes částečné úspěchy a intenzivní výzkum není predikce preeklampsie rutinně dostupná ani možná. Predikce HELLP syndromu je doposud zcela nemožná, neboť nejsou známe důvody, proč HELLP vzniká. V praxi tak stále diagnostikujeme preeklampsii a HELLP syndrom až na základě klinických známek, tzn. pozdě.

Snaha najít markery, na jejichž základě by byla možná predikce těchto stavů je jednou z priorit současné perinatální medicíny.

5. Vlastní výzkumný projekt

5.1. Cíl práce

Cílem vlastního výzkumného projektu je analýza vybraných markerů aktivace endotelu u těhotných s HELLP syndromem a preeklampií v porovnání se zdravými těhotnými se snahou o nalezení markerů, které by bylo možné využít v predikci preeklampsie a/nebo HELLP syndromu.

5.2. Pracovní hypotéza

Předpokládáme, že plazmatické vzorky žen s HELLP syndromem a preeklampií by ve srovnání se vzorky plazmy od žen s normálním těhotenstvím mohly obsahovat zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9 v poměru k hladinám jejich endogenního inhibitoru TIMP2. Rovněž předpokládáme významné rozdíly u ostatních markerů aktivace endotelu (t-PA, PAI-1, vWf, EPCR, trombomodulin a endotelové mikropartikule s prokoagulační aktivitou). Cílem je nalezení takových markerů, k jejichž expresi dochází již před nástupem klinicky zjevných příznaků preeklampsie a HELLP syndromu a kterých by bylo možné použít k predikci onemocnění.

5.3. Očekávané výsledky a přínos pro lékařskou praxi

Při zjištění statisticky významné korelace předpokládáme možnou predikci rozvoje preeklampsie a HELLP syndromu u ohrožených těhotných. Tato riziková skupina by pak mohla výrazně profitovat z přísnější dispenzarizace a eventuální preventivní terapie profylaktickými dávkami LMWH se snížením mateřské a perinatální morbidity a mortality.

5.4. Charakteristika souborů

Studie probíhala ve dvou částech.

V první části studie bylo do souboru zařazeno 403 žen. Tento soubor tvořily ženy zdravé, prospektivně sledované těhotné, které byly vedeny v poradně pro fyziologická těhotenství ve FN Olomouc a ÚPMD Praha. Pacientky, které byly poučeny a podepsaly informovaný souhlas, byly následně zařazeny do studie. Tyto pacientky byly v době prvního odběru bez interních, neurologických či jiných závažných onemocnění. Byla jim odebrána venózní krev standardním způsobem v období těhotenských odběrů na začátku gravidity (do konce I. trimestru). Druhý odběr byl proveden v období 24.- 28. týdne a třetí odběr byl proveden v období 34. až 37. týdne gravidity. Na konci studie byl rovněž vyplněn dotazník, jehož znění je přiloženo. Při průměrném 6-9% výskytu preeklampsie v české populaci jsme předpokládali výskyt cca 20-30 preeklamsií v kontrolním souboru.

Tato část výzkumné práce probíhala v rámci grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky, registračního čísla NR 9282-3 (2007-2009) s názvem projektu „Význam markerů aktivace endotelu v predikci rozvoje preeklampsie“ řešitele Doc. MUDr. Martina Procházky, PhD.

Z tohoto celkového počtu žen předčasně před ukončeným 37. týdnem gravidity porodilo 28 rodiček (7%). Pět těhotenství (1,2%) bylo ukončeno z genetické indikace pro vrozenou vadu plodu a 12 žen nedokončilo studii z jiných důvodů (odstěhovaly se, nedostavily se k dalšímu vyšetření).

Kompletní protokol studie (odběry ve všech třech trimestrech) absolvovalo tedy 358 těhotných. Z celkového počtu 358 žen se u 38 (10,7%) vyvinul lehký až středně těžký stupeň preeklampsie, u 8 rodiček (2,2%) byl diagnostikován HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. Ženy z první části studie byly rozděleny do 3 souborů: 1. fyziologické gravidity, 2. preeklampsie, 3. HELLP syndromy (N1=312, N2=38, N3=8).

Druhá část studie probíhala na Porodnicko-gynekologické klinice FN Ostrava. Do tohoto souboru studie byly zařazeny pacientky, u kterých byl v průběhu gravidity diagnostikován syndrom HELLP. Tyto ženy byly po souhlasu zařazeny do studie a

byla jim odebrána venózní krev ke stanovení markerů aktivace endotelu. Jednalo se o ženy, u kterých byla stanovena diagnóza HELLP syndromu prepartálně a krevní odběr byl proveden ještě před začátkem děložní činnosti nebo před ukončením gravidity císařským řezem. Vzorky pacientek byly odeslány k vyšetření do Koagulační laboratoře ve FN Olomouc a vyšetřeny stejnou metodikou jako vzorky z první části studie. Tento soubor zahrnoval 28 těhotných žen s rozvinutým syndromem HELLP. Při zařazení do studie byl rovněž vyplněn dotazník.

Všechny výše uvedené ženy, z 1. i 2. části studie, byly rozděleny do 4 souborů:

Soubor 1: soubor fyziologických gravidit, N = 312

Soubor 2: soubor žen s preeklampií, N = 38

Soubor 3: soubor žen s HELLP syndromem – jedná se o ženy zařazené do studie od prvního trimestru, N = 8

Soubor 4: soubor žen s HELLP syndromem – odběr proveden pouze ve 3. trimestru u žen s již potvrzeným HELLP syndromem, N = 28.

U všech pacientek zařazených do studie byl vyplněn dotazník zjišťující sociodemografické parametry, anamnestické údaje, antropometrické a behaviorální faktory a výsledky gravidity

5.4.1. Dotazník

Sociodemografické parametry :

1. Věk
2. Vzdělání
3. Rodinný stav

Gynekologická anamnéza:

1. Porody rok: váha: gestační týden: komplikace:
2. Potraty rok: gestační týden: komplikace:
3. Menstruační cyklus : délka cyklu: délka krvácení:

Antropometrické parametry:

1. Váha před těhotenstvím
2. Váhový přírůstek v těhotenství
3. BMI

Behaviorální faktory:

1. Kouření (počet cigaret/ den)
2. Alkohol
3. Abusus drog

Osobní anamnéza:

1. Hypertenze před těhotenstvím
2. Anamnéza tromboembolické nemoci
3. Diabetes mellitus
4. Onemocnění štítné žlázy
5. Jiná onemocnění:
6. Medikace :

Fetální parametry:

1. Jedno či vícečetné těhotenství
2. Vývojová vada
3. Růstová retardace

5.5. Limitující faktory vlastní výzkumné práce

Základním limitujícím faktorem studie je nízká incidence syndromu HELLP v populaci těhotných. V kontrolní skupině, která čítala 403 žen s fyziologickým těhotenstvím došlo k rozvoji pouze 38 případů preeklampsie (9,4%) a jen 8 případů HELLP syndromu (1,9%). Vzájemné statistické srovnání vzorků zdravých žen, žen s preeklampií a žen s HELLP syndromem ve všech třech trimestrech je tak ovlivněno těmito nízkými počty vyšetřených žen.

Vyšší počet vzorků od žen s HELLP syndromem byl získán ve druhé části studie. Limitujícím faktorem této části studie je nicméně fakt, že krevní vzorky byly získány od žen s již potvrzeným a probíhajícím HELLP syndromem a s ohledem na nutnost ukončení gravidity byl odběr proveden v mnoha případech mimo standardní dobu odběru III. trimestru stanovenou protokolem (34.-37. týdnů gravidity). Zároveň se jednalo o pacientky s klinicky či subklinicky probíhající DIC. U těchto pacientek nebyly tedy odebrány vzorky za I. a II. trimestr.

5.6. Statistické metody

Všechny kalkulace výzkumné práce byly provedeny pomocí SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA). Pro analýzy byly použity Kruskal – Wallisův test, studentův test, chi-squared test a Fisherův exaktní test. Za statisticky významné hodnoty jsme považovali hodnoty s $p < 0,05$.

5.7. Laboratorní vyšetření

Všechny získané krevní vzorky byly následně zpracovány v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc. V této laboratoři byly uvedené parametry vyšetřovány následujícími metodikami: t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, vWf Ag – EIA (imunologické stanovení využívající imunoturbidimetrie), ePCR – ELISA, MMP-2,9 – ELISA s fluorogenní detekcí, TIMP-2 – ELISA, endoteliální mikropartikule – průtoková cytometrie. Vzhledem k náročnosti odběru a

preanalytické fáze byly mikropartikule vyšetřeny pouze u pacientek sledovaných ve FN Olomouc. Pro vyšetření bylo použito vzorků venózní krve odebrané do 0,129 M citrátu sodného (Vacuette, Greiner). Pro samotné vyšetření pak byla použita bezdestičková plasma (PPP), která byla získána centrifugací při 3000 g po dobu 10 minut a uchována do doby vyšetření při -80 °C. Pro stanovení EMP bylo použito vzorku venózní krve odebraného do K3EDTA.

5.7.1. Metodika laboratorních vyšetření

Tkáňový plasminogen aktivátor

Hladiny t-PA byly stanoveny ELISA metodou. Stanovení je založeno na vazbě t-PA na specifickou polyklonální protilátku navázanou na pevné fázi. Vlastní stanovení – vzorek 100 µl 5x naředěné PPP byl inkubován 1 hodinu s polyklonální protilátkou za fyziologické teploty. Následně po vazbě t-PA přítomného ve vzorku byla funkční aktivita t-PA stanovena specifickým štěpením plasminogenu v přítomnosti substrátu plazminu. Množství antigenu bylo stanoveno po promytí použitím peroxidázově značené monoklonální protilátky.

Inhibitor plasminogen aktivátoru 1

Hladiny PAI-1 byly stanoveny ELISA metodou. Stanovení je založeno na vazbě na specifickou polyklonální protilátku navázanou na pevné fázi. Vlastní stanovení – vzorek 100 µl 5x naředěné PPP byl inkubován 1 hodinu s polyklonální protilátkou za fyziologické teploty. Následně po vazbě PAI-1 vázaného do komplexu s t-PA přítomným ve vzorku byla funkční aktivita PAI-1 stanovena pomocí peroxidázově značené monoklonální protilátky. Stanovení je specifické pro PAI-1 bez interference s PAI-2 (5 U/mL) a PAI-3 (5.5 µg/mL).

Von Willebrandův faktor

Hladina vWf antigenu byla stanovena enzymovou imunoanalýzou. 20 µl bezdestičkové plasmy bylo inkubováno s polyklonální protilátkou po dobu 5 minut za fyziologické teploty a v průběhu inkubace byla kontinuálně měřena absorbance při 620 nm. Naměřené hodnoty byly přepočteny pomocí kalibrační křivky získané stanovením různých koncentrací purifikovaného lidského vWf přidaného k vzorku

plasmy získaného od pacientů s těžkou formou vW choroby typu I, kde jsou hladiny vWf pod 10%.

Trombomodulin

Stanovení trombomodulinu jsme prováděli technikou mikro ELISA, kdy jsme na jamky potažené monoklonální protilátkou proti trombomodulinu napipetovali vzorek obsahující trombomodulin. Dojde k navázání molekul trombomodulinu na zakotvenou protilátku. Následně se přidá protilátka proti jinému vazebnému místu trombomodulinu značená peroxidázou. V konečné fázi se množství navázaného trombomodulinu stanovuje přidáním o-fenylendiaminu, který je v přítomnosti peroxidu rozkládán peroxidázou za vzniku žlutého zbarvení.

Endotheliální receptor proteinu C

Stanovení EPCR jsme prováděli technikou mikro ELISA, kdy jsme na jamky potažené monoklonální protilátkou proti ePCR napipetovali vzorek obsahující EPCR. Dojde k navázání molekul EPCR na zakotvenou protilátku. Následně se přidá protilátka proti jinému vazebnému místu EPCR značená peroxidázou. V konečné fázi se množství navázaného EPCR stanovuje přidáním o-fenylendiaminu, který je v přítomnosti peroxidu rozkládán peroxidázou za vzniku žlutého zbarvení.

Endotelové mikropartikule

EMP byly kvantifikovány ve vzorcích dle práce Combese. Vzorky 40 µl plné krve byly inkubovány po dobu 30 min za laboratorní teploty s 10 µl PE-conjugované CD144. Vzorky byly následně ředěny s 1,0 ml PBS pufru a známým množstvím fluorescenčních latexových kuliček (Flowcount, Beckman Coulter Immunotech), které sloužily jako standard pro počet mikropartikulí při analýze průtokovou cytometrií. EMP byly měřeny na průtokovém cytometru Coulter Epics XL (BeckmanCoulter, Switzerland, Nyon)*. Použití 0,8 µm latexových kuliček nám umožnilo MP definovat jako částice do 1 µm pozitivně značené PE-konjugovanou protilátkou CD144. Výsledky byly vyjádřeny jako počet MP v ml plné krve.

Metaloproteináza 2 a 9

Aktivita MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích plasmy byla stanovena ELISA metodikou s použitím EDANS/DABCYL FRET peptidu (AnaSpec, USA, CA). Na základě

štěpení FRET peptidu pomocí MMP na separátní fragmenty vznikly samostatné molekuly EDANS, které jsou fluorescenčně aktivní. Jejich aktivita byla stanovena excitací/emisí = 340 nm/490 nm na fluorimetru TECAN Genios.

Tkáňový inhibitor metaloproteinázy 2

Aktivita TIMP-2 ve vzorcích plasmy byla stanovena ELISA metodou (R&D Systems, USA). Metoda využívá protilátku proti rekombinantnímu lidskému TIMP-2 proteinu. Samotné stanovení využívá vazby TIMP-2 na monoklonální protilátku imobilizovanou na mikrotitrační destičce. Dojde k navázání molekul TIMP-2 na zakotvenou protilátku. Následně se přidá protilátka proti jinému vazebnému místu TIMP-2 značená peroxidázou. V konečné fázi se množství navázaného TIMP-2 stanovuje přidáním o-fenylendiaminu, který je v přítomnosti peroxidu rozkládán peroxidázou za vzniku žlutého zbarvení.

5.8. Výsledky

5.8.1. Charakteristika souboru

Soubor 1: N1=312

Soubor 1 tvoří ženy s fyziologickým těhotenstvím, jejich celkový počet byl 312. Rodičky zařazené do této skupiny měly negativní osobní a bezvýznamnou rodinnou anamnézu, 231 žen, tj. 74% byly primipary, 56 žen, tj. 18% byly sekundipary, 25 žen, tj. 8,1 procent byly terciary. Průměrný věk těhotných žen byl 27,6 let ($\pm 4,5$ let). Průměrná hmotnost rodiček na začátku gravidity byla 62,6 kg ($\pm 8,8$ kg). Průměrný váhový přírůstek činil 10,03 kg ($\pm 4,4$ kg), průměrná výška rodiček byla 167 cm ($\pm 5,6$ cm).

Soubor 2 : N2=38

Soubor 2 tvoří 38 žen, u kterých se v průběhu těhotenství rozvinula preeklampsie různého stupně. V souboru nebyla ani jedna pacientka s eklampií. Diagnóza byla stanovena na základě přítomností klasických kritérií (hypertenze, proteinurie, elevace k. močové). Ve sledovaných charakteristikách (věk, váha a ostatní sociodemografické faktory) se tato skupina nelišila významně od kontrolního souboru.

Soubor 3: N3=8

Soubor 3 tvoří 8 žen, které byly sledovány od začátku těhotenství a u kterých se v průběhu gravidity rozvinul HELLP syndrom, který byl diagnostikován na základě klasických kritérií. Ve sledovaných charakteristikách (věk, váha a ostatní sociodemografické faktory) se tato skupina nelišila významně od kontrolního souboru.

Soubor 4: N4=28

Ve druhé části studie byl v letech 2007-2009 proveden odběr krevních vzorků u 28 žen s potvrzeným HELLP syndromem. Z tohoto souboru bylo 18 žen prvorodiček (64,3%) a 10 žen druho- a vícero-diček (35,7%). Jejich průměrný věk 29,7 let a průměrná hmotnost 61,7 kg se statisticky významně nelišily od hodnot u žen s fyziologickou graviditou. Průměrný váhový přírůstek v době porodu byl 12,7 kg.

5.8.2. Laboratorní výsledky:

Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5 - 14 a grafech 1- 20.

5.8.2.1. Laboratorní výsledky souboru žen s fyziologickou graviditou (N=312)

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5 a grafech 1-10.

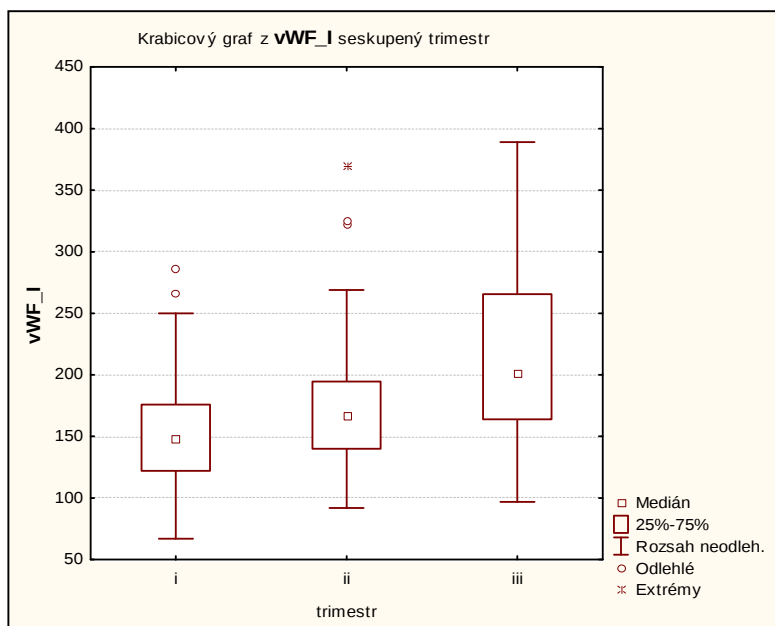
Hladina antigenu vWf stoupala během celého těhotenství, v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi II. a III. trimestrem, rozdíl mezi I. a II. trimestrem byl na hranici statistické významnosti. Současně stoupala aktivita vWf, prokázali jsme statisticky významný rozdíl hladin mezi II. a III. trimestrem, rozdíl mezi I. a II. trimestrem nebyl statisticky významný. Hladina trombomodulinu významně stoupala během gravidity, prokázali jsme statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem. Hladina solubilní formy EPCR stoupala během gravidity, v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. trimestrem, rozdíl mezi II. a III. trimestrem nebyl statisticky významný. Hladina PAI – 1 stoupala během celého těhotenství, v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem. Hladina t- PA se během gravidity významněji neměnila. Neprokázali

jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladinách MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ani endotelových mikropartikulí v jednotlivých trimestrech.

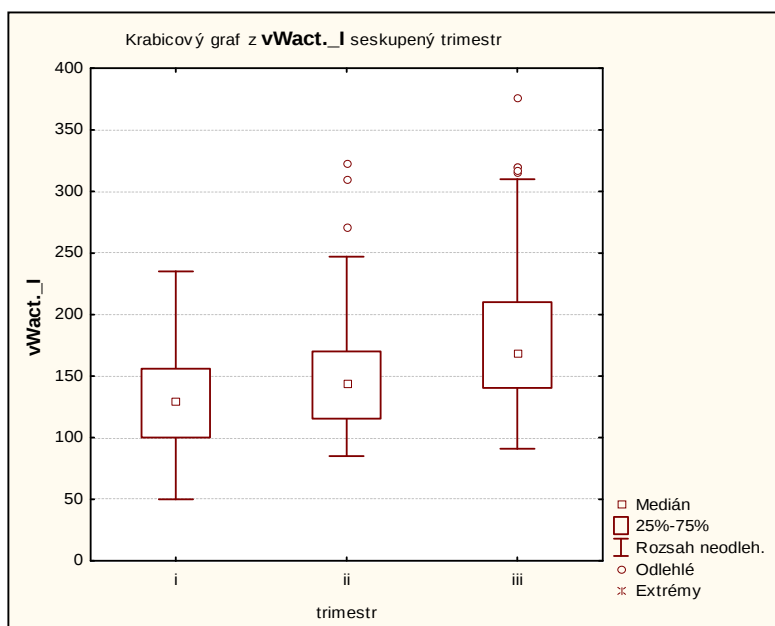
Tabulka č.5 Porovnání hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech u fyziologických gravidit (statisticky významné hodnoty jsou vyznačeny tučně a barevně)

Marker aktivace endotelu	I.trimestr průměrná hladina	II. trimestr průměrná hladina	III. trimestr průměrná hladina	Srovnání I. vs II. trimestr	Srovnání II. vs III. trimestr
vWf antigen	152,32	173,34	216,20	0,048	0,000
vWf aktivita	130,20	150,09	181,91	0,074	0,001
Trombomodulin	19,05	28,47	39,86	0,000	0,000
EPCR	201,76	274,68	324,07	0,017	0,660
PAI – 1	36,14	50,07	60,12	0,000	0,012
EMP	3838,38	3836,59	3630,59	0,412	1,000
MMP – 2	9043,76	9315,38	8800,27	1,000	0,972
MMP – 9	8371,90	8290,81	7470,50	1,000	0,084
TIMP – 2	1,85	1,97	1,93	0,506	1,000
t-PA	2,48	2,97	3,34	0,85	0,96

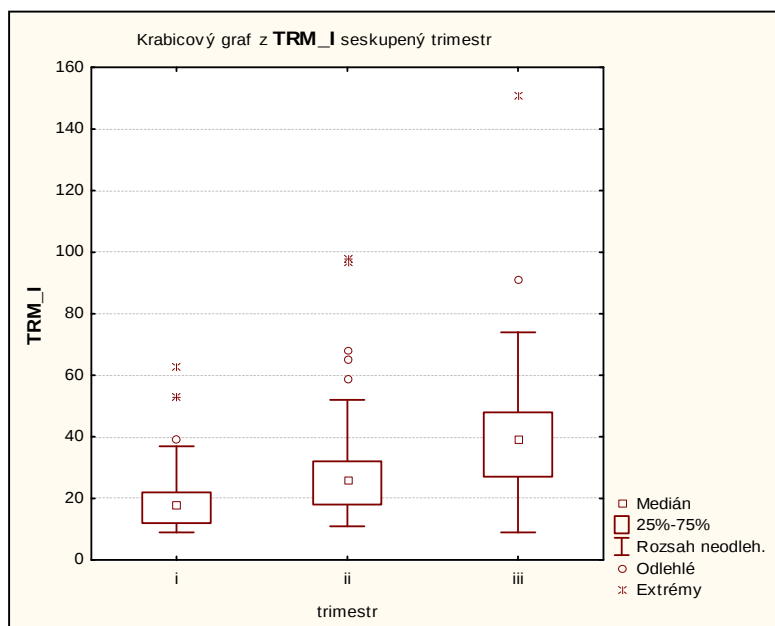
Graf č.1 Antigen von Willebrandova faktoru



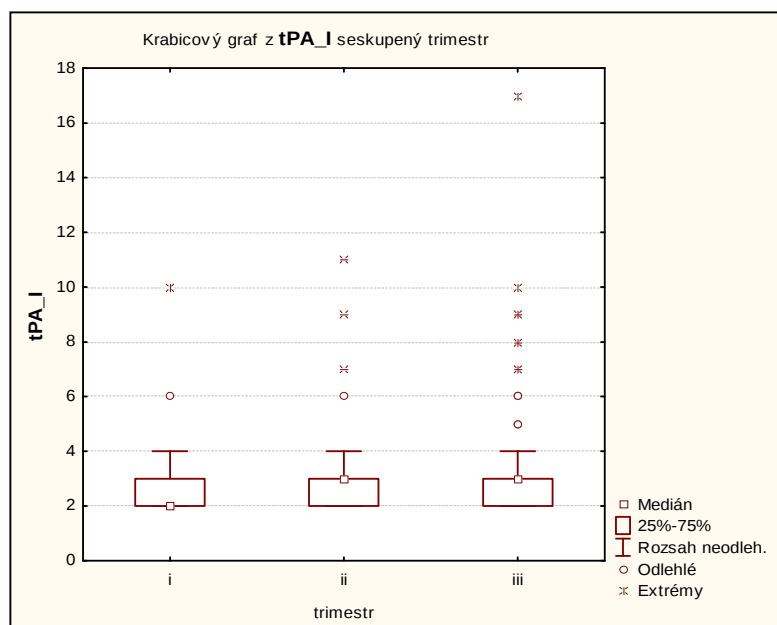
Graf č. 2 Aktivita von Willebrandova faktoru



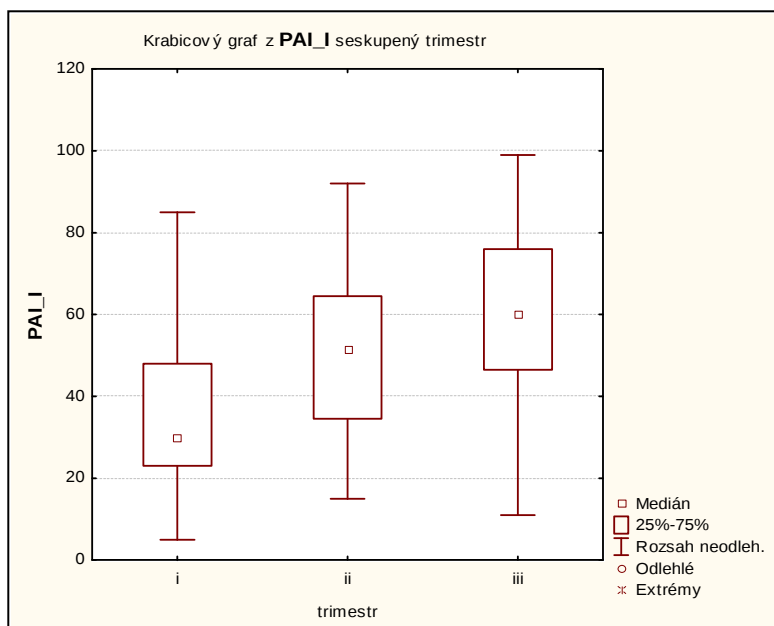
Graf č. 3 Trombomodulin



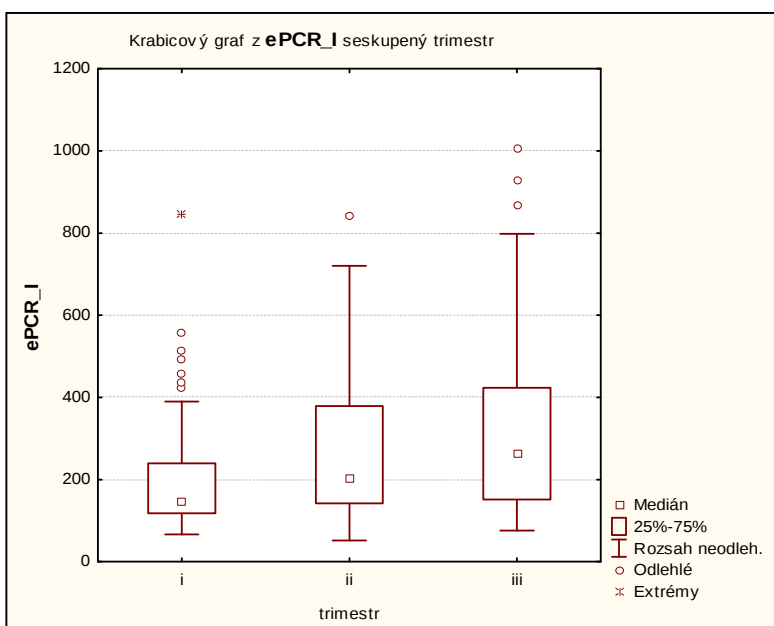
Graf č. 4 Tkáňový aktivátor plazminogenu

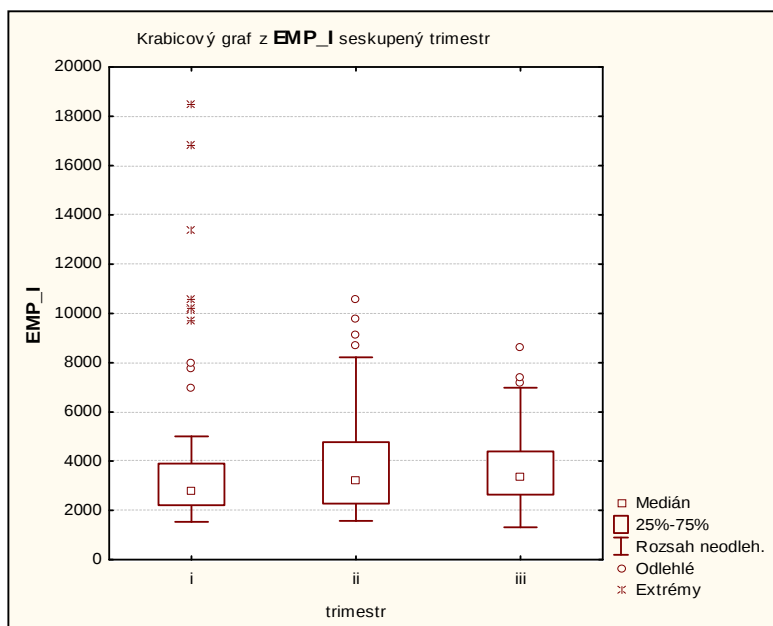


Graf č. 5 Inhibitor aktivátoru plazminogenu

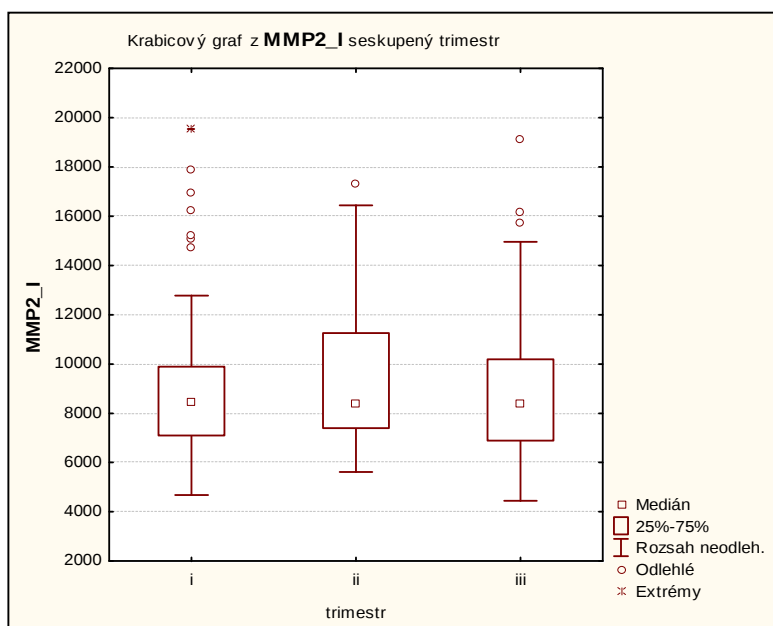


Graf č. 6 Endoteliální receptor proteinu C

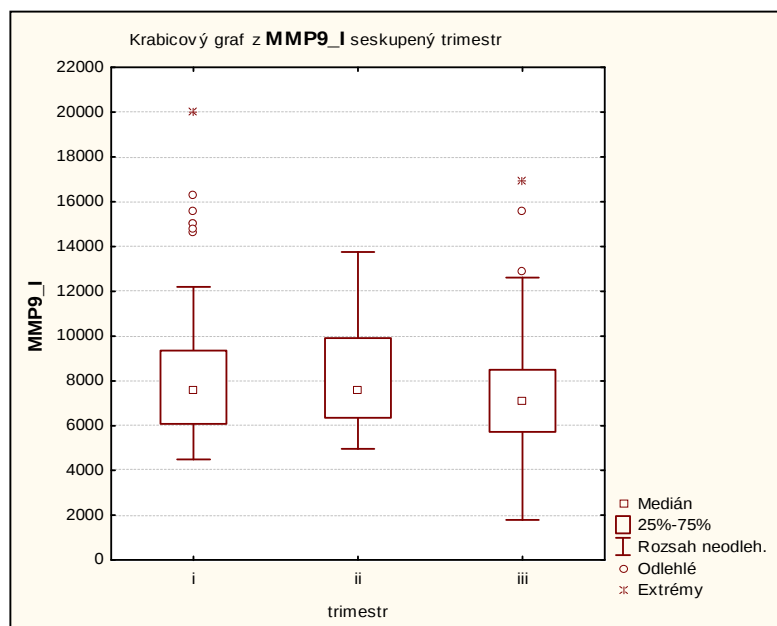




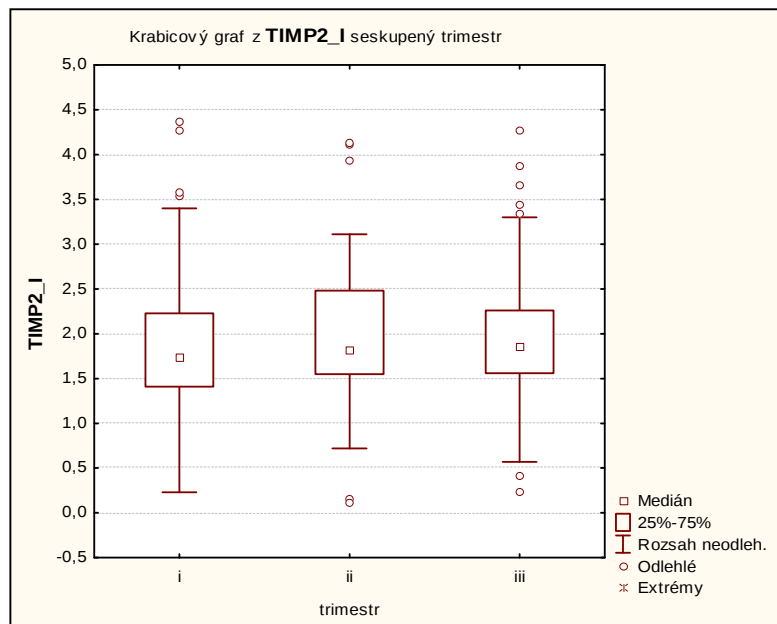
Graf č. 8 Metaloproteináza 2



Graf č. 9 Metaloproteináza 9



Graf. č. 10 Tkáňový inhibitor metaloproteináz 2



5.8.2.2. Laboratorní výsledky souboru žen s preeklampií (N=38)

Výsledky souboru žen s preeklampií (souboru 2) jsou uvedeny v tabulce 6 a 7.

5.8.2.2.1. Srovnání výsledků preeklampsie a kontrolní skupiny

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8 a 9.

Statisticky významné výsledky:

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve všech trimestrech oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve II. a III. trimestru, v I. trimestru jsme rozdíl hladin nepozorovali oproti hladinám inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 ve skupině zdravých těhotných.

Statisticky nevýznamné výsledky:

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl hodnot vWf (antigenu i aktivity), tkáňového aktivátoru plazminogenu, endoteliálního receptoru proteinu C, endotelových mikropartikulí, metaloproteináz 2, 9 ani tkáňového inhibitoru metaloproteináz 2 při porovnání jejich hladin v jednotlivých trimestrech u skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie a skupiny žen s fyziologicky probíhající graviditou.

Tabulka č. 6 - Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s preeklampií v jednotlivých trimestrech.

	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm.odch.	Koef.prom.
vWf_I	159,282	141	102	278	48,274	30,308
vWf_II	181,385	177	110	334	50,585	27,888
vWf_III	219,026	202	92	378	70,756	32,305
vWact_I	117,077	114	54	187	29,591	25,275
vWact_II	142,051	150	80	230	33,517	23,595
vWact_III	213	190	99	376	65,401	30,705
TRM_I	23,41	22	4	49	11,521	49,211
TRM_II	34,333	32	9	75	15,184	44,224
TRM_III	53,564	48	16	151	28,622	53,434
tPA_I	2,59	2	2	5	0,88	33,985
tPA_II	3,333	3	2	17	2,698	80,948
tPA_III	2,923	3	2	7	1,061	36,294
PAI_I	36,872	33	12	76	16,497	44,743
PAI_II	59,538	60	25	90	18,329	30,785
PAI_III	77,026	85	8	99	19,838	25,755
ePCR_I	151,256	118	25	373	90,72	59,978
ePCR_II	233,744	183	52	840	170,475	72,932
ePCR_III	398,692	371	104	992	235,449	59,055
EMP_I	4161,205	3521	1583	16870	2781,549	66,845
EMP_II	3082,41	2822	1573	7716	1374,054	44,577
EMP_III	4238	3505	1537	13370	2559,077	60,384
MMP2_I	9038,385	8441	4803	15096	2530,725	28,000
MMP2_II	7419,769	6964	4683	11255	1672,04	22,535
MMP2_III	8403,282	8192	5683	12416	1470,544	17,500
MMP9_I	8278,923	8070	4446	17113	2526,465	30,517
MMP9_II	6408,436	6189	1785	10459	1779,779	27,772
MMP9_III	7100,077	7036	5157	9224	1135,127	15,988
TIMP2_I	1,678	1,73	0,15	3,66	0,805	47,951
TIMP2_II	1,834	1,69	0,82	4,27	0,706	38,463
TIMP2_III	2,057	1,88	0,11	4,37	0,715	34,770

Tabulka č. 7 - Porovnání výsledků jednotlivých trimestrů u skupiny s preeklampií

párově po dvojicích:			navzájem (kontextově) - vícenásobné porovnání:				
Test Statistics(d)							
	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)					
vwf_ii - vwf_i	-2,247(a)	0,025	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 38,76923 p = ,00000				
vwf_iii - vwf_ii	-4,320(a)	0,000					
vwf_iii - vwf_i	-4,068(a)	0,000					
vwact._0 - vwact._i	-4,627(a)	0,000	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 68,66667 p = ,00000				
vwact._1 - vwact._0	-5,443(a)	0,000					
vwact._1 - vwact._i	-5,373(a)	0,000					
trm_ii - trm_i	-3,888(a)	0,000	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 39,75484 p = ,00000				
trm_iii - trm_ii	-4,599(a)	0,000					
trm_iii - trm_i	-4,872(a)	0,000					
tpa_ii - tpa_i	-1,165(a)	0,244	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 3,698113 p = ,15739				
tpa_iii - tpa_ii	-,398(b)	0,691					
tpa_iii - tpa_i	-1,660(a)	0,097					
pai_ii - pai_i	-5,332(a)	0,000	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 61,07692 p = ,00000				
pai_iii - pai_ii	-4,551(a)	0,000					
pai_iii - pai_i	-5,276(a)	0,000					
epcr_ii - epcr_i	-3,007(a)	0,003	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 42,00000 p = ,00000				
epcr_iii - epcr_ii	-4,933(a)	0,000					
epcr_iii - epcr_i	-4,633(a)	0,000					
emp_ii - emp_i	-1,786(b)	0,074	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 5,589744 p = ,06112				
emp_iii - emp_ii	-2,065(a)	0,039					
emp_iii - emp_i	,000(c)	1,000					
mmp2_ii - mmp2_i	-2,596(b)	0,009	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 5,743590 p = ,05660				
mmp2_iii - mmp2_ii	-2,275(a)	0,023					
mmp2_iii - mmp2_i	-1,005(b)	0,315					
mmp9_ii - mmp9_i	-3,265(b)	0,001	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 6,205128 p = ,04494				
mmp9_ii - mmp9_ii	-2,023(a)	0,043					
mmp9_iii - mmp9_i	-2,093(b)	0,036					
timp2_ii - timp2_i	-,493(a)	0,622	ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 8,220779 p = ,01640				
timp2_i0 - timp2_ii	-1,751(a)	0,080					
timp2_i0 - timp2_i	-1,951(a)	0,051					

a- based on negative ranks, b- based on positive ranks, c-The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks, d - Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabulka č. 8 - Porovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u skupiny s preeklampií oproti kontrolní skupině (1.část)

Promenná	Mann-Whitneyuv U test (koag_data) Dle proměn. soubor Oznacené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$									
	Sct por. kontr09	Sct por. preeklam	U	Z	Úroveň p	Z upravené	Úroveň p	N platn. kontr09	N platn. preeklam	2*1str. presné p
vWF_I	4842,0	2418,0	1521,0	-0,328	0,7431	-0,328	0,7430	81	39	0,7463
vWF_II	4653,5	2486,5	1413,5	-0,829	0,4069	-0,830	0,4068	80	39	0,4085
vWF_III	6022,5	2623,5	1744,5	-0,249	0,8032	-0,249	0,8032	92	39	0,8041
vWact_I	5234,5	2025,5	1245,5	1,871	0,0613	1,872	0,0613	81	39	0,0611
vWact_II	4821,5	2318,5	1538,5	0,122	0,9031	0,122	0,9031	80	39	0,9036
vWact_III	5492,0	3154,0	1214,0	-2,919	0,0035	-2,920	0,0035	92	39	0,0033
TRM_I	3979,5	2575,5	1129,5	-1,989	0,0467	-1,993	0,0463	75	39	0,0464
TRM_II	3451,0	2544,0	966,0	-2,522	0,0117	-2,523	0,0116	70	39	0,0113
TRM_III	4614,5	2888,5	1128,5	-2,690	0,0071	-2,691	0,0071	83	39	0,0068
tPA_I	4778,0	2482,0	1457,0	-0,686	0,4925	-0,825	0,4092	81	39	0,4959
tPA_II	4425,5	2244,5	1464,5	0,103	0,9177	0,113	0,9104	76	39	0,9180
tPA_III	5752,0	2376,0	1596,0	0,627	0,5305	0,674	0,5006	88	39	0,5338
PAI_I	4810,5	2449,5	1489,5	-0,504	0,6141	-0,504	0,6139	81	39	0,6155
PAI_II	4004,0	2666,0	1078,0	-2,387	0,0170	-2,387	0,0170	76	39	0,0167
PAI_III	4764,5	3363,5	848,5	-4,534	0,0000	-4,535	0,0000	88	39	0,0000
ePCR_I	4434,0	1782,0	1002,0	2,483	0,0130	2,483	0,0130	72	39	0,0127
ePCR_II	3435,0	1818,0	1038,0	1,312	0,1896	1,312	0,1896	63	39	0,1917
ePCR_III	4680,5	2700,5	1277,5	-1,783	0,0746	-1,783	0,0746	82	39	0,0745

Tabulka č. 9 - Porovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u skupiny s preeklampií oproti kontrolní skupině (2.část)

Promenná	Mann-Whitneyuv U test (koag_data) Dle proměn. soubor Oznacené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$									
	Sct por. kontr09	Sct por. preeklam	U	Z	Úroveň p	Z upravené	Úroveň p	N platn. kontr09	N platn. preeklam	2*1str. přesné p
EMP_I	4582,5	2677,5	1261,5	-1,782	0,0748	-1,782	0,0748	81	39	0,0747
EMP_II	5026,5	1994,5	1214,5	1,865	0,0622	1,865	0,0622	79	39	0,0620
EMP_III	5928,5	2717,5	1650,5	-0,722	0,4701	-0,722	0,4701	92	39	0,4717
MMP2_I	3871,5	2233,5	1315,5	-0,431	0,6664	-0,431	0,6664	71	39	0,6677
MMP2_II	3796,5	1456,5	676,5	3,801	0,0001	3,801	0,0001	63	39	0,0001
MMP2_III	5070,5	2310,5	1530,5	0,380	0,7040	0,380	0,7040	82	39	0,7052
MMP9_I	3869,5	2235,5	1313,5	-0,444	0,6573	-0,444	0,6573	71	39	0,6587
MMP9_II	3837,5	1415,5	635,5	4,083	0,0000	4,084	0,0000	63	39	0,0000
MMP9_III	4984,5	2396,5	1581,5	-0,097	0,9227	-0,097	0,9227	82	39	0,9230
TIMP2_I	4063,0	2042,0	1262,0	0,765	0,4440	0,765	0,4440	71	39	0,4476
TIMP2_II	3458,0	1795,0	1015,0	1,470	0,1415	1,470	0,1415	63	39	0,1430
TIMP2_III	4810,5	2570,5	1407,5	-1,062	0,2882	-1,062	0,2882	82	39	0,2896

5.8.2.3. Laboratorní výsledky souboru žen s HELLP syndromem

5.8.2.3.1. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině žen s fyziologickou graviditou v I. a II. trimestru

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Statisticky významné výsledky:

Při srovnání hladin markerů aktivace endotelu v I. a II. trimestru mezi pacientkami s fyziologickou graviditou a pacientkami s HELLP syndromem jsme prokázali statisticky významný vzestup v hladinách vWf a aktivity vWf v I. trimestru u pacientek s HELLP syndromem a statisticky významný vzestup v hladině EPCR a MMP9 v II. trimestru u pacientek, u kterých později došlo k rozvoji HELLP syndromu.

Statisticky nevýznamné výsledky:

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu, a to ani v jednom trimestru, rovněž jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách tkáňového aktivátoru plazminogenu, endotelových mikropartikulí, metaloproteináz 2 ani tkáňového inhibitoru metaloproteináz 2.

5.8.2.3.2. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině zdravých těhotných ve III. trimestru

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 11

Statisticky významné výsledky:

V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Současně byly statisticky významně zvýšené hladiny aktivity vWf ve skupině žen s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Rovněž jsme v našem souboru prokázali statisticky významné zvýšení hladin EPCR ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl jak v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem ve srovnání s kontrolním souborem zdravých těhotných žen ve III. trimestru, tak v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti souboru zdravých těhotných žen ve III. trimestru .

Statisticky nevýznamné výsledky:

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami trombomodulinu, hladinami t-PA a PAI-1 ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině zdravých těhotných. Rovněž rozdíly v hladinách TIMP-2 nebyly statisticky významné.

5.8.2.3.3. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině preeklampsie v I. a II. trimestru

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.14.

Statisticky významné výsledky:

Při srovnání hladin markerů aktivace endotelu v I. a II. trimestru mezi pacientkami, u nichž se později vyvinul HELLP syndrom a pacientkami, u nichž se později vyvinula preeklampsie jsme prokázali statisticky významný rozdíl v aktivitě vWf v I. trimestru (vzestup aktivity u pacientek s HELLP syndromem), v hladinách EPCR

v I. i II. trimestru (vyšší u HELLP syndromu) a statisticky významný rozdíl v hladinách EMP v II. trimestru a MMP-2 a MMP-9 v II. trimestru.

Statisticky nevýznamné výsledky:

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu, a to ani v jednom trimestru, rovněž jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách tkáňového aktivátoru plazminogenu, vWf ani tkáňového inhibitoru metaloproteináz 2.

5.8.2.3.4. Srovnání výsledků ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině preeklampsie ve III. trimestru

Statisticky významné výsledky:

V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu vWf i aktivity vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti pacientkám s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl jak v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem ve srovnání se skupinou pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity, tak v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti souboru pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity. Při srovnání hladin trombomodulinu, resp. PAI-1 v obou skupinách pacientek jsme prokázali rovněž statisticky významný rozdíl hodnot, ovšem hladiny trombomodulinu i PAI-1 byly zvýšené ve skupině pacientek s preeklampií ve srovnání se skupinou žen s HELLP syndromem, obojí ve III. trimestru gravidity.

Statisticky nevýznamné výsledky:

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami EPCR, hladinami t-PA, a TIMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity.

Tabulka č. 10 Soubor 4: Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek se syndromem HELLP ve III. trimestru (N=28)

	<i>Prumer</i>	<i>Medián</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Sm.odch.</i>	<i>Koef.prom.</i>
vWF_III	369,78	361	227	499	60,289	16,304
VWact._III	301,7	304	198	393	45,903	15,215
TRM_III	36,41	29	12	111	24,761	68,010
tPA_III	3,89	3	2	13	2,391	61,489
PAI_III	67,19	68	41	94	12,023	17,895
EPCR_III	463,07	415	194	854	201,525	43,519
EMP_III						
MMP2_III	12776,22	12305	5997	23285	3795,039	29,704
MMP9_III	12939,85	12237	8970	23394	3540,125	27,358
TIMP2_III	2,21	1,76	0,42	6,95	1,282	58,044

Tabulka č. 11 - Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem, skupině žen s preeklampií a skupině zdravých těhotných ve III. trimestru

Marker aktivace Endotelu	Kontrolní skupina III. trimestr	Preeklampsie III. trimestr	HELLP syndrom III. trimestr	Srovnání kontroly/HELLP	Srovnání preeklampsie / HELLP
vWf antigen	216,2	219,03	369,78	0,0000	0,0000
vWf aktivita	181,91	213	301,7	0,0000	0,0001
TRM	39,86	53,56	36,41	0,3023	0,0018
t-PA	3,34	2,92	3,89	0,1565	0,0804
PAI-1	60,13	77,03	67,19	0,5638	0,0387
EPCR	324,07	398,69	463,07	0,0028	0,3834
MMP-2	8800,27	8403,28	12776,22	0,0000	0,0000
MMP-9	7470,5	7100,08	12939,85	0,0000	0,0000
TIMP-2	96,5	103	110,5	1,0000	1,0000

Vysvětlivky: vWf – von Willebrandův faktor (%), TRM – trombomodulin (ng/ml), t-PA – tkáňový aktivátor plazminogenu (ng/ml), PAI-1 – inhibitor aktivátoru plazminogenu (ng/ml), EPCR – endoteliální receptor proteinu C (ng/ml), MMP 2,9 – metaloproteináza 2,9 (RFU (fluorescenční jednotky)), TIMP-2 – tkáňový inhibitor metaloproteinázy 2 (ng/ml)

Tabulka č.12 Hodnoty jednotlivých parametrů souboru 3: pacientky s HELLP syndromem ve I., II. a III. trimestru

	N platných	Prumer	Medián	Minimum	Maximum	Sm.odch.	Koef.prom.
vWF_I	8	188,63	170	125	286	56,28	29,83
vWF_II	8	204,75	190,5	167	269	36,44	17,80
vWF_III	8	289,38	303	211	339	50,11	17,32
vWact_I	8	158,25	157,5	113	214	35,68	22,55
vWact_II	8	164	168,5	122	220	33,27	20,29
vWact_III	8	239,63	248,5	156	299	47,36	19,76
TRM_I	8	24	19	11	58	16,18	67,41
TRM_II	8	31,25	24,5	17	68	16,94	54,19
TRM_III	8	50,5	48,5	24	81	20,70	40,99
tPA_I	8	2,63	2	2	6	1,41	53,63
tPA_II	8	3,13	3	2	6	1,25	39,89
tPA_III	8	3,75	3	3	7	1,39	37,03
PAI_I	8	30,63	27,5	13	65	16,01	52,27
PAI_II	8	45,38	42,5	16	75	21,65	47,72
PAI_III	8	59,13	61	29	86	23,65	40,00
ePCR_I	8	302,13	331	86	519	166,42	55,08
ePCR_II	8	505,62	537	139	878	248,50	49,15
ePCR_III	8	704,13	771,5	354	921	201,44	28,61
EMP_I	8	3043,88	2665,5	1702	4783	1079,04	35,45
EMP_II	8	4381,63	3290	1988	8222	2358,13	53,82
EMP_III	8	3102,13	2715,5	1583	7403	1792,23	57,77
MMP2_I	8	7937,5	8058,5	5449	10853	1762,73	22,21
MMP2_II	8	9242,25	8631	6830	14819	2632,90	28,49
MMP2_III	8	9744	9399	6222	16199	3146,14	32,29
MMP9_I	8	8841,63	9512,5	4494	11647	2573,86	29,11
MMP9_II	8	10563	10727	5443	16575	3478,48	32,93
MMP9_III	8	9773,38	10447,5	5332	16934	4163,01	42,60
TIMP2_I	8	1,51	1,54	0,89	2,18	0,38	24,89
TIMP2_II	8	1,91	1,73	1,05	3,94	0,90	47,27
TIMP2_III	8	1,95	1,83	1,2	3,43	0,70	35,92
TIMP2_Ikor	8	75,63	77,25	44,5	109	18,82	24,89
TIMP2_Iikor	8	95,25	86,25	52,5	197	45,02	47,27
TIMP2_IIIkor	8	97,56	91,25	60	171,5	35,05	35,92

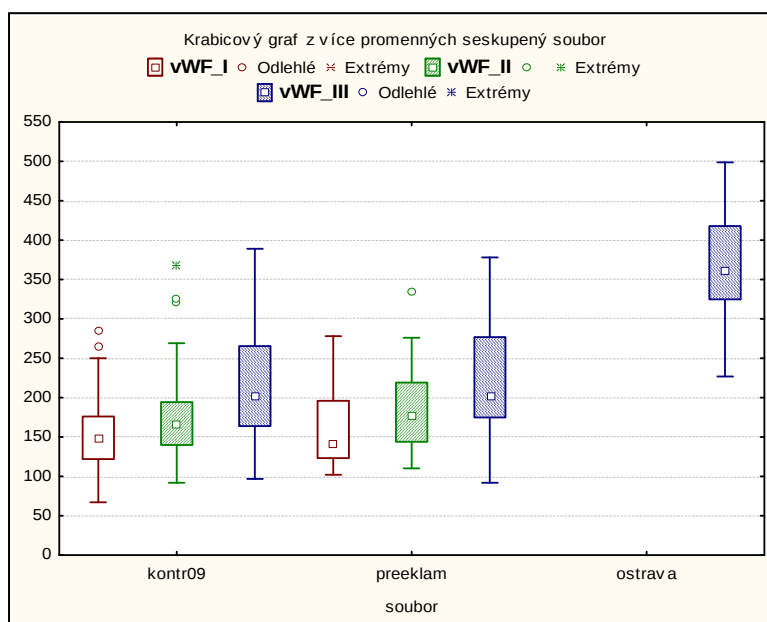
Tabulka č. 13 Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem v I. a II. trimestru s kontrolní skupinou zdravých těhotných (Soubor 3 vs souboru 1).

Promenná	t-testy; grupováno: soubor (dataIV2010) Skup. 1: kontr09 Skup. 2: HELLP OI										
	Prumer kontr09	Prumer HELLP OI	t	sv	p	Poc.plat kontr09	Poc.plat. HELLP OI	Sm.odch. kontr09	Sm.odch. HELLP OI	F-pomer Rozptyly	p Rozptyly
vWF_I	152,321	188,63	-2,10	87	0,039	81	8	45,7	56,3	1,513	0,349
vWF_II	173,338	204,75	-1,68	86	0,097	80	8	51,6	36,4	2,006	0,334
vWact_I	130,198	158,25	-2,05	87	0,043	81	8	36,9	35,7	1,072	1,000
vWact_II	150,087	164,00	-0,78	86	0,438	80	8	49,2	33,3	2,187	0,275
TRM_I	19,053	24,00	-1,31	81	0,193	75	8	9,4	16,2	2,980	0,017
TRM_II	28,471	31,25	-0,45	76	0,656	70	8	16,6	16,9	1,035	0,830
tPA_I	2,481	2,63	-0,35	87	0,729	81	8	1,1	1,4	1,683	0,250
tPA_II	2,974	3,13	-0,28	82	0,779	76	8	1,5	1,2	1,373	0,703
PAI_I	36,136	30,63	0,79	87	0,429	81	8	18,9	16,0	1,398	0,681
PAI_II	50,066	45,38	0,64	82	0,526	76	8	19,7	21,7	1,213	0,612
ePCR_I	201,764	302,13	-1,90	78	0,061	72	8	139,0	166,4	1,433	0,412
ePCR_II	274,683	505,62	-3,27	69	0,002	63	8	179,9	248,5	1,908	0,167
EMP_I	3838,383	3043,88	0,70	87	0,486	81	8	3176,5	1079,0	8,666	0,006
EMP_II	3836,595	4381,63	-0,70	85	0,483	79	8	2061,2	2358,1	1,309	0,515
MMP2_I	9043,761	7937,50	1,00	77	0,322	71	8	3073,4	1762,7	3,040	0,123
MMP2_II	9315,381	9242,25	0,07	69	0,943	63	8	2720,4	2632,9	1,068	1,000
MMP9_I	8371,901	8841,63	-0,40	77	0,687	71	8	3168,5	2573,9	1,515	0,590
MMP9_II	8290,810	10563,00	-2,41	69	0,018	63	8	2373,7	3478,5	2,147	0,103
TIMP2_I	1,852	1,51	1,19	77	0,236	71	8	0,8	0,4	4,423	0,044
TIMP2_II	1,968	1,91	0,21	69	0,831	63	8	0,8	0,9	1,372	0,466

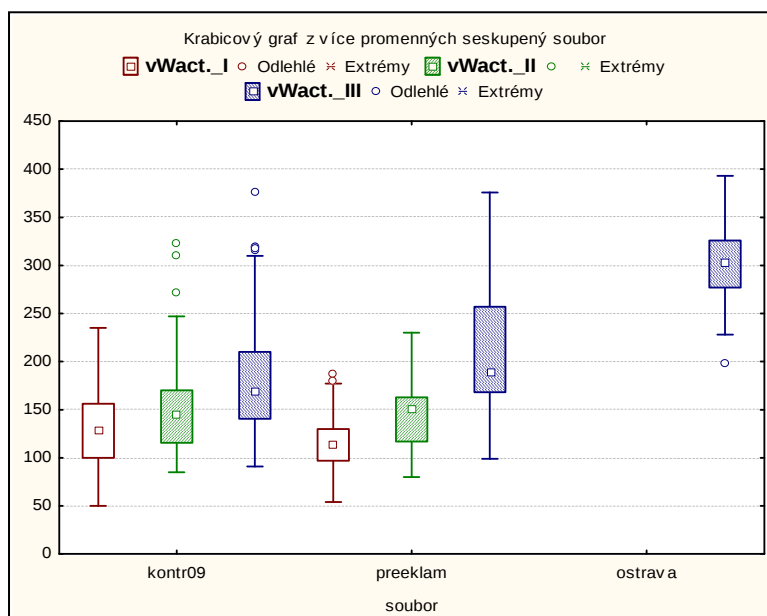
Tabulka č. 14 Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem v I. a II. trimestru se skupinou žen s preeklampií (Soubor 3 vs souboru 2).

Proměnná	t-testy; grupováno: soubor (dataIV2010)										
	Skup. 1: preeklam Skup. 2: HELLP OI										
	Prumer preeklam	Prumer HELLP OI	t	sv	p	Poc.plat preeklam	Poc.plat. HELLP OI	Sm.odch. preeklam	Sm.odch. HELLP OI	F-pomer Rozptyly	p Rozptyly
vWF_I	159,282	188,63	-1,52	45	0,134	39	8	48,274	56,27	1,359	0,501
vWF_II	181,385	204,75	-1,24	45	0,222	39	8	50,585	36,44	1,927	0,371
vWact. I	117,077	158,25	-3,46	45	0,001	39	8	29,591	35,68	1,454	0,426
vWact. II	142,051	164,00	-1,69	45	0,098	39	8	33,517	33,27	1,015	1,000
TRM_I	23,410	24,00	-0,12	45	0,903	39	8	11,521	16,18	1,972	0,170
TRM_II	34,333	31,25	0,51	45	0,610	39	8	15,184	16,93	1,244	0,608
tPA_I	2,590	2,63	-0,09	45	0,927	39	8	0,880	1,41	2,559	0,058
tPA_II	3,333	3,13	0,21	45	0,833	39	8	2,698	1,25	4,686	0,040
PAI_I	36,872	30,63	0,98	45	0,332	39	8	16,497	16,01	1,062	1,000
PAI_II	59,538	45,38	1,93	45	0,060	39	8	18,329	21,65	1,396	0,471
ePCR_I	151,256	302,13	-3,66	45	0,001	39	8	90,720	166,42	3,365	0,014
ePCR_II	233,744	505,62	-3,79	45	0,000	39	8	170,475	248,50	2,125	0,128
EMP_I	4161,205	3043,88	1,11	45	0,272	39	8	2781,549	1079,04	6,645	0,014
EMP_II	3082,410	4381,63	-2,13	45	0,038	39	8	1374,054	2358,13	2,945	0,029
MMP2_I	9038,385	7937,50	1,17	45	0,249	39	8	2530,725	1762,73	2,061	0,321
MMP2_II	7419,769	9242,25	-2,53	45	0,015	39	8	1672,040	2632,90	2,480	0,067
MMP9_I	8278,923	8841,63	-0,57	45	0,570	39	8	2526,465	2573,86	1,038	0,843
MMP9_II	6408,436	10563,00	-5,01	45	0,000	39	8	1779,779	3478,48	3,820	0,006
TIMP2_I	1,678	1,51	0,57	45	0,575	39	8	0,805	0,38	4,569	0,043
TIMP2_II	1,834	1,91	-0,25	45	0,807	39	8	0,706	0,90	1,629	0,314

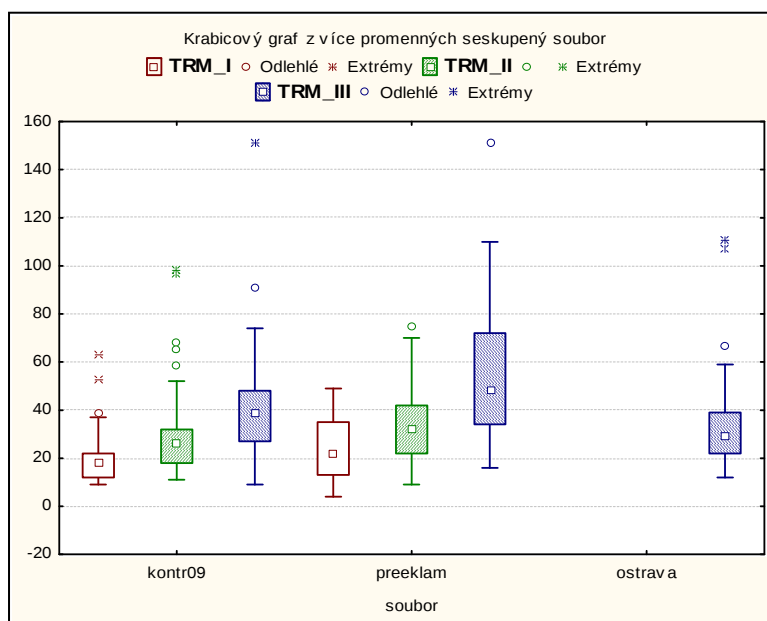
Graf č. 11 - Antigen vWf – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



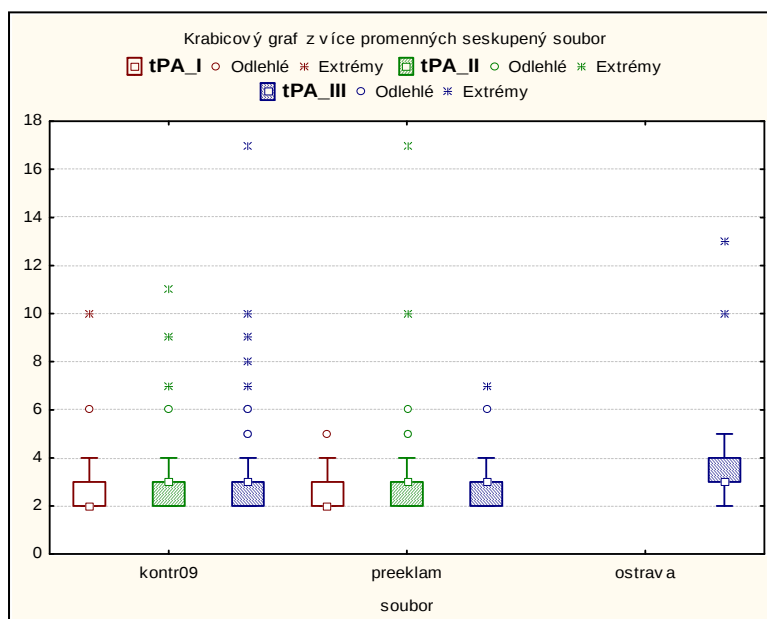
Graf č. 12 – Aktivita vWf – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



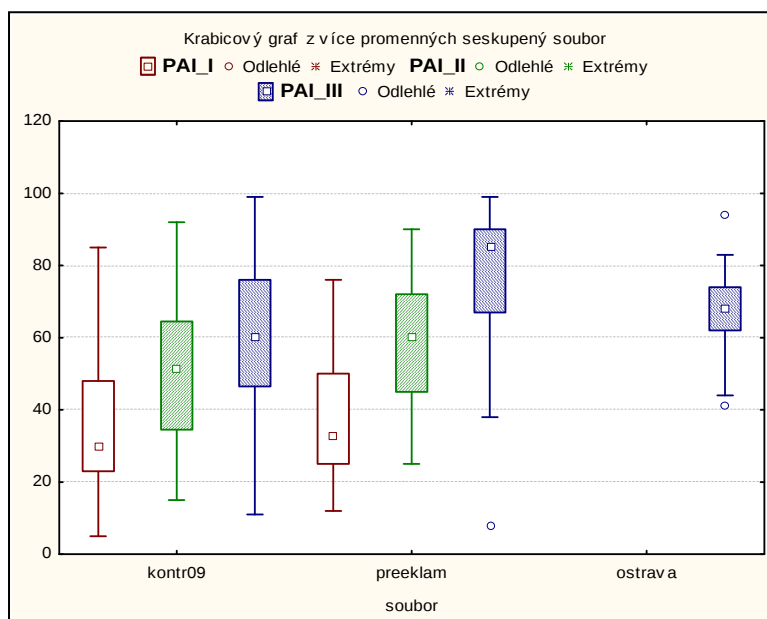
Graf č. 13 – Trombomodulin – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



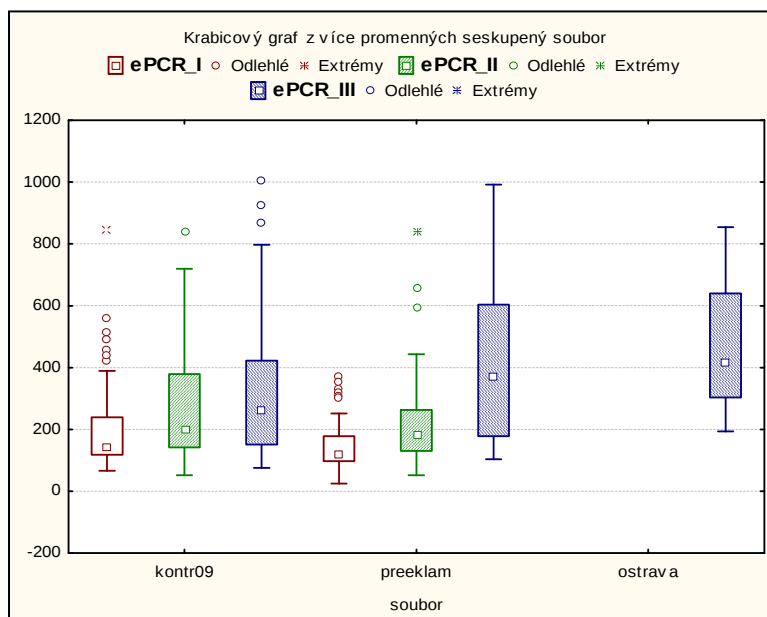
Graf č. 14 – Tkáňový aktivátor plazminogenu – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



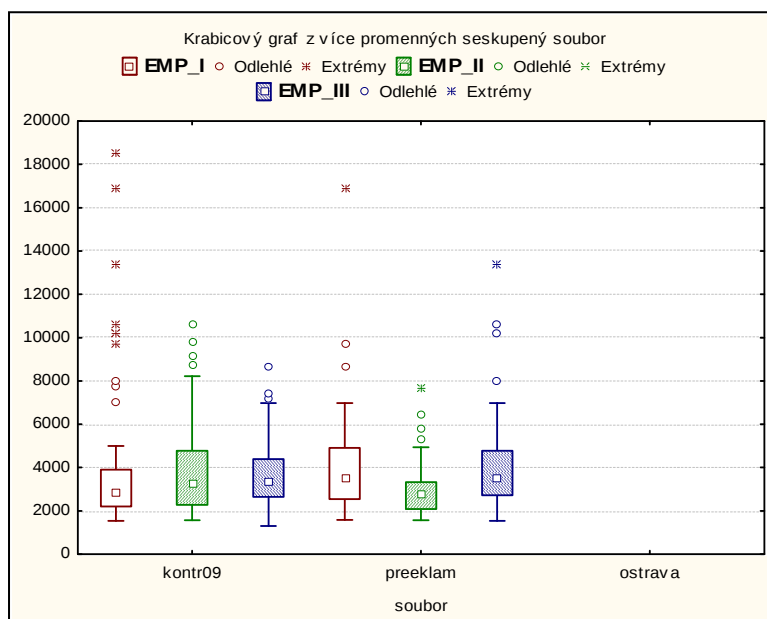
Graf č. 15 – Inhibitor aktivátoru plazminogenu - kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



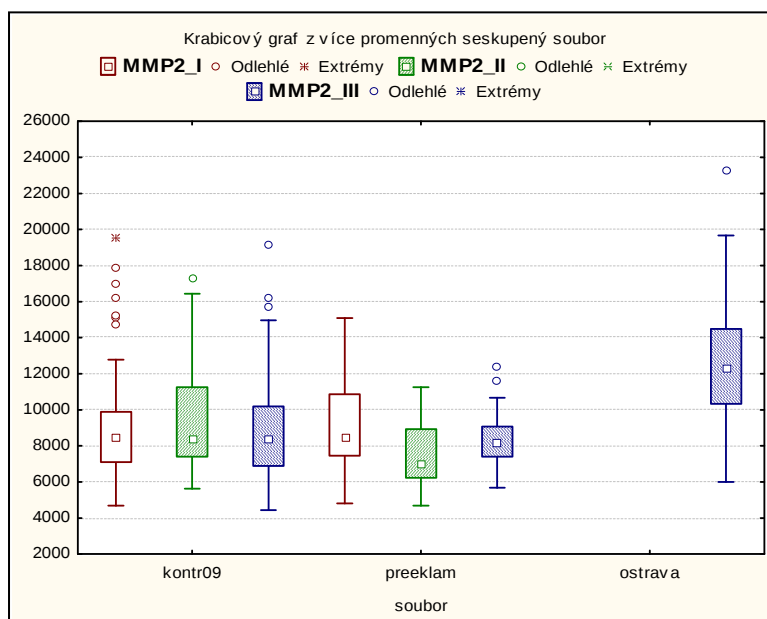
Graf č. 16 – endotelilální receptor proteinu C – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



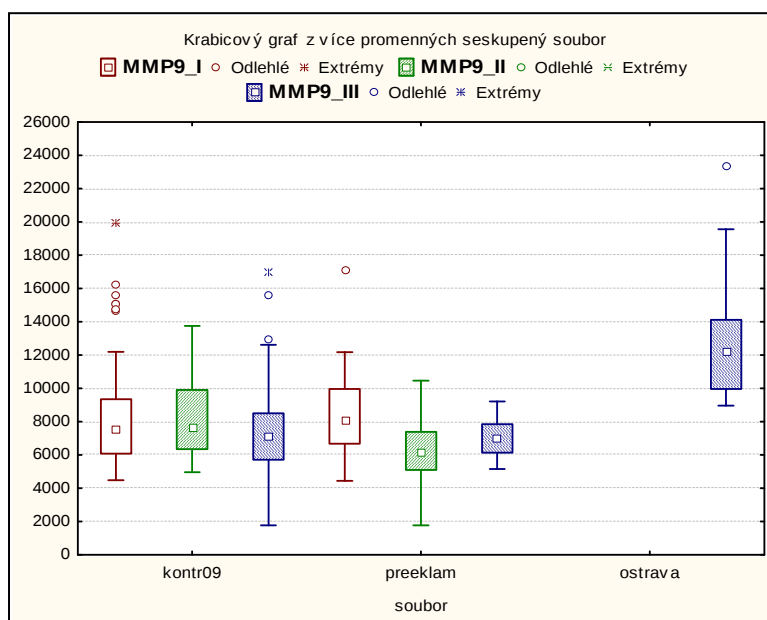
Graf č. 17 – Endotelové mikropartikule – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



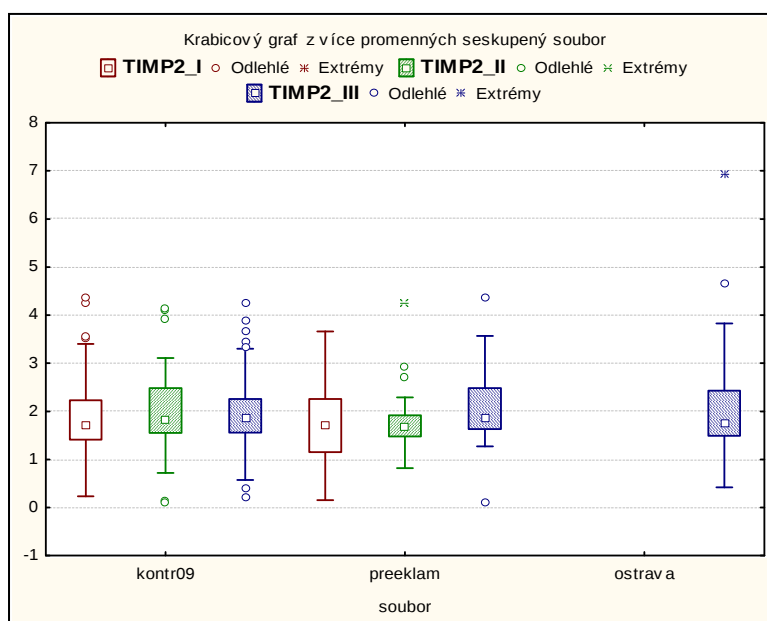
Graf č. 18 – Metaloproteináza 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



Graf č. 19 – Metaloproteináza 9 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



Graf č. 20 – Tkáňový inhibitor metaloproteináz 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy (soubor 4)



6. Diskuse

Osud těhotenství a stav plodu závisí rozhodující mírou na správné funkci uteroplacentární jednotky, která je ovlivněna hemostázou jak mateřské, tak fetální strany. Fyziologické těhotenství je spojeno se změnami ve všech složkách koagulace. Dochází k vzestupu většiny koagulačních faktorů, klesá koncentrace některých přirozených inhibitorů koagulace a významně je ovlivněna i aktivita fibrinolýzy. Tyto změny umožňují dostatečnou funkci fetoplacentární jednotky a správný vývoj plodu. Vychýlení v jakékoliv složce tohoto složitého systému může způsobit jak krvácení, tak trombotické komplikace v placentární oblasti.

V těhotenství dochází vlivem hormonálních a hemodynamických změn také k významnému ovlivnění funkce endotelu. Mezi markery aktivace endotelu, k jejichž významným změnám dochází během gravidity, patří např. t-PA, PAI-1, vWf, EPCR, metaloproteinázy a jejich inhibitory, trombomodulin a endotelové mikropartikule s prokoagulační aktivitou.

6.1. Fyziologická gravidita

Faktory prokoagulační

V těhotenství stoupají signifikantně hladiny koagulačních faktorů V, VII, VIII, IX, X, XII a vWf. Tyto změny jsou doprovázeny vzestupem hladiny fibrinogenu, který stoupá až na dvojnásobek oproti období mimo graviditu. V souladu s literárními údaji jsme i v našem souboru prokázali signifikantní nárůst aktivity i antigenu vWf [11].

Faktory antikoagulační

Systém přirozených inhibitorů koagulace hraje v udržení gravidity klíčovou roli. Solubilní forma trombomodulinu v plazmě může být využívána jako významný marker endoteliláního poškození. Hladina TM v průběhu gravidity stoupá signifikantně v jednotlivých trimestrech. Z její hladiny ve 12. týdnu nelze predikovat potenciální ohrožení těhotenství, avšak náhlé zvýšení hladiny by mohlo indikovat závažnou placentární komplikaci gravidity [10].

Kromě trombomodulinu patří do systému proteinu C dále protein S, jehož hladina v průběhu gravidity klesá, C4b vazebný protein a aktivovaný protein C (APC). Aktivita tohoto systému je zahájena ihned po navázání trombomodulinu na trombin, tato vazba je zprostředkována endoteliálním receptorem proteinu C, který je rovněž významným markerem aktivace endotelu. V souladu s literárními údaji jsme prokázali vzestup hladiny EPCR během gravidity [9].

Fibrinolýza:

Aktivita fibrinolytického systému je v průběhu těhotenství redukována, zůstává snížena během porodu, ale promptně se vrací k normě bezprostředně po porodu [11]. Hladina tkáňového aktivátoru plazminogenu se během gravidity v našem souboru neměnila, tento výsledek je v souladu s literárními údaji [12]. Hladiny t-PA nejsou ovlivněny pouze vzestupem hladiny PAI-1, který jsme prokázali se statistickou významností i v našem souboru, ale hlavně zvýšením hladiny PAI-2, pocházejícím z placentární tkáně. Hladina PAI-1 ve III. trimestru dosahuje několikanásobku výchozí hladiny na začátku těhotenství a vrací se k normálu bezprostředně po porodu [13].

Endotelové mikropartikule:

Fyziologické těhotenství je charakterizováno zvýšením hladiny jak destičkových, tak endotelových mikropartikulí. Jejich role v etiopatogenezi porodnických komplikací zůstává nejasná [14]. Vanwijck et al. prokázali, že mikropartikule u žen s preeklampií, avšak nikoli od zdravých těhotných, vyvolávají na izolovaných myometrálních arteriích poškození endotelu [15]. V našem souboru jsme ve shodě s literaturou prokázali nárůst endotelových mikropartikulí během těhotenství, i když bez statistické významnosti.

Systém metaloproteináz:

Rovnováha mezi MMP a TIMP hraje důležitou roli při cévní remodelaci, angiogenezi a děložní a systémové vazodilataci během těhotenství. Porucha této rovnováhy souvisí s celou řadou závažných klinických stavů, v těhotenství pak zejména s hypertenzí a preeklampií. V I. trimestru těhotenství byla popsána exprese MMP-2 převážně v extravilózním trofoblastu, zatímco MMP-9 hlavně ve vilózním cytotrofoblastu. Aktivita MMP-2 je pozorována až do termínu porodu, invazivita

cytotrofoblastu je inhibována aktivitou TIMP-2 a protilátkami antiMMP-2. Vzestup v plazmatické hladině metaloproteináz byl také popsán v průběhu fyziologické gravidity a je dáván do souvislosti s cévními změnami, které probíhají zejména na začátku gravidity [16]. V naší studii jsme potvrdili konstantně zvýšenou hladinu MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 bez signifikantní změny během celé gravidity.

6.2. Skupiny těhotných s preeklampií a se syndromem HELLP

Patofyziologie preeklampsie není zcela jasná. Předpokládá se dvoustupňový průběh onemocnění v závislosti na průběhu trofoblastické invaze a následné dysfunkci endoteliálních buněk. Jedná se o heterogenní onemocnění s velkou variabilitou klinických projevů a s rozdílným nástupem potíží. V zásadě lze rozlišit 2 typy preeklampsie, tzv. „early onset“ čili s časným nástupem a „late-onset“ s pozdním nástupem klinických a laboratorních projevů.

Role oxidativního stresu v patofyziologii preeklampsie je v posledních letech živě diskutována. Placentární hypoperfúze s následnou reperfúzí vyvolává oxidativní stres a následně vzniklé produkty a metabolity poškozují buňky endotelu a aktivují četné patofyziologické procesy vedoucí k těžkým změnám v organismu těhotné ženy. Rozdílné a často protichůdné výsledky studií zaměřených na mechanismus poškození endotelu při oxidativním stresu při preeklampsii jsou dávány do souvislosti s určitým rozdíly v patofyziologii preeklampsie s časným a pozdním nástupem.

V našem souboru jsme v souladu s literaturou prokázali jak ve skupině preeklampsie, tak i ve skupině s HELLP syndromem signifikantně zvýšené hladiny antigenu i aktivity von Willebrandova faktoru oproti kontrolní skupině [19]. Von Willebrandův faktor umožňuje adhezi trombocytů k subendoteliálnímu kolagenu a urychluje tvorbu primární hemostatické zátky. Podobně jako PAI-1 nebo t-PA není jeho syntéza výlučně záležitostí endotelu, ale jako např. u vWf i megakaryocytů, nicméně vzhledem k elevaci i ostatních markerů aktivace endotelu je u preeklampťiček pravděpodobné, že zdrojem zvýšeného vWf je endotel. Zda je poškození endotelu primární příčinou či následkem těchto patologických stavů, není zatím jasné. V případě HELLP syndromu byly hladiny vWf Aa jeho aktivita

signifikantně vyšší nejen proti kontrolnímu souboru, ale i proti souboru preeklamsií.

V našem souboru jsme dále prokázali signifikantní rozdíl v hladinách trombomodulinu ve skupině žen, u nichž se během těhotenství vyvinula preeklampsie, ve srovnání s kontrolní skupinou žen s fyziologicky probíhající graviditou, a to ve všech třech trimestrech. Tento údaj je v souladu s literaturou. Hladina trombomodulinu je signifikantně zvýšená u těhotných s preeklamsií, výše hladiny koreluje s tíží onemocnění [9,23]. Sériové vyšetření trombomodulinu lze využít k selekci žen, které by mohly profitovat z časně farmakologické intervence. [10]. Tuto skutečnost jsme ale nepotvrdili u pacientek, u kterých se později rozvinul HELLP syndrom – hladiny TM byly sice elevovány, nikoliv ovšem statisticky významně, což přičítáme malé velikosti souboru pacientek z kontrolního souboru, u kterých se později rozvinul HELLP syndrom. Při větším souboru předpokládáme potvrzení statistické významnosti, i s ohledem na skutečnost, že absolutní hladiny trombomodulinu byly ve srovnání s pacientkami s preeklamsií dokonce vyšší.

Podobně jako trombomodulin je i endoteliální receptor proteinu C (EPCR) glykoprotein exprimovaný převážně na povrchu endoteliálních buněk cév a také v placentě. Hraje klíčovou roli v antikoagulačním systému proteinu C. U obou markerů se uplatňuje poměrně rozsáhlá genetická variabilita. Mutace EPCR byly popsány u pacientek především s opakovanými těhotenskými ztrátami a těžkým poškozením placenty OR 4,0 (95% CI 1,1 – 14,9). (24) Při poškození endotelu dochází ke vzestupu hladiny a zvýšení koncentrace solubilního EPCR v plazmě. V našem souboru jsme prokázali signifikantní vzestup v jednotlivých trimestrech. Ve srovnání se skupinou zdravých těhotných byl v našem souboru žen s preeklamsií signifikantní nárůst průměrných hladin EPCR ve II. trimestru a dále nárůst, avšak nesignifikantní, i v I. a III. trimestru. Tento výsledek je ve shodě s literaturou [9]. V souboru HELLP byl, podobně jako u vWf, nárůst výraznější a statisticky významný jak proti kontrolnímu souboru, tak proti souboru preeklamsií.

Systém fibrinolýzy je dán rovnováhou řady faktorů: fyziologický inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu (PAI) společně s urokinázou a tkáňovým aktivátorem plazminogenu (t-PA) jsou primárními regulátory fibrinolýzy. Ve shodě s literárními údaji jsme neprokázali změny v hladinách t-PA v žádné skupině [12]. Kromě endotelu je t-PA produkováno i řadou dalších buněk, jako jsou fibroblasty a synoviální buňky, což může vysvětlovat rozdílné výsledky některých studií. Rozdíl

jsme pozorovali pouze ve skupině se syndromem HELLP ve III. trimestru, který ovšem nebyl signifikantní. Hunt et al. v práci na souboru 27 fyziologických gravidit, 24 gravidit s abnormálním ultrazvukovým nálezem na uterinních artériích, ale s fyziologickým výsledkem těhotenství, skupině 24 těhotenství s bilaterálním nálezem patologie na uterinních artériích a patologickým výsledkem těhotenství a skupině 7 pacientek s preeklampií nebo růstovou retardací plodu ve 23. týdnu došli k podobným závěrům [20]. Při porovnání markerů fibrinolýzy zjistili vzestup hladiny t-PA u těžké preeklampsie, avšak bez rozdílu hladin mezi fyziologickým těhotenstvím a oběma skupinami s abnormálním ultrazvukovým nálezem [20].

Inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1) je považován za jeden z hlavních markerů endoteliální dysfunkce u preeklampsie. PAI je produkován placentární tkání a je považován za ukazatel funkce placenty. V naší studii jsme prokázali signifikantně vyšší hladiny PAI-1 ve II. i III. trimestru u skupiny s rozvojem preeklampsie, při porovnání III. trimestrů kontrolní skupiny a žen se syndromem HELLP jsme nenašli signifikantní významnost. Tyto údaje jsou v souladu s literaturou. Švédská práce autorů Wikström et al. prokázala signifikantní výsledky pouze u žen s časnou formou preeklampsie, avšak nikoliv u pozdní formy [17]. Koncentrace a vzestup hladiny PAI-1 u žen s preeklampií je v některých pracech potvrzen, v jiných naopak popírán [17,18]. To dokresluje složitost situace a výraznou heterogenitu tohoto onemocnění. Rozdílné výsledky mohou být ovlivněny geneticky podmíněným polymorfismem PAI, dále způsobem zpracování laboratorního vzorku (zpracování séra či plazmy) a také faktem, že PAI-1 může být, kromě endotelu, produkován celou řadou dalších buněk, jako jsou buňky hladké svaloviny, trombocyty, neutrofily.

Studie zaměřené na vyšetření mikropartikulí u pacientek s preeklampií prokázaly sníženou hladinu destičkových a zvýšenou hladinu endotelových mikropartikulí ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých těhotných [14]. Snížení destičkových mikropartikulí u těchto pacientek pravděpodobně souvisí s absolutním poklesem trombocytů u preeklampsie. Endotelové mikropartikule odrážejí stav aktivace endotelu u preeklamptických. Zvýšení počtu mikropartikulí úzce koreluje s hladinou CRP, který v tomto případě funguje jako aktivátor komplementu [21]. V naší studii jsme však jednoznačný vzestup neprokázali, hladiny mikropartikulí se jak u fyziologických těhotných, tak u těhotných s preeklampií výrazněji neměnily. V metodice jsme zvolili vyšetření průtokovou cytometrií na základě imunotypizace

anti CD 144. Nesignifikantní vzestup oproti ostatním pracem by mohl být způsoben zaměřením na jiný antigen, než tyto jiné práce [22]. I přes četné studie zaměřené na vliv mikropartikulí v patogenezi preeklampsie zůstává jejich role nejasná. Složitost situace dokresluje studie VanWijkové et al. Práce byla provedena za užití bioptického vzorku odebraného z dělohy u 22 těhotných při císařském řezu. Studie byla zaměřena na průkaz, zda plazma žen s preeklampsií může vyvolat endoteliální dysfunkci. Po inkubaci vzorků jednak s celou plazmou, jednak s plazmou zbavenou mikropartikulí a také se vzorkem izolovaných mikropartikulí po promytí fyziologickým roztokem byla měřena koncentrace bradykininu. Dysfunkce endotelu nebyla zaznamenána při použití plazmy preeklampsiček a to jak s, tak bez mikropartikulí. Statisticky signifikantní efekt byl zaznamenán pouze při užití izolovaných mikropartikulí preeklampsiček. [15]. Signifikantně vyšší hladiny byly v našem souboru zaznamenány i u souboru HELLP.

Složitý systém matrix metaloproteináz u pacientek s preeklampsií a hypertenzními chorobami byl předmětem zkoumání u řady studií. Poon et al. prokázal signifikantní prediktivní vztah u MMP 2 a 9 u těhotných s pozdějším rozvojem preeklampsie [25]. Palei et al. studoval vztah MMP-2 a 9 a TIMP-2 v průběhu jednotlivých trimestrů. Signifikantní vzestup zaznamenali u MMP-9, ale nikoliv MMP-2 [26]. Podobné výsledky jsme zjistili i v našem souboru. Signifikantní byl vzestup MMP 9 ve II. trimestru a vzestup, ale nesignifikantní byl zaznamenán i ve III. trimestru, v případě HELLP syndromu byl vzestup signifikantní jak ve srovnání s kontrolním souborem, tak ve srovnání s preeklampsií.

7. Závěr

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu při srovnání výsledků skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve všech trimestrech oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných. Sériové vyšetření trombomodulinu lze využít k selekci žen, které by mohly profitovat z časně farmakologické intervence.

V případě HELLP syndromu byla elevace trombomodulinu v I. a II. trimestru rovněž prokázána a v absolutních hodnotách byly hladiny vyšší než u pacientek s preeklampií, vzhledem k velikosti souboru, který čítal pouhých 8 pacientek, nebyla prokázána statistická významnost. Předpokládáme, že trombomodulin je vhodným markerem pro včasnou identifikaci žen s rizikem rozvoje HELLP syndromu.

V případě HELLP syndromu jsme navíc prokázali statisticky významný rozdíl v hladinách antigenu a aktivity vWf ve všech trimestrech při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinul HELLP syndrom ve srovnání s ženami s fyziologickou graviditou i ve srovnání se ženami s preeklampií, statisticky významné zvýšení jsme rovněž prokázali u hladin EPCR, a MMP 9 proti skupině žen s preeklampií i fyziologickou graviditou.

HELLP syndrom, ač etiologicky a patofyziologicky velmi podobný preeklampií, se od preeklampsie liší vyšším stupněm aktivace endotelu již v časných stádiích gravidity.

8. Souhrn

8.1. Cíl práce

Cílem vlastního výzkumného projektu je analýza vybraných markerů aktivace endotelu u těhotných s HELLP syndromem a preeklampií v porovnání se zdravými těhotnými se snahou o nalezení markerů, které by bylo možné využít v predikci preeklampsie a/nebo HELLP syndromu.

8.2. Typ studie

Prospektivní studie.

8.3. Klíčová slova

endotel, aktivace, těhotenství, preeklampsie, HELLP syndrom, trombomodulin

8.4. Metodika

8.4.1. Zařazení pacientek

Studie probíhala ve dvou částech. V první části studie bylo do souboru zařazeno 403 žen, z nichž 45 žen studii z různých důvodů nedokončilo. Pacientky zařazené do studie byly v době prvního odběru bez interních, neurologických či jiných závažných onemocnění. Byla jim odebrána venózní krev standardním způsobem v období těhotenských odběrů na začátku gravidity (do konce I. trimestru). Druhý odběr byl proveden v období 24.- 28. týdne a třetí odběr byl proveden v období 34. až 37. týdne gravidity.

Do druhé části studie byly zařazeny pacientky, u kterých byl v průběhu gravidity diagnostikován syndrom HELLP. Jednalo se o ženy, u kterých byla stanovena diagnóza HELLP syndromu prepartálně a krevní odběr byl proveden ještě před začátkem děložní činnosti nebo před ukončením gravidity císařským řezem.

8.4.2. Laboratorní vyšetření

V koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc byly vyšetřovány následující parametry následujícími technikami: t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, vWf Ag – EIA (imunologické stanovení využívající imunoturbidimetrie), ePCR – ELISA, MMP-2,9 – ELISA s fluorogenní detekcí, TIMP-2 – ELISA, endoteliální mikropartikule – průtoková cytometrie.

8.5. Výsledky

8.5.1. Soubor

Kompletní protokol studie absolvovalo 358 těhotných. U 38 (10,6%) z nich se vyvinul lehký až středně těžký stupeň preeklampsie, u 8 rodiček (2,2%) byl diagnostikován HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace.

V druhé části studie byly odebrány krevní vzorky 28 ženám s HELLP syndromem.

Všechny výše uvedené ženy, z 1. i 2. části studie, byly rozděleny do 4 souborů:

Soubor 1: soubor fyziologických gravidit, N1 = 312

Soubor 2: soubor žen s preeklampií, N2 = 38

Soubor 3: soubor žen s HELLP syndromem, N3 = 8

Soubor 4: soubor žen s HELLP syndromem zjištěným ve III. trimestru, N4 = 28.

8.5.2. Laboratorní výsledky

8.5.2.1. Výsledky souboru žen s fyziologickou graviditou

Hladina antigenu vWf stoupala během celého těhotenství, přičemž jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi II. a III. trimestrem, rozdíl mezi I. a II. trimestrem byl na hranici statistické významnosti. Současně stoupala aktivita vWf, prokázali jsme statisticky významný rozdíl hladin mezi II. a III. trimestrem, rozdíl mezi I. a II. trimestrem nebyl statisticky významný.

Hladina trombomodulinu významně stoupala během gravidity, prokázali jsme statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem.

Hladina solubilní formy EPCR stoupala během gravidity, v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. trimestrem, rozdíl mezi II. a III. trimestrem nebyl statisticky významný.

Hladina PAI-1 stoupala během celého těhotenství, v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem.

Hladina t-PA se během gravidity významněji neměnila. Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladinách MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ani endotelových mikropartikulí v jednotlivých trimestrech.

8.5.2.2. Výsledky souborů žen s preeklampií

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve všech trimestrech oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných.

Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve II. a III. trimestru, v I. trimestru jsme rozdíl hladin nepozorovali oproti hladinám inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 ve skupině zdravých těhotných.

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl hodnot vWf (antigenu i aktivity), tkáňového aktivátoru plazminogenu, endoteliálního receptoru proteinu C, endotelových mikropartikulí, metaloproteináz 2, 9 ani tkáňového inhibitoru metaloproteináz 2 při porovnání jejich hladin v jednotlivých trimestrech u skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie a skupiny žen s fyziologicky probíhající graviditou.

8.5.2.3. Výsledky souborů žen s HELLP syndromem

8.5.2.3.1. srovnání výsledků jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině žen s fyziologickou graviditou v I. a II. trimestru (soubor 3 vs 1)

Při srovnání hladin markerů aktivity endotelu v I. a II. trimestru mezi pacientkami s fyziologickou graviditou a pacientkami s HELLP syndromem jsme prokázali

statisticky významný vzestup v hladinách vWf a aktivity vWf v I. trimestru u pacientek s HELLP syndromem a statisticky významný vzestup v hladině EPCR a MMP-9 v II. trimestru u pacientek, u kterých později došlo k rozvoji HELLP syndromu.

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu, a to ani v jednom trimestru, rovněž jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách tkáňového aktivátoru plazminogenu, endotelových mikropartikulí, metaloproteináz 2 ani tkáňového inhibitoru metaloproteináz 2.

8.5.2.3.2. srovnání výsledků jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině zdravých těhotných ve III. trimestru (soubor 4 vs 1)

V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Současné byly statisticky významně zvýšené hladiny aktivity vWf ve skupině žen s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Rovněž jsme v našem souboru prokázali statisticky významné zvýšení hladin EPCR ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl jak v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem ve srovnání s kontrolním souborem zdravých těhotných žen ve III. trimestru, tak v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti souboru zdravých těhotných žen ve III. trimestru .

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami trombomodulinu, hladinami t-PA a PAI-1 ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině zdravých těhotných. Rovněž rozdíly v hladinách TIMP-2 nebyly statisticky významné.

8.5.2.3.3. Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině žen s preeklampií v I. a II. trimestru (soubor 3 versus 2)

Při srovnání hladin markerů aktivace endotelu v I., II. a III. trimestru mezi pacientkami, u nichž se později vyvinul HELLP syndrom a pacientkami, u nichž se později vyvinula preeklampsie jsme prokázali statisticky významný rozdíl v aktivitě vWf v I. trimestru (vzestup aktivity u pacientek s HELLP syndromem), v hladinách EPCR v I. i II. trimestru (vyšší u HELLP syndromu) a statisticky významný rozdíl v hladinách EMP v II. trimestru a MMP-2 a MMP-9 v II. trimestru.

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu, a to ani v jednom trimestru, rovněž jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách t-PA, vWf ani TIMP-2.

8.5.2.3.4. Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem oproti skupině žen s preeklampií ve III. trimestru (soubor 4 versus 2)

V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti pacientkám s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity. Současné byly statisticky významně zvýšené hladiny aktivity vWf ve skupině žen s HELLP syndromem oproti pacientkám s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl jak v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem ve srovnání se skupinou pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity, tak v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti souboru pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity. Při srovnání hladin trombomodulinu, resp. PAI-1 v obou skupinách pacientek jsme prokázali rovněž statisticky významný rozdíl hodnot, ovšem hladiny trombomodulinu i PAI-1 byly zvýšené ve skupině pacientek s preeklampií ve srovnání se skupinou žen s HELLP syndromem, obojí ve III. trimestru gravidity.

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami EPCR, hladinami t-PA, a TIMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině pacientek s preeklampií ve srovnatelném stadiu gravidity.

8.6. Závěr

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve všech trimestrech oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných. Sériové vyšetření trombomodulinu lze využít k selekci žen, které by mohly profitovat z časně farmakologické intervence.

V případě HELLP syndromu byla elevace trombomodulinu v I. a II. trimestru rovněž prokázána a v absolutních hodnotách byly hladiny vyšší než u pacientek s preeklampií. Vzhledem k velikosti souboru, který čítal pouhých 8 pacientek, nebyla ale prokázána statistická významnost. Předpokládáme, že trombomodulin je vhodným markerem pro včasnou identifikaci žen s rizikem rozvoje HELLP syndromu.

V případě HELLP syndromu jsme navíc prokázali statisticky významný rozdíl v hladinách antigenu a aktivity vWf ve všech trimestrech při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinul HELLP syndrom ve srovnání s ženami s fyziologickou graviditou i ve srovnání se ženami s preeklampií, statisticky významné zvýšení jsme rovněž prokázali u hladin EPCR, a MMP-9 proti skupině žen s preeklampií i fyziologickou graviditou.

HELLP syndrom, ač etiologicky a patofyziologicky velmi podobný preeklampsii, se od preeklampsie liší vyšším stupněm aktivace endotelu již v časných stádiích gravidity.

9. Summary

9.1. Aim of the study

To determine markers of endothelial activation in order to diagnose endothelial damage during normal pregnancies, pregnancies complicated by preeclampsia and HELLP syndrome.

9.2. Type of the study

Prospective study

9.3. Key words

Endothelium, activation, pregnancy, preeclampsia, HELLP syndrome, thrombomodulin

9.4. Materials and methods

The study had 2 parts. In the first part, there were 403 women included into the study. Forty-five of them did not finish the study from various reasons. The patients included into the study had neither internal, neurological nor other serious disorders. A venous blood sample was taken in the 1st trimester, 2nd trimester (between 24th and 28th week) and third trimester (between 34th and 37th week).

In the second part of the study, patients with prepartally confirmed HELLP syndrome were included. Their blood was taken before the onset of delivery or before the surgery was performed.

The blood samples were examined in the coagulation laboratory of Hemato-oncological clinic at University Hospital Olomouc using following methods: t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, vWf Ag – EIA, EPCR – ELISA , MMP-2,9 – ELISA with fluorogen detection, TIMP-2- ELISA, endothelial microparticles – flow cytometry.

9.5. Results

The whole study protocol was completed by 358 patients. Mild or severe preeclampsia developed in 38 women (10,6%) in the group 1 and HELLP syndrome with different clinical symptoms developed in 8 patients (2,2%).

In the second part of the study, there were 28 patients with HELLP syndrome included.

All the above-described women were divided into 4 groups:

Group 1: women with normal pregnancy, N1 = 312

Group 2: women with preeclampsia, N2 = 38

Group 3: women with HELLP syndrome, N3 = 8

Group 4: women with HELLP syndrome diagnosed in the 3rd trimester, N4 = 28

9.6. Laboratory results

9.6.1. Results of group 1: women with normal pregnancy

Antigen vWf plasma levels were elevated in all trimesters compared to normal plasma levels and there were statistically significant differences in their levels between 2nd and 3rd trimesters. The activity of vWf was increased as well in all three trimesters with statistically significant difference between 2nd and 3rd trimesters.

The level of thrombomodulin rose significantly during pregnancy with statistically significant difference between all three trimesters.

The plasma level of soluble form of EPCR was rising during the pregnancy with statistically significant difference between 1st and 2nd trimesters as well as the plasma levels of PAI-1.

The levels of t-PA, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 as well as levels of endothelial microparticles did not change significantly during the pregnancy.

9.6.2. Results of group 2: women with preeclampsia

We confirmed statistically significant elevations of thrombomodulin levels in all three trimesters in women who later developed preeclampsia compared to women with normal pregnancies. Furthermore we confirmed statistically significant elevations in PAI-1 levels in women with preeclampsia in the 2nd and 3rd trimesters but not in the 1st trimester.

We did not confirmed any statistical significance in levels of vWf (neither antigen nor activity), t-PA, EPCR, EMP, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 when compared to normal pregnancies.

9.6.3. Results of HELLP group (group 3 and 4)

9.6.3.1. comparison of endothelial markers in the 1st and 2nd trimester between women with HELLP syndrome and women with normal pregnancies (group 3 versus group 1)

When comparing levels of endothelium activation markers between women who later developed HELLP syndrome and women with normal pregnancies we confirmed statistically significant elevation of vWf antigen and activity in the 1st trimester and EPCR and MMP-9 levels in the 2nd trimester in the HELLP group.

On the other side, we did not confirm any statistically significant changes in levels of thrombomodulin, neither we confirmed any differences in other markers – t-PA, EMP, MMP-2 and TIMP-2.

9.6.3.2. comparison of endothelial markers in the 3rd trimester between women with HELLP syndrome and women with normal pregnancies (group 4 versus group 1)

We confirmed statistically significant elevation of vWf antigen as well as vWf activity in the 3rd trimester in the HELLP group compared to women with normal

pregnancies in the same period of pregnancy. We also confirmed statistically significant elevation of EPCR, MMP-2 and MMP-9 in the HELLP group.

On the other side we did not see statistically significant changes in the levels of thrombomodulin, t-PA, PAI-1 and MMP-9.

9.6.3.3. comparison of endothelial markers in 1st and 2nd trimesters between women with HELLP syndrome and women with preeclampsia (group 3 versus group 2)

When comparing levels of endothelium activation markers in 1st and 2nd trimesters in women who later developed HELLP syndrome to women who later developed preeclampsia we confirmed statistically significant elevations of vWf activity, EPCR levels in both 1st and 2nd trimesters and EMP, MMP-2 and MMP-9 in the 2nd trimester in the HELLP group.

On the other side we did not see statistically significant changes in the levels of thrombomodulin, t-PA, vWf antigen and TIMP-2.

9.6.3.4. comparison of endothelial markers in the 3rd trimester between women with HELLP syndrome and women with preeclampsia (group 4 versus group2)

We confirmed statistically significant elevation of both vWf antigen and vWf activity, MMP-2 and MMP-9 in the 3rd trimester.

When comparing thrombomodulin and PAI-1 plasma levels we also found statistically significant changes but the levels were higher in the preeclampsia group. On the other side we did not see statistically significant changes in the levels of EPCR, t-PA, and TIMP-2

9.7. Conclusion

We confirmed statistically significant elevations of thrombomodulin plasma levels in all three trimesters in women who later developed preeclampsia compared to women with normal pregnancies. Thrombomodulin could be used as an early selection marker to identify women at risk of preeclampsia who could possibly profit from early pharmacological intervention.

In HELLP syndrome the levels of thrombomodulin were also elevated when compared to group of women with normal pregnancies and even when compared to women with preeclampsia, but due to the small number of cases (8 only) we were not able to prove it statistically. The assumption is that thrombomodulin could be used as an early selection marker to identify women at risk of HELLP syndrome as well.

In the HELLP group we confirmed statistically significant elevations of vWf antigen and activity when compared to women with normal pregnancies and also to women with preeclampsia. Statistically significant changes were found also in EPCR and MMP-9 plasma levels in the HELLP group compared to women with normal pregnancies and preeclampsia.

HELLP syndrome is associated with higher grade of endothelium activation compared to preeclampsia already at the early stages of pregnancy indicating that there are some differences in the pathophysiology of HELLP syndrome and preeclampsia in spite of their very similar or identical etiology.

10. Seznam tabulek a grafů

Tab.1 – str.11:	Modifikovaná klasifikace Americké národní skupiny pro výchovný program vysokého krevního tlaku (1990), ACOG 2002
Tab.2 – str.13:	Diagnostická kritéria HELLP syndromu
Tab.3 – str.24:	Mateřská morbidita a mortalita
Tab.4 – str.24:	Neonatologická mortalita a morbidita
Tab.5 - str. 59:	Porovnání hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech u fyziologických gravidit
Tab.6 – str.66:	Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s preeklampií v jednotlivých trimestrech
Tab.7 – str.67:	Porovnání výsledků jednotlivých trimestrů u skupiny s preeklampií
Tab.8 – str.68:	Porovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u skupiny s preeklampií oproti kontrolní skupině (1.část)
Tab.9 – str.69:	Porovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u skupiny s preeklampií oproti kontrolní skupině (2.část)
Tab.10 – str.72:	Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek se syndromem HELLP ve III. trimestru
Tab.11 – str.72:	Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem, skupině žen s preeklampií a skupině zdravých těhotných ve III. trimestru
Tab.12 – str.74	Hodnoty jednotlivých parametrů u pacientek s HELLP syndromem v I., II. a III. trimestru (soubor 3)
Tab. 13 – str.75	Srovnání jednotlivých parametrů žen s HELLP syndromem v I. a II. trimestru s kontrolní skupinou zdravých těhotných
Tab 14 –str.76	Srovnání jednotlivých parametrů u žen s HELLP syndromem v I. a II. trimestru se skupinou žen s preeklampií .
Obr. 1 – str. 28:	Zjednodušené schéma etiopatogeneze HELLP syndromu
Obr. 2 – str. 32:	Abnormální placentace u preeklampsie

Obr. 3 – str. 39:	Schéma časného vývoje trofoblastu a vývoj jednotlivých komplikací na podkladě poruchy v různých časových obdobích.
Obr.4 – str. 39:	Přehled událostí v časném stádiu normálního těhotenství a v situaci vedoucí k preeklampsii
Graf č.1 - str.60:	Antigen von Willebrandova faktoru
Graf č.2 - str.60:	Aktivita von Willebrandova faktoru
Graf č.3 - str.61:	Trombomodulin
Graf č.4 – str.61:	Tkáňový aktivátor plazminogenu
Graf č.5 - str.62:	Inhibitor aktivátoru plazminogenu
Graf č.6 – str.62:	Endoteliální receptor proteinu C
Graf č.7 – str.63:	Endotelové mikropartikule
Graf č.8 – str.63:	Metaloproteináza 2
Graf č.9 – str.64:	Metaloproteináza 9
Graf č.10 – str.64:	Tkáňový inhibitor metaloproteináz 2
Graf č.11 – str.77:	Antigen vWf –kontroly, preeklampsie, HELLP sy
Graf č.12 – str.77:	Aktivita vWf – kontroly, preeklampsie, HELLP sy
Graf č.13 – str.78:	Trombomodulin – kontroly, preeklampsie, HELLP sy
Graf č.14 – str.78:	Tkáňový aktivátor plazminogenu – kontroly, preeklampsie, HELLP sy
Graf č.15 - str.79:	Inhibitor aktivátoru plazminogenu - kontroly, preeklampsie, HELLP sy
Graf č.16 - str.79:	Endotelilální receptor proteinu C-kontrolы, preeklampsie, HELLP
Graf č.17 – str.80:	Endotelové mikropartikule– kontrolы, preeklampsie, HELLP
Graf č.18 – str.80:	Metaloproteináza 2 – kontrolы, preeklampsie, HELLP
Graf č.19 – str.81:	Metaloproteináza 9 – kontrolы, preeklampsie, HELLP
Graf č. 20 – str.81:	Tkáňový inhibitor metaloproteináz 2 – kontrolы, preeklampsie, HELLP sy

11. Literatura

1. Althaus, J., Blakemore, K.: Fetomaternal alloimmune trombocytopenia. The questions that still remains. J Mater Fetal Neon Med, 2007, 9, s. 633
2. Aslan, H., Gul, A., Cebeci, A.: Neonatal outcome in pregnancies after preterm delivery for HELLP syndrome. Gynecol Obstet Invest, 2004, 58, s. 96-99
3. Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R.: Pathology of the human placenta. 5th ed., Springer New York, 2006
4. Berkowitz, R., Bussel, J., et al.: Alloimmune trombocytopenia. State of the art 2006. Amer J Obstet Gynecol, 2006, 195, s. 907-13
5. Bick, RL.: Syndromes of disseminated intravascular coagulation in obstetrics, pregnancy and gynecology. Objective criteria for diagnosis and management. Hematol Oncol Clin North Am, 2000, 14, s. 999-1044
6. Binder, T., Salaj, P., Vavřínková, B.: Hematologické nemoci a poruchy v porodnictví a gynekologii. Triton s.r.o., 2004
7. Blann, A.D.: Assessment of endothelial dysfunction: Focus on atherothrombotic disease. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis, 2005, Vol.34, ISSN 1424-8832
8. Boffa, MC., Valsecchi, L., Fausto, A.: Predictive value of plasma thrombomodulin in preeclampsia and gestational hypertension. Tromb Haemost, 1998, 79, s. 1092-1095
9. Bolton, P., Chalmers, E., et al.: A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. Br J Hematol, 135, s. 603-633
10. Bremme, K., Ostlund, E., Almquist, I.: Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in the normal pregnancy and the puerperium. Obstet Gynecol, 1992, 80, s. 132-137
11. Brenner, B.: Haemostatic changes in pregnancy. Thrombosis Research, 2004, 114, s. 409-414
12. Bretelle, F., Sabatier, F., Desprez, et al.: Circulating microparticles - a marker of procoagulant state in normal pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. Tromb Haemost, 2003, 89, s. 486-492

13. Bronisz, A., Rosc, D., Bronisz, M., Szymanski, W., Junik, R.: Coagulation and fibrinolysis variables in pregnant women with type 1 diabetes mellitus. *Med Sci Monit.*, 2008, Nov, 14, 11, s. 574-9
14. Brosens, IA., Robertson, WB., Dixon, HG.: The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology Annual*, s. 177-91
15. Redman, CW.: *Placenta*, 1991, 12, s. 301
16. Caniggia, I., Winter, JL.: Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001: hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies—a review. *Placenta*, 2002, 23(suppl A), s. 47- 57
17. Caterina, R., Libby, P.: *Endothelial dysfunctions and vascular disease*. Blackwell Publishing, 2007, ISBN: 978-1-4051-2208-5, s. 3-25
18. Čech, E., Hájek, Z., a kol.: *Porodnictví 2. přepracované vydání*, Grada Publishing a.s., 2006, s. 271 -279
19. Detti, L., Mecacci, F., Piccioli, A., et al.: Postpartum heparin therapy for patients with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) is associated with significant hemorrhagic complications. *J Perinatol*, 2005, 25, s. 236-240
20. Ellison, J., Sattar, N., Greer, I.: HELLP syndrome: mechanism and management. *Hosp Med*, 1999, 60, s. 243-249
21. Ertan, AK., Wagner, S., Hendrik, HJ., et al.: Clinical and biophysical aspects of HELLP syndrom. *J Perinat Med*, 2002, 30, s. 483-489
22. Ferris, TF.: Pregnancy, preeclampsia and the endothelial cell. *N Engl J Med*, 1991, 325, s. 1439-1440
23. Fischer, T., Schneider, MP., Schobel, H., et al.: Vascular reactivity in patients with preeclampsia and HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome.
24. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., et al.: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 2000, 182, s. 41-49

25. Franchi, F., Biguzzi, E., Cetin, I., et al.: Mutations in the thrombomodulin and endothelial protein C receptor genes in women with late fetal loss. *Br J Haematol*, 2001, 114, 3, s. 641-6
26. Freire-de-Lima, CG., Xiao, YQ., Gardai, SJ., et al.: Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem*, 2006, 281, s. 38376-38384
27. Friedman, SA., Schiff, E., Emeis, JJ., et al.: Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172, s. 202-3
28. Geary, M.: The HELLP syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997, 104, s. 887-891
29. Genbacev, O., Powlin, S.S., Miller, R.K.: Regulation of human extravillous trophoblast (EVT) cell differentiation and proliferation in vitro. Role of epidermal growth factor (EGF). *Troph. Res*, 1994, 8, s. 427-442
30. Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, CH., et al.: Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97, 2, s. 540-550
31. Gonzáles-Quintero, VH., Jiménez, JJ., Jy, W., et al.: Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189, s. 589-93
32. Goswami, D., Tannetta, DS., Magee, LA., et al.: Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 2006, 27, s. 56-61
33. Gul, A., Cebeci, A., Aslan, H., et al.: Perinatal outcomes in severe preeclampsia-eclampsia with and without HELLP syndrome. *Gynecol Obstet Invest*, 2005, 59, s. 113-118
34. Gupta, AK., Rusterholz, C., Huppertz, B., et al.: A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast microparticles preparations on endothelial cells. *Placenta*, 2005, 26, s. 59-66
35. Halligan, A., Bonnar, J., Sheppard, B., et al.: Hemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994, 101, s. 488-92

36. Haram, K., Svendsen, E., Abildgaard, U.: The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC Pregnancy Childbirth, 2009, 26, 9, s. 8
37. Haram, K., Svendsen, E., Abildgaard, U.: The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC Pregnancy Childbirth, 2009, 26, 9, s. 8 <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/9/8>
38. Heitner, JC., Koya, C., Kreutzer, M., et al.: Differentiation of HELLP patients from healthy pregnant women by proteome analysis—On the way towards a clinical marker set. Journal of Chromatography B, 2006, 840, 1, s. 10-19
39. Hoffbrand, AV., Catovsky, D., Tuddenham, EGD.: Postgraduate Hematology. Blackwell Publishing, 2005, s. 787-792
40. Holmes, VA., Wallace, JMW.: Haemostasis in normal pregnancy - a balancing act? Biochemical Society Transactions, 2005, 33, 2, s. 428-432
41. Huhle, G., Geberth, M.: Management of heparin – associated thrombocytopenia in Pregnancy with subcutaneous r-Hirudin. Gynecologic and obstetric investigation, 2000, 49, 1, s. 67
42. Hunt, BJ., Missfelder-Lobos, H., Parra-Cordero, M., et al.: Pregnancy outcome and fibrinolytic, endothelial and coagulation markers in women undergoing uterine artery. Doppler screening at 23 weeks. J Tromb Haemost, 2009, 7, s. 955-61
43. Huppertz, B., Frank, HG., Kingdom, JC., et al.: Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. Histochem Cell Biol, 1998, 110, s. 495-508
44. Huppertz, B., Kingdom, JC.: Apoptosis in the trophoblast-role of apoptosis in placental morphogenesis. J Soc Gynecol Investig, 2004, 11, s. 353-362
45. Huppertz, B., Sammar, M., Chefetz, I.: Longitudinal determination of serum PP13 during development of preeclampsia. Fetal Diagn Therapy,
46. Huppertz, B.: Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension, 2008, 51, s. 970-975
47. Chun L., Kee-Hak L., Karumanchi: Circulating Angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia, Hypertension, 2005, 46, s. 1077-1085

48. Ikle, FA.: Trophoblastzellen im stromenden Blut. Schweiz Med Wochenschr, 1964, 91, s. 934-945
49. Ishii, A., Yamada R., Hamada, H.: t-PA activity in peripheral blood obtained from pregnant women. J Perinat Med, 1994, 22, s. 113-117
50. Jauniaux, E., Watson, AL., Hempstock, J., et al.: Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol, 2000, 157, s. 2111-2122
51. Johansen, M., Redman, CW., Wilkins, T., Sargent, IL.: Trophoblast deportation in human pregnancy-its relevance for pre-eclampsia. Placenta, 1999, 20, s.531-539
52. Duckitt, K., Harrington, D., Dekker GA.: Risk factors for preeclampsia. BMJ 330, 565 (2005). Clin Obstet Gynecol, 1999, 42, s. 422-435
53. Karumanchi, SA., Bdolah, Y.: Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the „chicken and egg“ question. Endocrinology, 2004, 145, s. 4835-4837
54. Karumanchi, SA., Maynard, SE., Stillman, IE., et al.: Preeclampsia: a renal perspective. Kidney Int, 2005, 67, s. 2101-2113
55. Katz, VL., Watson, WJ., Thorp, JM. Jr., et al.: Treatment of persistent postpartum HELLP syndrome with plasmapheresis. Am J Perinatol, 1992, 9, s. 120-122
56. Katz, VL., Watson, WJ., Thorp, JM. Jr., et al.: Treatment of persistent postpartum HELLP syndrome with plasmapheresis. Am J Perinatol, 1992, 9, s. 120-122
57. Khong, TY., DeWolf, F., Robertson, WB. et al.: Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and by small-for-gestational age infants, Br J Obstet Gynaecol, 1986, 93, s. 1049-1059
58. Knapen, MF., Mulder, TP., Bisseling, JG., et al.: Plasma glutathione S-transferase alpha 1-1: amore sensitive marker for hepatocellular damage than serum alanine aminotransferase in hypertensive disorders of pregnancy. Am J Obstet Gynecol, 1998, 178, s. 161-165
59. Knight, M., Redman, CW., Linton, EA., Sargent, IL.: Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. Br J Obstet Gynaecol, 1998, 105, s. 632-640

60. Krysko, DV., D'Herde, K., Vandenabeele, P.: Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*, 2006, 11, s. 1709-1726
61. Kvasnička, J.: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Grada Publishing, 2003, ISBN 80-7169-993-4, s. 40-65
62. Levy, J., Murphy, L., et al.: Trombocytopenia in pregnancy. *JABFP*, 2002, 15, s. 4
63. Magann, EF., Martin, JN.Jr.: Twelve steps to optimal management of HELLP syndrome. *Clin Obstet Gynecol*, 1999, 42, s. 532-550
64. Magriples, U., Hsu, CD., Chan, DW., et al.: Circulating thrombomodulin levels and clinical correlates in pregnant diabetics. *Am J Perinatol.*, 1997, 14 (10), s. 605-8
65. Many, A., Hubel, CA., Roberts, JM.: Hyperuricemia and xantine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol*, 174, 1996, s. 288-297
66. Marchand, A., Galen, RS., Van, LF.: The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. *JAMA*, 1980, 243, s. 1909-1911
67. Martin, JN.Jr, Files, JC., Blake, PG., et al.: Plasma exchange for preeclampsia. I. Postpartum use for persistently severe preeclampsia-eclampsia with HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 162, s. 128-37
68. Martin, JN. Jr., Files, JC., Blake, PG., et al.: Plasma exchange for preeclampsia. I. Postpartum use for persistently severe preeclampsia-eclampsia with HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 162, s. 128-37
69. Minkami, H., Kohmura, Y., et al.: Relation between gestational trombocytopenia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count. *Gynecologic and obstetric investigation*, 1998, 46, 1, s. 41
70. Nicolaides, K H., Bindra, R., Turan, OM., et al.: A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2006, 27, s.13-17
71. Ny, T., Wahlberg, P., Brändström, IJ.: Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix

- metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 22, 187, 1-2, s. 29-38, Review
72. Osmanagaoglu, MA., Erdogan, I., Zengin, U., Bozkaya, H.: Comparison between HELLP syndrome, chronic hypertension, and superimposed preeclampsia on chronic hypertension without HELLP syndrome. *J Perinat Med*, 2004, 32, s. 481-485
 73. Page, EW.: The relation between the hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1939, 37, s. 291-3
 74. Paidas, M., Thong, S., et al.: Unmasking the many face of maternal and fetal thrombocytopenia. *Contemporary OB/GYN*, September, 2006
 75. Palei, AC., Sandrim, VC., Cavalli, RC., Tanus-Santos, JE.: Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem.*, 2008, 41 (10-11), s. 875-80
 76. Pecka, M.: Laboratorní hematologie v přehledu- Fyziologie a patofyziologie hemostázy, 2004, ISBN 80-86682-03-X, s.22-24, s. 87-97, s. 113-118
 77. Pilalis, A., Souka, AP., Antsaklis, P., et al.: Screening for pre-eclampsia and small for gestational age fetuses at the 11–14 weeks scan by uterine artery Dopplers. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2007, 86, 5, s. 530-534
 78. Pilka, R., Hrachovec, P.: Matrix metaloproteinázy a menstruace. *Česká gynekologie*, 2003, 68, s. 36-40
 79. Poldre, PA.: Haptoglobin helps diagnose the HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, 157, s. 1267
 80. Poon, LC., Nekrasova, E., Anastopoulos P., et al.: First trimester serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 2009, 29(6), s. 553-9
 81. Poon, LCY., Karagiannis, G., Leal, A., et al.: Hypertensive disorders in pregnancy: screening by uterine artery Doppler imaging and blood pressure at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009, 34, s. 497–502
 82. Pritchard, JA., Ratnoff, OD., Vosburgh, GJ., et al.: Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. *N Engl. J Med*, 1950, 150, s. 89-98

83. Raffaetto, JD., Khalil, RA.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.*, 2008, 15, 75, 2, s.346-59, Epub 2007 Jul 7. Review
84. Rajakumar, A., Whitelock, KA., Weissfeld, LA., et al.: Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2[alpha], in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod.*, 2001, 64, s. 499–506
85. Reck, T., Bussenius-Kammerer, M., Ott, R., et al.: Surgical treatment of HELLP syndrome-associated liver rupture - an update. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2001, 99, 1, s. 57-65
86. Redman, CW., Bonnar, J., Beilin, L.: Early platelet consumption in pre-eclampsia. *Br Med J*, 1978, 1, s. 467-469
87. Roberts, JM., Lain, KY.: Recent insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta*, 2002, 23, s. 359-72
88. Roberts, JM., Taylor, RN., Musci, TJ., et al.: Preeclampsia: an endothelial disorder. *Am J Obstet Gynecol.*, 1989, 161, s. 1200-1204
89. Romero, R., Kusanovic, JP., Than, NG., et al.: First-trimester maternal serum PP13 in the risk assessment for preeclampsia. *Amer J Obstet Gynecol*, 199, 2, s. 122e1-122e11
90. Savvidou, MD., Yu, CK., Harland, LC., et al.: Maternal serum concentration of soluble fms-like trosine kinase 1 and vascular endothelial growth factor in women with abnormal uterine artery Doppler and in those with fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.*, 2006, 195, s. 1668-1673
91. Shaarawy, M., Didy, HE.: Thrombomodulin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and fibronectin as biomarkers of endothelial damage in preeclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet Nov*, 55, 2, s.135-9
92. Sibai, BM., Ramadan, MK., Usta, ISM.: Maternal Morbidity and Mortality in 442 Pregnancies With Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets (HELLP Syndrome). *Am J Obstet Gynecol*, 1993, 169, 4, s. 1000-1006
93. Sibai, BM.: Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 2004, 103, p. 981

94. Smith, GC., Crossley, JA., Aitken, DA., et al.: Circulating angiogenic factor in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol.*, 2007, 109, s. 1316-1324
95. Soleymanlou, N., Jurisica, I., Nevo, O., et al.: Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90, s. 4299–4308
96. Stirling, Y., Woolf, L., North, WR., et al.: Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost*, 1984, 52, s. 176-182
97. Stojanovic, N., Lewandowski, K., Salata, I., et al.: Serum levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors in women with glucose intolerance in pregnancy and normal controls. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 12, s. 1-7
98. Stubbs, TM., Lazarchick, J., Van Dorsten, JP., et al.: Evidence of accelerated platelet production and consumption in nonthrombocytopenic preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1986, 155, s.63-265
99. Suri, V., Aggarwal, N., et al.: Maternal and perinatal outcome in idiopathic thrombocytopenic purpura with pregnancy. *Acta obstetrica et gynecologica*, 2006, 85, s. 1430-1435
100. Sziller, I., Hupuczi, P., Normand, N., et al.: Fas (TNFRSF6) gene polymorphism in pregnant women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets and in their neonates. *Obstet Gynecol*, 2006, 107, 3, s. 582-7
101. Šimetka, O., Brychtová, P., Procházková, J., et al.: Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP = Changes of endothelium activation in HELLP syndrome. *Gynekolog*, 2008, 17, 2, s. 54-56
102. Šimetka, O., Brychtová, P., Procházková, J., Procházka, M.: Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP. *Gynekolog*, 2008, 2, s. 48-53
103. Štípek, S., Měchurová, A.: Úloha cévního endotelu a reaktivních forem kyslíku a dusíku v patogenezi preeklampsie. *Čes Gynek.*, 63, 1998, 2, s. 121-129
104. Štípek, S.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Avicenum, 2000, s. 314

105. Taylor, FBJ., Toh ,CH., Hoots, WK., et al.: Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, 2001, 86, s. 1327-1330
106. Taylor, FBJ., Toh, CH., Hoots, WK., et al.: Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, 2001, 86, s. 1327-1330
107. Toth, B.: Mikropartikel in der Frauenheilkunde. *Hämostaseologie*, 2009, 29, s. 46-50
108. VanWijk, MJ., Svedas, E., Boer, K., et al.: Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 187, s. 1686-1693
109. Vinnars, MT., Wijnaendts, LC., Westgren, M., et al.: Severe Preeclampsia With and Without HELLP Differ With Regard to Placental Pathology. *Hypertension*, 51, 5, s. 1295-1299
110. Wilke, G., Rath, W., Schutz, E., et al.: Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. *Int J Gynaecol Obstet*, 1992, 39, s. 29-34
111. Wilkström, A-K., Nash, P., Ericsson, UJ., et al.: Evidence of increased oxidative stress and change in the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) – 1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 201, s. 597-8

12. Příloha

12.1. PUBLIKACE A PŘEDNÁŠKY K TÉMATU VĚDECKÉ PRÁCE

a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s impact faktorem

-

b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Šimetka O., Michalec I., Zewdiova H., Kolářová R., Procházková J., Procházka M. Průběh a výsledky 34 těhotenství komplikovaných syndromem HELLP, Česká gynekologie – přijato do tisku
2. Procházková J., Pilka R., Měchurová A., Šimetka O., Brychtová P., Procházka M. Markery aktivace endoteliálních buněk – možnosti jejich vyšetření a klinický význam v gynekologii a porodnictví., Čes. Gynek. 2009, 74, č. 4, s. 279-281, ISSN 1210-7832
3. Procházková J., Dhaifallah I., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušský M., Procházka M. Monitorování hladin markerů aktivace endotelu během fyziologické gravidity, , Čes. Gynek. 2010, č. 2, ISSN 1210-7832

c) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Brychtová, P., Šimetka O., Procházková, J. et al. Trombocytopenie v graviditě. Gynekolog, 2009, Roč. 18, č. 1, s. 22-24. ISSN 1210-1133
2. Procházková J., Pilka R., Měchurová A., Šimetka O. et al. Markery aktivace endoteliálních buněk - možnosti jejich vyšetření a klinický význam v gynekologii a porodnictví. Česká gynekologie. 2009, roč. 74, č. 1, s. 279-281. ISSN 1210-7832.

3. Šimetka O, Brychtová P, Procházková J, Procházka M. Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP. Gynekolog. Roč. 17, č. 2 (2008), s. 54-56 ISSN 1210-1133

d) Publikovaná abstrakta

1. Procházková, J., Dhaifallah, I., Měchurová, A., Pilka, R., Šimetka, O., Slavík, L., Úlehlová, J., Ľubušký, M., Procházka, M.: Markery aktivace endotelu během fyziologické gravidity, preeklampsie, u těhotenství při chronické hypertenzi a u diabetiček. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
2. Procházka, M., Procházková, J., Měchurová, A., Pilka, R., Šimetka, O., Slavík, L., Úlehlová, J., Ľubušký, M.: Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
3. Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Šimetka O., Měchurová A., Markers of endothelial activation in high risk pregnancies, Placenta, 2009, Vol. 30. Issue 9, ISSN 0143-4004
4. Procházka M., Procházková J., Pilka R., Slavík L., Švehlova, Měchurová A., Šimetka O: The significance of endothelial markers activation in the prediction of subsequent development of preeclampsia. (XXII. Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston, USA, 11-16 July 2009). Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009, vol. 7, no. S2 , p. 752. ISSN 1538-7933.
5. Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Procházka M., Pilka R., Dhaifalah I., Měchurová A., Šimetka O. Markers of endothelial activation in the prediction of subsequent development of preeclampsia, 8th World Congress in Fetal Medicine, Portofino 28th June – 2th July
6. Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Pilka R., Měchurová A., Šimetka O. Markery aktivace endotelu u rizikových těhotenství, Trombóza a hemostáza 2009, sborník abstrakt, str.84, ISBN 978-80-86703-32-9.

e) Přednášky/postery přednesené uchazečem na veřejných odborných fórech

- Šimetka O., Procházka M., Brychtová P., Procházková J., Úlehlová J., A. Měchurová, L. Slavík, Markery aktivace endotelu u pacientek se syndromem HELLP, XXVI. celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
- Šimetka O., Zewdiová H., Michalec I., Průběh 34 těhotenství komplikovaných syndromem HELLP, Moravská konference fetomaternální medicíny, 20. listopadu 2009, Olomouc
- Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Pilka R., Měchurová A., Šimetka O. Markery aktivace endotelu u rizikových těhotenství., Česko-slovenská konference o hemostáze a trombóze s mezinárodní účastí, 21. - 23. května 2009, Hradec Králové
- Procházka M., Šimetka O., Procházková J., Úlehlová J., Měchurová A., Slavík L., Pilka R., Význam markerů aktivace endotelu v predikci preeklampsie, XXVI. celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
- J.Gumulec, O.Šimetka, D.Klodová, P.Kessler, M.Brejcha, M.Wróbel, M.Penka, P.Klement, Trombocytopenie v graviditě, XV. Slovensko-česká konference o hemostáze a trombóze s mezinárodní účastí, Martin 2.-24.5.2008
- J.Gumulec, O.Šimetka, D.Klodová, P.Kessler, M.Brejcha, M.Wróbel, M.Penka, P.Klement, Trombocytopenie v graviditě, XIV. Pařížkovy dny, Nový Jičín, 10-11.4.2008
- J. Gumulec, O. Šimetka, D. Klodová: Diferenciální diagnostika trombocytopenie v porodnictví, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.-8. 6. 2008
- Šimetka O, Michalec I, HELLP! Help, please!, XXV. Celostátní konference sekce perinatální medicíny, 9-11.4.2008, Litoměřice

12.2. PUBLIKACE A PŘEDNÁŠKY MIMO TÉMA VĚDECKÉ PRÁCE

a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s impact faktorem

1. Šimetka, O, Procházka, M, Zade SH, et al., Abortion induced by a foreign body with artificial perforation of the uterus, followed by sepsis, coma, necrosis of the uterus and hysterectomy. A case report. Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology, Volume: 49 (2009), 3, pp. 337-338
2. Klát J., Ševčík L., Šimetka O., Gráf P., Waloschek T., Kraft O., Jaluvkova Z., Prochazka M., Characteristics of sentinel lymph nodes' metastatic involvement in early stage of vulvar cancer, Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology, Volume: 49 (2009), 6, pp. 672-676

b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Šimetka O., Pětroš M., Podešvová H. Prevence časně formy onemocnění novorozenců streptokoky skupiny B: neonatální outcome po zavedení doporučeného postupu, Česká gynekologie – in print

c) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Šimetka O. Zmenšující (destruktivní) operace. Moderní gynekologie a porodnictví. 2009, roč. 18, č. 3 , s. 285-289. ISSN 1211-1058.
2. Šimetka O. Vakuumextrakce. Moderní gynekologie a porodnictví. 2009, roč. 18, č. 3 , s. 257-265. ISSN 1211-1058.
3. Šimetka O. Neúspěšný domácí porod hydrocefalického plodu v poloze koncem pánevním a jeho následky, Česká gynekologie. Roč. 73, č. 4 (2008), s. 260-262

4. Šimetka, O. Císařský řez v primitivních podmínkách rozvojových zemí, Moderní gynekologie a porodnictví, ISSN časopisu: 1211-1058, Roč. 17, č. 1 (2008), s. 100-106
5. Šimetka O. Medikamentózní potrat v prvním trimestru – komentář, Gynekologie po promoci, č. 4 (2008), s. 26-28
6. Šimetka O. Porodnické operace a jejich technika v primitivních podmínkách rozvojových zemí. Porodnické operace. S. 351-370. - Praha : Grada Publishing, 2007 (kapitola v odborné knize)
7. Šimetka O, Koliba P, Seget'a J, Bošota J. Role zevního obratu ve vedení porodu plodu v poloze podélné kocem pánevním. Gynekolog. Roč. 13, č. 5 (2004), s.209-211
8. Hrankay H, Šimetka O. Heterotopická gravidita po IVF s nálezem intersticiální gravidity po předchozí salpingektomii pro tubární graviditu, Gynekolog. Roč. 17, č. 1 (2008), s. 16-17
9. Hrankay H, Šimetka O, Kula R. Tuberózní skleróza u novorozence jako nově vzniklá mutace. Gynekolog. Roč. 16, č. 3 (2007), s. 110-111
10. Petzel M, Koliba P, Šimetka O. Hormonální substituční terapie u rizikových neokogynekologických pacientek. Praktická gynekologie. Roč. 9, č. 4 (2005), s. 26-28

d) Publikovaná abstrakta

1. Pětroš, M., Liška, M., Matura, D., Šimetka, O., Ľubušký, M.: Longitudinální hodnocení maximálních průtokových rychlostí v arteria cerebri media při diagnostice fetální anémie, XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny. Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
2. Procházka, M., Procházková, J., Měchurová, A., Pilka, R., Šimetka, O., Slavík, L., Úlehlová, J., Ľubušký, M.: Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print

3. Šimetka, O., Špaček, R., Michalec, I.: Indukce abortu ve II. trimestru s použitím misoprostolu. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
4. Ľubušký, M., Šimetka, O., Studničková, M., Procházka, M., Ordeltová, M., Vomáčková, K.: Fetomaternální gemoragie při vaginálním porodu. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
5. Ľubušký, M., Procházka, M., Šimetka, O., Holusková, I.: Doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
6. Ľubušký, M., Šimetka, O., Studničková, M., Procházka, M., Ordeltová, M., Vomáčková, K.: Fetomaternální hemoragie při porodu císařským řezem. XXVII. celostátní konference sekce perinatální medicíny, Luhačovice, 14.-16.4.2010 – Česká gynekologie – in print
7. Šimetka O., Pětroš M., Sklienka P. et al. Prolongation of pregnancy from 25th to 28th week of gestation on behalf of the fetus in a woman who sustained brain death - a case report. (Abstracts of XIX FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, Cape Town, South Africa, 04-09 October 2009). International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2009, vol. 107, no. Suppl.2 , p. S518-S519. ISSN 0020-7292.
8. Šimetka O, S. Huseyn-Zade, and J. Revilla: Completing abortion safely – how ‘little’ is needed to save lives, The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care, Volume 13, Issue S2 2008 , pages 22 – 46
9. Zapletalová O., Hradílek P., Woznicová I., Petzel M, Šimetka O. Outcome of pregnancy in MS patients - child's point of view. (25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, 9-12 September 2009, Düsseldorf, Germany). Multiple Sclerosis. 2009, vol. 15, no. Suppl.2 , p. S38-S39. ISSN 1352-4585.
10. Pětroš M., Koliba P., Seget'a J., Šimetka O., Paučin J.: Naše zkušenosti s prevencí GBS – analýza klinického materiálu. Sborník abstrakt XIII. Kongresu SGPS 8.-10.6.2006, Trstená

11. Hrankay H., Koliba P., Matura D., Šimetka O., Szabová O.: Význam podávání antibiotik u předčasného porodu. Sborník abstrakt XIII. Kongresu SGPS 8.-10.6.2006, Trstená
12. Szabová O., Koliba P., Hrankay H., Pětroš M., Šimetka O.: Kortikoterapie u předčasného porodu - výhody a rizika. Sborník abstrakt XIII. Kongresu SGPS 8.-10.6.2006, Trstená

e) Přednášky/postery přednesené uchazečem na veřejných odborných fórech

1. Šimetka O, Michalec I, Matura D. et al., Analýza operačních vaginálních porodů v letech 2005-2008, XVI. Kongres Slovenskej gynekologicko-porodnickej spoločnosti SLS s medzinárodnou účasťou, Bratislava, 21.-23.5.2009
2. Šimetka O., Vesiko-rekto-vaginální píštěle jako důsledek nedostupné porodnické péče v rozvojových zemích, XXVI. celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
3. Šimetka O., Vakuumextrakce, XXVI. celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
4. Šimetka O., Michalec I., Špaček R., Matura D., Vakuumextrakce - analýza výsledků metody ve FNO, XXVI. celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
5. Šimetka O., Vakuumextrakce, benefit a rizika, Moravská konference fetomaternální medicíny, 20. listopadu 2009, Olomouc
6. Michalec I., Šimetka O., Poruchy statiky pánevního dna v souvislosti s vaginálním porodem, Moravská konference fetomaternální medicíny, 20. listopadu 2009, Olomouc
7. Ševčík L., Klát J., Šimetka O., Jalůvková Z., Gráf P., Karcinom děložního hrdla v graviditě, Celostátní konference ČGPS a ČLS JEP, Brno 2009
8. Pětroš M., Kuldanová E., Matura D., Šimetka O., Dvouleté zkušenosti s neinvazivním managementem inkompatibility v krevních systémech matky a plodu., Celostátní konference ČGPS a ČLS JEP, Brno 2009
9. Michalec I., Šimetka O., Špaček R., Matura D., Pětroš M., Rozbor postpartálních hysterektomií ve FN Ostrava v letech 2004 - 2008, XXVI.

- celostátní konference sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, 22.-24.4.2009, Ostrava
10. Šimetka O., S. Huseyn-Zade, and J. Revilla: Completing abortion safely – how ‘little’ is needed to save lives: 10TH CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CONTRACEPTION, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, APRIL 30 - MAY 3, 2008
 11. J. Klát, L. Ševčík, O. Šimetka, P. Gráf, T. Waloschek, O. Kraft SENTINEL LYMPH NODE DETECTION IN PATIENTS WITH EARLY-STAGE VULVAR CANCER, The 12th Biennial Meeting, Internation Gynecologic Cancer Society, 25-28 October, Bangkok, Thailand
 12. L. Ševčík, O. Šimetka, H. Podešvová, J. Klát, P. Gráf, Z. Jalůvková, T. Waloschek, O. Kraft, NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY AND CESAREAN SECTION FOLLOWED BY RADICAL SURGERY IN LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER DURING PREGNANCY, The 12th Biennial Meeting, Internation Gynecologic Cancer Society, 25-28 October, Bangkok, Thailand
 13. J. Gumulec, O. Šimetka, D. Klodová: Diferenciální diagnostika trombocytopenie v porodnictví, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.–8. 6. 2008
 14. V. Procházka, O. Šimetka, J. Seget'a: Možnosti spolupráce porodníka a radiologa při řešení závažných porodnických komplikací – embolizace uterinních arterií, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.–8. 6. 2008
 15. Michalec, R. Andělová, L. Ševčík, O. Šimetka: Ruptura děložního rohu – heterotopická nidace po IVF a ET, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.–8. 6. 2008
 16. Šimetka O, Michalec I., Matura D, Czudková K., Vakuumentraktor – porodníkův přítel, XXV. Celostátní konference sekce perinatální medicíny, 9-11.4.2008, Litoměřice

17. Matura D., Czudková K., Pětroš M., Šimetka O., Špaček R., Je skutečně nutno ukončit graviditu diabetičky do 40+0?, XXV. Celostátní konference sekce perinatální medicíny, 9-11.4.2008, Litoměřice
18. Šimetka O., Septický abort – tragický úděl žen v rozvojovém světě, XXV. Celostátní konference sekce perinatální medicíny, 9-11.4.2008, Litoměřice
19. Šimetka O. Malárie jako rizikový faktor nízké porodní hmotnosti, 1. Celostátní konferenci Sekce infekčních nemocí v gynekologii a porodnictví ČGPS ČLS JEP, Praha, 2008
20. Šimetka O.: Septický abort – uděl žen v rozvojovém světě s nedostatečnou dostupností zdravotnické péče (kazuistika), Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.–8. 6. 2008
21. Šimetka O, O. Szabová, K. Czudková, M. Pětroš, D. Matura: Analýza vícečetných těhotenství v Moravskoslezském regionu v roce 2006, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP a Sdružení soukromých gynekologů ČR, Seminář porodních asistentek, Hradec Králové 6.–8. 6. 2008
22. Šimetka O: Kontrola závažného poporodního krvácení pohledem porodníka, Multioborový seminář: Kontrola závažného poporodního krvácení – multioborový pohled, hotel Atom, Ostrava, 8.10.2008
23. Šimetka O, Beneš P.: Kasuistiky závažného poporodního krvácení, Multioborový seminář: Kontrola závažného poporodního krvácení – multioborový pohled, hotel Atom, Ostrava, 8.10.2008
24. Šimetka O., Beneš P.: Návrh modelu krizového plánu pro pracoviště, Multioborový seminář: Kontrola závažného poporodního krvácení – multioborový pohled, hotel Atom, Ostrava, 8.10.2008
25. Šimetka O: Medikamentózní potrat, Ostravský spolek lékařů, Hotel Atom
26. Šimetka O: Vakuumextrakce, vnitřní seminář Ústavu pro matku a dítě, Praha, prosinec 2008
27. Šimetka O.: Porodnictví v podmínkách rozvojových zemí, Regionální setkání porodníků kraje Vysočina, Jihlava
28. Šimetka O.: Audit perinatální péče v Moravskoslezském regionu za rok 2007, Havířov, setkání regionálních perinatologů, 14.5.2008

29. Šimetka O.: Vakuumextrakce – technika, trendy, evidence based medicine, Havířov, setkání regionálních perinatologů, 14.5.2008
30. Šimetka O: Porodnické operace, celostátní setkání mladých gynekologů ENTOG, Havlíčkův Brod, 2008

13. Anglický název práce, anglická klíčová slova

13.1. English title

HELLP syndrome and markers of endothelial activation

13.2. Key words

Endothelium, activation, pregnancy, preeclampsia, HELLP syndrome, thrombomodulin