**Prediktivní význam markerů aktivace endotelu**

**u těhotných s trombofilními stavy**

**Dizertační práce**

**MUDr. Jana Procházková**

**Hemato-onkologická klinika**

**FN a LF UP Olomouc**

**Školitel: Prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.**

**Olomouc, 2013**

**Prediktivní význam markerů aktivace endotelu**

**u těhotných s trombofilními stavy**

**Klíčová slova:** endotel, těhotenství, aktivace, preeklampsie, trombofilie

**The predictive value of markers of endothelial activation in pregnant women with thrombophilia**

**Key words:** endothelium, pregnancy, activation, preeclampsia, thrombophilia

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Karla Indráka, DrSc. Všechny použité literární a odborné zdroje jsem řádně ocitovala a uvedla v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 4.3.2013 ……………………………

Děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a lidský přístup během práce na této dizertační práci.

Děkuji doc. Věře Krčové, CSc., Mgr. Luďkovi Slavíkovi, Ph.D., Mgr. Janě Úlehlové, MUDr. Antonínovi Hlušímu, Ph.D. a všem kolegům z Hemato – onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc za pomoc během zpracování mé dizertační práce.

V neposlední řadě děkuji za všestrannou podporu a nezměrnou trpělivost mé rodině.

**Obsah:**

1. Seznam použitých zkratek 8

2. Přehled aktuálního stavu problematiky 10

2.1. Cévní stěna, endotel 10

2.2. Normální funkce endotelu 11

2.3. Aktivace endotelu 12

2.3.1. Role endotelových buněk v regulaci cévního tonu 15

2.3.2. Vliv endotelových buněk na hemostázu 16

2.3.3. Endotelové buňky v regulaci zánětu a remodelaci cév 20

2.3.4. Cévní a tkáňově specifické funkce endoteliálních buněk 20

2.4. Dysfunkce endotelu 21

2.5. Trombofilní stavy a gravidita 26

2.5.1. Změny hemostázy v graviditě 26

2.5.2. Vrozené a získané trombofilní stavy 28

2.5.3. Trombofilie a patologické stavy v graviditě 34

2.6. Preeklampsie a HELLP syndrom 35

2.7. Arteriální hypertenze v graviditě 37

3. Cíle práce 39

4. Vlastní výzkumný projekt 40

4.1. Charakteristika souboru 40

4.1.1. Soubor žen s fyziologickou graviditou 40

4.1.2. Soubor těhotných žen s preexistující hypertenzí 40

4.1.3. Soubor těhotných se syndromem HELLP 40

4.1.4. Soubor žen vyšetřených mimo těhotenství 41

4.2. Odběry, zpracování vzorků a vyšetřovací metody 41

4.3. Laboratorní vyšetření 42

4.3.1. Metodika laboratorních vyšetření 42

4.4. Statistické metody 45

4.5. Výsledky 46

4.5.1. Demografická data 46

4.5.2. Průběh těhotenství 46

4.5.3. Laboratorní výsledky 47

4.5.3.1. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství - soubor žen s fyziologickou graviditou 47

4.5.3.2. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství - soubory žen, u nichž se vyvinula preeklampsie, resp. HELLP syndrom 54

4.5.3.3. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství - soubor chronických hypertoniček 68

4.5.3.4. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu u netěhotných žen - srovnání žen s trombofilním stavem a bez prokázané trombofilie 73

5. Diskuse 76

5.1. Vliv gravidity na systém hemostázy 76

5.1.1. Faktory prokoagulační 76

5.1.2. Faktory antikoagulační 76

5.1.3. Fibrinolýza 77

5.1.4. Endotelové mikropartikule 77

5.1.5. Systém metalloproteináz 77

5.2. Soubory těhotných s preeklampsií a se syndromem HELLP 78

5.3. Soubory těhotných chronických hypertoniček 81

5.4. Soubor netěhotných žen – srovnání markerů aktivace endotelu u žen s trombofilním stavem a bez prokázané trombofilie 81

5.5. Závěr 82

6. Souhrn 84

7. Summary 86

8. Seznam tabulek a grafů 88

9. Literatura 90

10. Přílohy 98

10.1. Dotazník 98

10.2. Informovaný souhlas 99

10.3. Publikace 100

10.3.1. Práce související s tématem dizertační práce 100

Přehledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Přehledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Publikovaná abstrakta

Přednášky na veřejných odborných fórech přednesené autorem práce

10.3.2. Ostatní publikace 106

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Přeledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Kapitoly v monografiích

Publikovaná abstrakta

Přednášky na veřejných odborných fórech přednesené autorem práce

# Seznam použitých zkratek

ACE - angiotenzin konverzující enzym

ADP - adenosindifosfát

ANG II - angiotenzin II

APTT - aktivovaný parciální tromboplastinový čas

AT - antitrombin

cGMP - cyklický guanosinmonofosfát

DIC - diseminovaná intravaskulární koagulopatie

EDRF - endothelium derived relaxing factor

EMP - endotelové mikropartikule

EPCR - endoteliální receptor proteinu C

FDGF - fibroblast derived grow factor

F II - faktor II

F IX - faktor IX

F V - faktor V

F Va - aktivovaný faktor V

F VII - faktor VII

F VIIa - aktivovaný faktor VII

F VIIIa - aktivovaný faktor VIII

F X - faktor X

F Xa - aktivovaný faktor X

F XI - faktor XI

F XII - faktor XII

HELLP - hemolýza (H), elevace jaterních testů (EL - elevation of the liver enzymes), trombocytopenie (LP – low platelets)

ICAM - intercellular adhesive molecules

MMP - metalloproteináza

NO - oxid dusnatý

NOS-III - izoforma III syntetázy oxidu dusnatého

PAI-1 - inhibitor aktivátoru plazmonigenu 1

PAI-2 - inhibitor aktivátoru plazminogenu 2

PAR-1 - proteázami aktivovaný receptor 1

PC - protein C

PDGF - platelet derived grow factor

PGI2 - prostaglandin I2 či prostacyklin

PPP - platelet poor plasma - plazma chudá na destičky

PS - protein S

RFU - fluorescenční jednotka

TAFI - trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy

TF - tkáňový faktor

TFPI - inhibitor cesty tkáňového faktoru

TIMP - tkáňový inhibitor metaloproteinázy

TRM - trombomodulin

TNF α - tumor necrosis alfa

t-PA - tkáňový aktivátor plazminogenu

u-PA - urokinázový aktivátor plazminogenu

VCAM - vascular cell adhesive molecules

vWF - von Willebrandův faktor

WPT - Weibel-Paladeho tělíska

1. **Přehled aktuálního stavu problematiky**
   1. **Cévní stěna, endotel**

Cévní stěna je tvořena endotelovými buňkami, buňkami hladkého svalstva a fibroblasty. Jako první objevil v roce 1661 s pomocí primitivního mikroskopu existenci bariéry mezi krví a tkáněmi Malpighi, který rovněž popsal kapilární spojení mezi drobnými arteriemi a žílami. (1) V roce 1880 popsal von Recklinghausen krevní cévy podobné tunelům, které pronikají hluboko do tkání. (2) Určení podrobné struktury endotelových buněk umožnilo až užití elektronového mikroskopu. Anatomicky je cévní stěna uspořádána do tří vrstev – intima, media a adventicie. Intimu tvoří jedna vrstva endotelových buněk, media je složena z cirkulárně uspořádaných buněk hladkého svalstva a kolagenních vláken, vnější vrstva - adventicie sestává z kolagenních fibril a fibroblastů.

Udržování konstantních reologických vlastností je kontrolováno a ovlivňováno vnitřní tenkou buněčnou výstelkou cirkulačního systému, nazývanou endotel. Endotelové buňky vystýlají celý cévní systém obratlovců a tvoří tak metabolicky velmi aktivní tkáň.

V prenatálním vývoji lze začátek vývoje cév pozorovat již v presomitovém období, tj. asi od 18. dne vývoje embrya. V dalším vývoji se buňky v mezodermu žloutkového váčku a v ductus omphaloentericus začnou zmnožovat a nakupí se do tzv. krevních ostrůvků. Působením fibroblastového růstového faktoru se buňky krevních ostrůvků diferencují v hemangioblasty, společné prekurzory všech krvinek a cév. Z hemangioblastů v centru ostrůvků se vyvíjí hematopoetické kmenové buňky, zatímco  hemangioblasty na povrchu ostrůvků dávají základ budoucím endotelovým buňkám vlivem endotelového růstového faktoru, tyto buňky proliferují pupenovitými výběžky do okolí, až dají vzniknout primitivní cévní síti, z níž se v dalším vývoji vyvinou arterie a vény. (3)

Na většině míst tloušťka endotelu nepřesahuje 0,2 µm. (4,5) V těle dospělého člověka se nachází cca 6 bilionů endotelových buněk, tyto společně tvoří „orgán“, který váží kolem 1 kilogramu a zaujímá plochu dosahující až 5000 m2. (6) Většinu z těchto buněk tvoří mikrovaskulární endotelové buňky  vystýlající povrch kapilár. Na rozdíl od velkých cév je objem krve, která omývá povrch endotelu v kapilárách 100-500krát menší, což usnadňuje výměnu živin a hormonů a dalších působků při kontaktu s velkou plochou endotelového povrchu. V obou typech cévního řečiště se zásadně liší smykové síly vytvářené tokem krve. Výrazné anatomické a funkční rozdíly existují i mezi endotelem v arteriích a žilách – v žilním endotelu je více Weibel-Paladeho tělísek a von Willebrandova faktoru. Tím dochází k rozdílným regulačním mechanismům specifických funkcí a navíc vykazuje endotel různé tkáňově specifické vlastnosti buněčné mikrovaskulatury rozdílných typů cévního řečiště - endotelové buňky tedy nejsou uniformní hmotou, ale mají výraznou orgánovou specifitu. (7) Fenotyp endotelií se liší v závislosti na umístění v jednotlivých orgánech a dokonce i v různých segmentech cév jednoho orgánu. (8) Regulace fenotypu dokonce umožňuje odlišné složení endotelových struktur v jednom místě v různých časových úsecích. (9)

Za fyziologických okolností nejsou endotelové buňky přímo ve styku s proudící krví, ale jsou pokryty vrstvou glykokalyx, což je ochranná vrstva bránící neúčelné aktivaci endotelu. (4)

* 1. **Normální funkce endotelu**

Endotel je vrstva buněk, která byla dlouho považovaná za prostou semipermeabilní membránu, bránící prostupu makromolekul cévní stěnou. Dnes je známo, že buňky endotelu mohou tvořit velké množství biologicky aktivních látek. Endotel je rozsahem tvorby těchto působků, svou plochou a celkovou hmotností **největším autokrinním, parakrinním a endokrinním orgánem lidského organizmu.**

Endotelové buňky jsou vybaveny jednak všeobecnými funkcemi cévní výstelky, avšak navíc v závislosti na jejich lokalizaci můžeme pozorovat i určité specifické vlastnosti. Endotel je extrémně metabolicky aktivní orgán tvořící bariéru mezi krví a tkáněmi a zprostředkovávajícíinterakce mezi komponentami cirkulujícímiv krvi a buňkami hladké svaloviny cév. Endotelové buňky lze 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 organizmus.

Intaktní endotel má za fyziologických podmínek silný inhibiční vliv na krevní srážení prostřednictvím faktorů, které syntetizuje a uvolňuje či exprimuje na svém povrchu. Neporušené endotelové buňky zajišťují rovnováhu trombogenezy a fibrinolýzy a představují tak „první linii“ obrany organismu proti ateroskleróze.Dále zprostředkovávají dostatečný průtok krve cévou pomocí optimální úrovně vazodilatace. Klíčovými produkty endotelových buněk jsou oxid dusnatý, prostacyklin, trombomodulin a inhibitor cesty tkáňového faktoru – TFPI, které v součinnosti s dalšími působky uvolňovanými endotelem nebo cirkulujícími v krvi zajišťují optimální perfúzi tkání. (10)

* 1. **Aktivace endotelu**

Endotelové buňky obsahují na svém povrchu celou řadu receptorů, kterými přijímají jak hemodynamické signály (intenzitu pulzace, proudění a roztažení cévní stěny), tak humorální působky (receptory cytokinů, růstových faktorů, bakteriálních substancí, angiotenzinu II, koagulačních faktorů II, V, IX, X apod.). (11) 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 modulují zánětlivou reakci (migraci a chemotaxi leukocytů, monocytů a makrofágů, fagocytózu a cévní permeabilitu). (11,12) Všechny tyto děje potom hrají klíčovou roli v regulaci buněčného metabolismu a homeostázy.

Produkty endotelových buněk ukazuje tabulka 1.

Tabulka č. 1:  **Produkty endotelových buněk**

Antitrombotický efekt trombomodulin

protein C

protein S

heparin

tkáňový aktivátor plazminogenu

prostacyklin

Protrombotický efekt von Willebrandův faktor

tkáňový faktor

tromboxan

inhibitor aktivátoru plazminogenu

faktor V

Vazodilatace oxid dusnatý

bradykinin

Vazokonstrikce endotelin 1

angiotenzin II

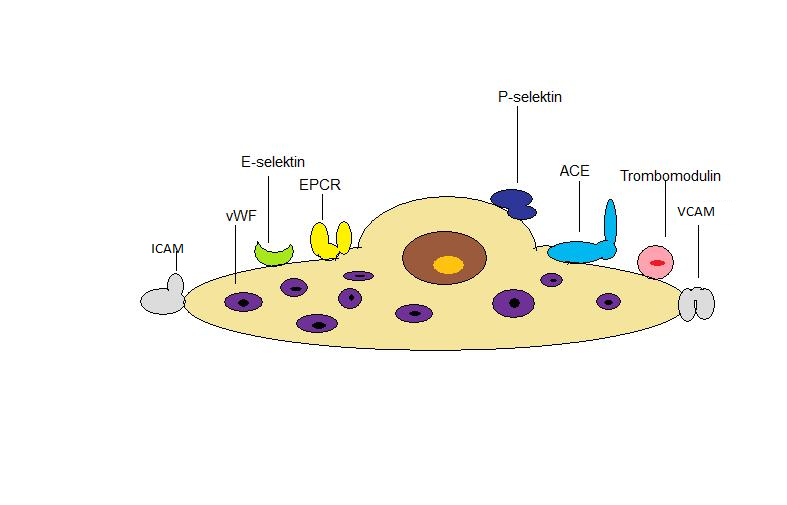
tromboxan A2

Prozánětlivý efekt adhezivní molekuly – VCAM, ICAM, selektin P, selektin E

Růstové faktory PDGF, FGF

Endotelové buňky jsou schopny reagovat během sekund až minut jak na vazoaktivní podněty a působky, tak na trombin nebo TNF α – v závislosti na příčině aktivace (změna napětí cévy, trombotizace, zánět). Tato rychlá odpověď je zprostředkována aktivací jejich buněčných receptorů a signálních drah a zahrnuje jak aktivaci enzymů, které začnou produkovat NO, prostacyklin a v určitých situacích i endotelin -1, tak i přesun nitrobuněčných vezikul (např. Weibel-Paladeho tělísek) s obsahem již vytvořených proteinů k plazmatické membráně a následně uvolnění jejich obsahu (von Willebrandův faktor, P selektin, angiotenzin II). (4)Rychlé uvolňování produktů endotelových buněk při jejich aktivaci trombinem je zprostředkováno tzv. proteázami aktivovanými receptory 1 (PAR-1). (4) Naproti tomu syntéza a sekrece látek ovlivňujících fibrinolýzu (t-PA, PAI-1) je pomalejší.

Obr. č. 1 – **Endotelová buňka (De Caterina, Libby, upraveno)**



* + 1. **Role endotelových buněk v regulaci cévního tonu**

Endotel společně s hladkou svalovinou hrají velmi důležitou roli v kontrole prokrvení tkání a udržení tlaku krve ovlivňováním vazomotoriky. Tato funkce je zprostředkována odpovědí endotelových buněk na vazoaktivní působky a, zejména v plicích, schopnosti endotelu tyto vazoaktivní látky metabolizovat. Hlavní roli v řízení cévního tonu hraje oxid dusnatý (NO či endothelium derived relaxing factor – EDRF), který má silnou vazodilatační aktivitu, působí na buňky hladké svaloviny v cévní stěně a ovlivňuje tak krevní průtok, dále inhibuje agregaci destiček a adhezi leukocytů. (4) Existenci EDRF předpověděli na základě svých experimentů Furchgott a Zawadzki na začátku 80. let 20. století. V roce 1987 pak jeho přesnou chemickou strukturu – oxid dusnatý - identifikovali nezávisle na sobě vědecké týmy Ignarra a Palmera. (13, 14, 15) Oxid dusnatý vzniká konverzí L-argininu na L-citrullin aktivitou enzymu NO syntetázy (NOS). (16) NOS existuje v organismu ve třech izoformách. Izoforma III enzymu NO-syntetázy (NOS-III) neboli endoteliální NOS, byla izolována z endotelových buněk. Endoteliální NOS III je syntetizována konstitutivně v malých množstvích a je klíčová pro udržení konstantního průtoku krve tkáněmi za klidových a fyziologických podmínek. NOS III je aktivována různými podněty a hraje významnou roli v regulaci změn cévního tonu jako odpovědi na nejrůznější podněty, jak mechanické (smykový stres), tak humorální (acetylcholin, Ca ionty, cytokiny). (17) NO vyprodukovaný endotelovými buňkami difunduje k buňkám hladké svaloviny cév, kde aktivuje guanylátcyklázu, která prostřednictvím zvýšené koncentrace cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) navozuje relaxaci hladké cévní svaloviny. (18)

Dalším produktem endotelových buněk s vazodilatačním a antitrombotickým efektem je prostaglandin I2 neboli prostacyklin. Je produkován endotelem z prekurzoru kyseliny arachidonové, jejímž zdrojem jsou fosfolipidy membrány endotelových buněk. Stimulem pro tvorbu prostacyklinu je především trombin spolu s dalšími působky uvolněnými z místa poškození cévní stěny a funkcí prostacyklinu je omezení nadměrného nárůstu trombu a udržení krevního průtoku (11) Naproti tomu endotelové buňky produkují i mediátory s vazonstrikčním efektem – endotelin 1, angiotenzin II a některé prostaglandiny.

Endotelin 1 působí především na buňky hladkého svalstva cév, kde kromě vazokonstrikce způsobuje zvýšenou mitotickou aktivitu a proliferaci těchto buněk. Dalším účinkem endotelinu 1 je stimulace adheze leukocytů, chemotaxe makrofágů a agregace trombocytů. (11)

Nejdůležitějším vazokonstrikčním agens je angiotenzin II, který podléhá přísné lokální regulaci prostřednictvím angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE). Ten je rovněž produkován endotelovými buňkami a exprimován na jejich povrchu. Angiontenzin II řídí početné funkce buněk hladké svaloviny cév jako vazokonstrikci, proliferaci a diferenciaci. ACE rovněž odbourává bradykinin a nepřímo působí i vazodilatačně indukcí tvorby prostacyklinu a oxidu dusnatého. (19) Angiotenzin konvertující enzym a jeho vazokonstrikční produkt angiotenzin II není pouze prostým antagonistou NO, ale rovněž reguluje jeho syntézu prostřednictvím hladiny bradykininu. (20)

**2.3.2. Vliv endotelových buněk na hemostázu**

Endotelové buňky udržují prostřednictvím svých produktů tekutost a konstantní vlastnosti krve. Na jedné straně se v případě poškození cévní stěny podílejí na zastavení krvácení a obnově integrity cévní stěny, na straně druhé brání intaktní endotelové buňky tvorbě trombu. To je umožněno jak aktivní kontrolou extravazace tekutin, hormonů a makromolekul, tak ovlivňováním funkce krevních destiček a dalších buněčných elementů. Vliv endotelu na krevní srážení rovněž spočívá v zajištění odpovídajícího a dostupného množství srážlivých faktorů a trombocytů v místě jejich konzumpce.

Regulace funkce trombocytů

Za normálních okolností nereagují cirkulující trombocyty s intaktním endotelem, jednak z důvodu produkce oxidu dusnatého a prostacyklinu, jednak vlivem konstitutivní syntézy ekto-ADP-ázy. Oxid dusnatý kromě vazodilatace silně inhibuje adhezi, aktivaci, sekreci i agregaci destiček mechanismem závislým na cyklickém guanosinmonofosfátu.

Dalšími mechanismy vedoucími k inhibici aktivace trombocytů je blokace exprese P-selektinu na jejich povrchu a útlum kalcium-senzitivní konformační změny receptoru glykoproteinu IIb/IIIa, která je nezbytná pro navázání fibrinogenu.

Významnou vlastností endotelu ovlivňující funkci trombocytů je rovněž produkce a membránová exprese ekto-ADP-ázy (CD39), která blokuje adenosindifosfát (ADP) - mohutný induktor agregace trombocytů. Tvorba ekto-ADP-ázy je konstitutivní a umožňuje endotelu efektivní rozklad tohoto destičkového agonisty a tím udržování trombocytů v klidovém stavu. (21)

Antikoagulační vlastnosti endotelu

Endotel disponuje nejméně třemi systémy, kterými ovlivňuje hemostázu směrem antikoagulačním –systém heparin-antitrombin, TF-TFPI a trombomodulin – protein C. (1)

Matrix, která obklopuje endotelové buňky, obsahuje heparansulfát a další glykosaminoglykany, které spouštějí aktivitu antitrombinu a v tomto komplexu potom inhibují trombin, F IXa, Xa a XIa. (22, 23) Exprese heparansulfátu a proteoglykanů je ovlivněna  přítomnosti zánětu, což dokládá např. výrazná suprese tohoto systému při sepsi. (5)

Endotel brání nadměrné tvorbě trombinu rovněž expresí inhibitoru cesty tkáňového faktoru – TFPI, který váže aktivovaný faktor X v komplexu TF/FVIIa/FXa. (24,25)

Systém trombomodulinu a proteinu C je nejsložitější. Endotelové buňky syntetizují trombomodulin a exprimují ho na luminálním povrchu v kapilárách, arteriích, žilách i lymfatických cévách většiny orgánů s rozdílnou mírou exprese v závislosti na typu orgánu (prakticky chybí v mozku, největší zastoupení trombomodulinu je v plicích). (7,26) Trombomodulin (TRM) inhibuje trombin, který po navázání do komplexu ztrácí svoji prokoagulační aktivitu a navíc komplex TRM/trombin aktivuje protein C, který po své aktivaci přerušuje koagulační kaskádu inaktivací F Va  a F VIIIa. Dalším receptorem endotelu zasahujícím do hemostatických mechanismů je endoteliální receptor proteinu C (EPCR), který zprostředkovává vazbu PC na endotel s již exprimovaným komplexem TRM/trombin. Zánětlivé cytokiny, jako jsou interleukiny či TNFα (tumor necrosis alfa) snižují expresi TRM – inhibují jak jeho tvorbu, tak zvyšují jeho degradaci. (5)

Komplex APC/EPCR má rovněž významnou protizánětlivou aktivitu, a to aktivací systému protézami aktivovaného receptoru 1 (PAR-1), jehož hlavním aktivátorem je trombin. (27, 28) Aktivace PAR-1 vede v endotelových buňkách k celé řadě procesů, jejichž důsledkem je na jedné straně zvýšená tvorba NO, prostacyklinu a uvolnění t-PA, na straně druhé i von Willebrandova faktoru a P-selektinu. (29, 30) Reakce na aktivaci PAR-1 je specificky odlišná v různých typech cév i v závislosti na druhu tkáně či orgánu. (1, 31)

Prokoagulační vlastnosti endotelu

Nejdůležitějším protromboticky působícím produktem endotelových buněk je von Willebrandův faktor (vWF). Po své syntéze je vWF skladován ve formě multimerů ve

Weibel – Paladeho tělískách (WPT) a odtud je potom fúzí tělísek s plazmatickou membránou endotelové buňky uvolňován do krve. (32, 33) Podnětem pro uvolnění vWF je např. trombin, bradykinin, histamin či vazopresin. (34, 35)

Za fyziologických okolností neporušený endotel vykazuje antikoagulační vlastnosti a neexprimuje žádný tkáňový faktor, jehož přítomnost je in vivo nutná k zahájení koagulačního děje. (36, 25) Naopak poškozený dysfunkční endotel je zdrojem významného množství tkáňového faktoru, např. v aterosklerotických plátech. (37, 38) In vitro byla rovněž prokázána syntéza TF v endotelových buňkách po různých induktorech – trombinu, endotoxinech, cytokinech, oxidovaných lipoproteinech a při shear (smykovém) stresu. (39, 40, 41)

Endotel navíc exprimuje receptory pro fibrin, jeho produkty a pro adhezivní molekuly, což se za patologických stavů podílí na rozvoji trombotických komplikací.

Vliv endotelu na fibrinolytický systém

Fibrinolýza je závislá na aktivitě plazminu vznikajícího z plazminogenu po aktivaci tkáňovým aktivátorem plazminogenu - t-PA. Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je nejdůležitějším aktivátorem fibrinolýzy a hraje klíčovou roli v obnovení krevního toku následně po poškození a trombotizaci cévního lumen. (42,11) Endotelové buňky jsou hlavním místem produkce t-PA v organismu, dalším zdrojem jsou aktivované monocyty a megakaryocyty. (10,42) T-PA je hlavním aktivátorem fibrinolýzy a jediným specifickým aktivátorem plazminogenu. Je produkován v malých množstvích kontinuálně, ale po podnětu je rychle secernován ze specifických zásobních vezikul odlišných od Weibel-Paladeho tělísek. (43, 44)

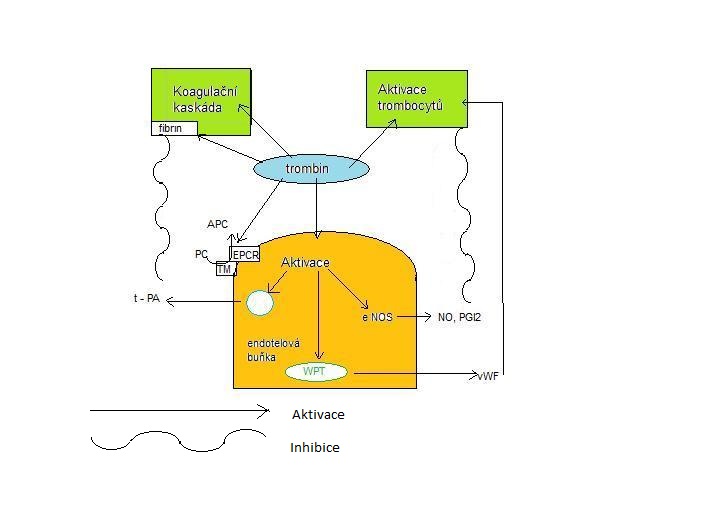
Endotelové buňky aktivované zánětlivými cytokiny produkují urokinázový aktivátor plazminogenu (u-PA), který zprostředkovává proteolýzu při procesech jako je angiogeneze či migrace progenitorových buněk. (45, 46, 47)

Endotel produkuje rovněž inhibitor aktivátoru fibrinolýzy - PAI-1. Inaktivní endotel nemá prakticky žádnou aktivitu PAI-1, ale stimulovaná produkce je rychlá a silná. PAI-1 inhibuje aktivitu jak t-PA, tak u-PA.

Roli v regulaci fibrinolýzy hraje rovněž trombomodulin, a to aktivací trombinem aktivovaného inhibitoru fibrinolýzy – TAFI po své vazbě do komplexu s trombinem. (48)

Komplexní funkce endotelových buněk ve zjednodušeném schématu znázorňuje obr. č. 2

**Obr. č. 2 – Role endotelu v hemostáze (**van Hinsbergh, upraveno)



**2.3.3. Endotelové buňky v regulaci zánětu a remodelaci cév**

Vlivem zánětlivých cytokinů dochází k aktivaci endotelových buněk, což v nich indukuje transkripci genů, které umožňují endotelovým buňkám nabídnout celou škálu receptorů a odpovídajících patofyziologických cest. Endotelové buňky kontrolují koncentraci a shlukování leukocytů v místech, kde je žádána prozánětlivá buněčná odpověď produkcí celé řady adhezivních molekul, např. leukocytární adhezivní molekuly (LAM), intracelulární adhezivní molekuly (ICAM), adhesivní molekuly cévních buněk (VCAM) a dalších (např. selektiny), které vyvolávají chemotaxi leukocytů, monocytů a makrofágů a tím modulují zánětlivou reakci. Zatímco některé adhezivní molekuly (např. selektin P) se na povrchu aktivovaného endotelu objevují už po několika minutách (což je umožněno jeho uvolněním z Weibel-Paladeho tělísek), další adhezivní molekuly (selektin E, ICAM) jsou produkovány až po delším trvání stimulace endotelu. (5)

Buňky endotelu přizpůsobují svůj metabolizmus aktuálním metabolickým potřebám. V případě zánětu se tato funkce endotelových buněk projevuje dobře známými klinickými příznaky v důsledku snížení bariérové funkce a vazodilatace - otokem, zarudnutím, zvýšenou infiltrací leukocyty a alterací koagulačních funkcí ve smyslu zvýšeného rizika formace trombu. Bylo prokázáno, že i proces aterosklerózy je potencován právě zánětem a je provázen zvýšenou hladinou markerů zánětu v krvi. (49)

Endotelové buňky zasahují do hojivých procesů a tvorby jizev stimulací angiogeneze a neovaskularizace. Tvorba nových cév, která je základem správné formace granulační tkáně a reparace tkání, stejně tak jako rekanalizace cév a odstranění fibrinových sraženin v ranách, jsou další významnou schopností endotelových buněk. Prostřednictvím uvolňování růstových a diferenciačních faktorů (plateled derived grow factor – PDGF, fibroblast derived grow factor – FDGF) se endotelové buňky podílejí na remodelaci cév.

**2.3.4. Cévní a tkáňově specifické funkce endoteliálních buněk**

V závislosti na rozdílných rychlostech proudění krve, spotřeby kyslíku a obsahu hladké svaloviny v cévách vykazují buňky endotelu v jednotlivých tkáních rozdílnou schopnost odpovědi na různorodé vazoaktivní působky a prozánětlivé cytokiny. Zatímco regulace cévního tonu je v arteriích velmi rychlá, o poznání pomalejší je v žilách. Rychlý tok krve v tepnách tlumí aktivaci prozánětlivých a prokoagulačních působků. (50) Tato schopnost je narušena v oblastech postižených aterosklerózou, kde je zpomalen a narušen konstantní tok krve, což společně s dalšími okolnostmi umožňuje trombotizaci postiženého úseku cévy. (51,52) Rozdílné smykové síly rovněž výrazně ovlivňují povahu trombu. Tromby bohaté na destičky – bílé tromby – nacházíme v tepenném řečišti, zatímco v žilách obsahují tromby více fibrinu a mají červenou barvu. (5)

Srovnání struktury a funkce kultur endotelových buněk z tepen, žil a kapilár z různých míst cévního systému prokazují, že tkáňově specifické genomické vlastnosti má vaskulatura nejen z arteriální, venózní či kapilární části, ale i z různých tkání. Tyto rozdíly se odrážejí v rozdílné expresi povrchových receptorů. Tkáňově specifická exprese – gamaglutamyltranspeptidázy a monoaminooxidázy byla popsána v mozkových mikrokapilárách. (5) V kostní dřeni dochází k trvalé expresi E-selektinu, zatímco jiné typy endotelových buněk vytvářejí tuto molekulu pouze při zánětlivé reakci. (5) Trombomodulin, sloučenina, která je v hojné míře přítomná v ostatních endotelových buňkách, je jen zřídka exprimována v mozku a v endotelových buňkách jaterních sinusoid. (7, 53) Tyto rozdílné vlastnosti endotelu v různých tkáních jsou zodpovědné za tkáňově specifický obraz některých nozologických jednotek, příkladem je hemolyticko-uremický syndrom s predilekčním postižením ledvin, které je způsobeno zvýšenou expresí receptoru Gb3 pro Schiga-toxin právě v glomerulárních kapilárách. (5)

* 1. **Dysfunkce endotelu**

S ohledem na různorodost a komplexnost funkcí endotelu je definice jeho dysfunkce obtížná. Nejčastěji je definována jako selhání přirozené vazodilatační, antikoagulační, antiagregační a protizánětlivé funkce.

Při narušení integrity endotelových buněk z důvodu chronického poškozování cévní stěny nejrůznější etiologie dochází k nadměrnému či insuficientnímu vyplavování produktů endotelových buněk jako jsou cytokiny, adhezní molekuly a růstové faktory, což způsobuje obraz chronického zánětlivého procesu a následně vede k alteraci cévní permeability, vazomotoriky a ke zvýšené protrombotické aktivitě. Mění se tím normální hemostatické vlastnosti endotelu a zvyšuje se jeho adhezivita pro leukocyty a trombocyty. Proteázy uvolňované jak z leukocytů, tak ze samotných aktivovaných endotelových buněk narušují ochrannou vrstvu proteoglykanů na cévním povrchu, což dále prohlubuje proces aktivace endotelu a po delší expozici dojde k selhání jeho fyziologické antitrombotické i vazodilatační funkce. (5) K aktivovaným endotelovým buňkám v místě léze jsou vlivem ahhezivních molekul uvolněných z Weibel-Paladeho tělísek (P-selektiny) i nově vytvořených (E-selektiny – ICAM, VCAM) přitahovány monocyty, makrofágy a T lymfocyty z cirkulace i buňky hladkého svalstva cévní medie, situaci dále zhoršuje pronikání lipoproteinových částic do léze – to vše vede ke ztlušťování cévní stěny v místě poškození a zúžení průsvitu cévy. (4,54) V zúženém místě dochází k porušení lineárního toku krve, tok se stává turbulentním a mechanismem smykového efektu dále poškozuje cévní stěnu a přímo aktivuje trombocyty. Aktivací trombocytů dochází k jejich degranulaci a dalšímu uvolňování cytokinů, růstových faktorů a v neposlední řadě trombinu, který svým mnohotvárným působením aktivuje koagulační kaskádu a destičky a potencuje závětlivou složku. Aktivací trombocytů vzniká arachidonová kyselina, která je zdrojem jak tromboxanu A2, který způsobuje další agregaci trombocytů a vazokonstrikci, tak leukotrienů, potencujících zánět. (54)

Jednotný algoritmus vyšetřování dysfunkce endotelu neexistuje. Jsou používány jak metody měřící změny průtoku krve tkáněmi (např. koronarografie či dopplerometrické měření průtoku) tak nepřímé měření známek dysfunkce endotelu – laboratorní stanovení produktů nadměrné aktivace endotelu.

V poslední době dochází k prudkému rozvoji poznatků o funkci produktů aktivace endotelových buněk a snaze zdokonalit laboratorní metody k jejich detekci. V minulosti již byl prokázán význam markerů aktivace endotelu při jeho poškození následkem aterosklerózy (především v akutní fázi ischémie myokardu, dolních končetin a ischemických cévních mozkových příhod umožňuje vyšetření jejich hladiny předpovědět tíží příhody). Intenzivně je zkoumán prediktivní potenciál markerů aktivace endoteliálních buněk ke stanovení rizika vývoje aterosklerózy v budoucnosti. Zájem vědců je zaměřen i na význam stanovení těchto markerů u dalších patologických stavů spojených s poškozením endotelu, jako je např. vznik maligních nádorů a jejich metastazování, metabolický syndrom, mikrovaskulární komplikace u diabetu mellitu a některé patologické stavy v těhotenství (preeklampsie, HELLP syndrom).

Bylo již potvrzeno, že v klinické fázi těchto onemocnění dochází k signifikantnímu zvýšení některých látek, které signalizují poškození endotelu – endotelin 1, vitronektin a endoteliální adhezívní molekuly VCAM (vascular cell adhesive molecules), ICAM (intercellular adhesive molecules). (5) V posledních letech se prudce rozvíjejí laboratorní metody stanovující další markery aktivace endotelu, např. t-PA, PAI-1, vWF, EPCR, trombomodulin a endotelové mikropartikule s prokoagulační aktivitou, jejichž význam byl prokázán např. při alteraci endotelu následkem aterosklerózy či diabetické nefropatie a retinopatie. Již méně byly zkoumány markery aktivace endotelu ve vztahu ke komplikacím v graviditě. (55)  Interpretace výsledků měření musí zohlednit jak podmínky při odběru (akutní či chronická fáze onemocnění, komorbidita), tak další zdroje některých markerů aktivace endotelu v organismu (např. PAI -1 je kromě endotelových buněk produkován i v játrech, tukových buňkách a megakaryocytech). (11)

V následující části je uveden přehled vybraných markerů aktivace endotelu, jejich klinický význam a možnosti laboratorního stanovení.

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). (10) 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. Aktivace plazminogenu prostřednictvím t-PA je potencována fibrinem – pouze v jeho přítomnosti může t-PA aktivovat plazminogen štěpením na aktivní molekuly plazminu. (10) 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 aterosklerózou, 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 jeho odbourávání. (4) Hladina t-PA bývá nejčastěji vyšetřována metodou ELISA.

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. (10) V plazmě se vyskytuje ve dvou formách – ve funkčně aktivní volné formě, která je stabilizována vazbou na fibronektin a ve funkčně inaktivní formě v komplexu s t-PA či urokinázou – 80% celkového množství. PAI-1 je rovněž skladován v alfa-granulích trombocytů. (10)

Bazální hladina v plazmě je nízká, vykazuje diurnální cyklus s ranním vrcholem. PAI-1 je „proteinem akutní fáze“, jeho hladina se tedy zvyšuje při infekcích, malignitách a v pooperačních stavech (4). Zvýšená hladina PAI-1 je nalézána u pacientů s projevy aterosklerózy, při terapii heparinem, při zánětech a v těhotenství. Fyziologická koncentrace PAI-1 je za bazálních podmínek **7-**23 ng/mla je stanovována metodou ELISA.

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 je multimerický adhezivní glykoprotein, který hraje klíčovou roli v primární hemostáze. VWF se váže prostřednictvím trombocytárních glykoproteinů Ib, IX a V na povrch destiček a je nezbytný pro jejich adhezi na místo poškozené cévní stěny. Na povrchu endotelových buněk se uvolněný vWF nachází ve formě tzv. ultra-large multimerů, které jsou ale rychle štěpeny specifickou proteázou metaloproteinázou ADAMTS 13 na multimery menší velikosti. (34) Dostatečná aktivita ADAMTS 13 metaloproteinázy je nutná k zabránění spontánní aktivace trombocytů, kterou spouštějí pouze ultra-large multimery vWF, nikoli jejich menší fragmenty, které k iniciaci adheze a agregace trombocytů vyžadují přítomnost aktivačního stimulu. (34) VWF rovněž stabilizuje koagulační faktor VIII v plazmě a brání tak jeho předčasné inaktivaci.

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.

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 navázání inaktivní komplex. (4) Další klíčovou roli v inhibici koagulace hraje trombomodulin v aktivaci proteinu C prostřednictvím komplexu s aktivovaným koagulačním faktorem II. (4) Aktivace proteinu C komplexem trombomodulin/trombin probíhá 1500-2000krát rychleji, něž samotným trombinem. (10) Z povrchu endotelových buněk je trombomodulin uvolňován proteolytickým štěpením elastázou neutrofilů při poškození těchto buněk. (10)

Laboratorně lze hladinu trombomodulinu stanovit metodou ELISA, fyziologická koncentrace je u mužů 10-52 ng/ml, u žen 10-42 ng/ml.

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 dochází po jeho interakci s komplexem trombin – trombomodulin

k výraznému urychlení aktivace PC (až pětinásobně) a současně propůjčuje EPCR PC svou protizánětlivou aktivitu. (4) 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.

Endotelové mikropartikule

Neporušený povrch endotelu hraje klíčovou roli v udržování integrity cévní stěny a hemostázy. Při alteraci endotelu a obnažení subendotelových 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 (≤ 1 μm) vezikuly, jejichž množství a struktura nám umožňuje posoudit míru a povahu poškození endotelu.

Pro vyšetření EMP je nejvýhodnější průtoková cytometrie s použitím celé řady monoklonálních protilátek, za fyziologických poměrů je nalézáno 1177-1765 částic/µl.

Metalloproteinázy a inhibitory metalloproteináz

Metalloproteinázy (MMP) a jejich inhibitory (TIMP) představují skupinu proteolytických enzymů, které štěpí složky extracelulární matrix. (56) Při aktivaci MMP a TIMP vdůsledku aktivace endotelových buněk při fyziologických pochodech (růst a diferenciace tkání a orgánů) a při patologických procesech (zánět, ischémie, nádorová transformace apod.) dochází k modifikaci extracelulární subendotelové matrix těmito enzymatickými systémy a poté dochází 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 hrají důležitou roli i při implantaci embrya do děložní sliznice a vývoji utero-placentární jednotky.

Laboratorně lze hladiny MMP a TIMP stanovit metodou ELISA.

* 1. **Trombofilní stavy a gravidita**
     1. **Změny hemostázy v graviditě**

Složitý koagulační a fibrinolytický systém je výrazně ovlivněn těhotenstvím. Během gravidity je tato rovnováha vychýlena hyperkoagulačním směrem. Vlivem hormonálních změn, především zvýšené hladiny estrogenu, stoupají hladiny fibrinogenu, protrombinu, F V aF VII i v řádech desítek procent, hladina F VIII a von Willebrandova faktoru se zvyšuje až dvojnásobně. (57,58) Menší vzestup je pozorován u F IX a XII, F XI mírně klesá. Hladiny endogenních antikoagulancií naproti tomu stoupají jen minimálně (TFPI, α2 makroglobulin, annexin V), zůstávají na stejné úrovni (heparin II kofaktor),mírně klesají (antitrombin) nebo se významně snižují (protein S). Koncentrace proteinu C zůstává na stejné úrovni, ale klesá jeho účinnost. Vlivem zvýšené hladiny F II, F V a F VIII a snížení proteinu S dochází ke snížené účinnosti proteinu C a rozvíjí se sekundární APC rezistence – asi u 40% těhotných. (57) Fibrinolytická aktivita plazmy se v těhotenství snižuje o více než 50%, což je způsobeno významným zvýšením hladin inhibitorů fibrinolýzy PAI 1, PAI 2 (tvořeným placentou) a TAFI.

Kromě těchto změn v koagulačním a fibrinolytickém systému se v graviditě uplatňují i ostatní vyvolávající momenty trombózy dle klasické Virchowovy triády - žilní stáza a poškození endotelu. Na žilní stáze a endotelovém poškození se podílí jak mechanický tlak rostoucí dělohy, tak hormonálně podmíněná hypotonie cévní stěny vlivem progresteronu. Oblenění krevního proudu způsobí zvýšení lokální koncentrace koagulačních faktorů a leukocytů, což spolu s nedostatečnou dodávkou kyslíku obleněnou krevní cirkulací vede k aktivaci endotelu, trombocytů i koagulační kaskády. Gravidita je tedy v širším slova smyslu trombofilním stavem. Samotná fyziologická gravidita zvyšuje riziko trombembolismu i při absenci jiných rizikových faktorů 5-8 krát (59,60), všeobecné riziko žilní trombembolické nemoci v graviditě je 0,05-1,8%. (61)

Bezprostředně po porodu dochází k výraznému poklesu hladiny F XII, prekalikreinu a vysokomolekulárního kininogenu, během několika hodin dochází k normalizaci fibrinolýzy, nejspíše v důsledku poklesu produkce PAI-2 z důvodu odloučení placenty. (57) K návratu koagulačních faktorů k předtěhotenským hodnotám dochází během dnů až týdnů po porodu.

Těhotenství je provázeno rovněž významnými hemodynamickými změnami, především poklesem systémové cévní rezistence, zvýšením minutového srdečního výdeje a průtoku krve jak v systémové, tak v plicní cirkulaci a poklesem krevního tlaku. Tyto změny jsou patrné již od prvního trimestru. Mechanismy vedoucí k vazodilataci v graviditě nejsou zcela objasněny, ale je zřejmé, že klíčovou roli hraje produkt endotelových buněk - oxid dusnatý, jehož zvýšená aktivita v těhotenství je dominujícím faktorem poklesu cévní rezistence. (62) Tuto hypotézu podporují studie, které prokázaly zvýšení aktivity jak oxidu dusnatého, tak cGMP u těhotných žen. (62) Takto podmíněná vazodilatace se spolu se zvýšeným srdečním výdejem podílí na zmnožení objemu cirkulující krve. Důsledkem zmnožení cirkulující plazmy při nezměněném objemu erytrocytární masy je hemodiluce, která je důležitým faktorem pro perfuzi placenty a také částečně eliminuje vychýlení hemostázy prokoagulačním směrem.

Důležitými a v klinické praxi velmi častými rizikovými faktory zvyšujícími riziko trombembolismu v graviditě jsou vyšší věk rodiček (věk nad 35 let zvyšuje riziko TEN 2x

(63), nutnost klidu na lůžku a obezita.

O to větší klinický význam mají v etiopatogenezi některých porodnických komplikací vrozené koagulopatie – trombofilie, které dále vychylují hemostatickou rovnováhu prokoagulačním směrem. Není tedy překvapující, že těhotné ženy s vrozenou či získanou trombofilií mají riziko trombotických komplikací výrazně zvýšené.Kromě navýšení rizika trombembolismu mohou trombofilie navíc indukovat tvorbu trombóz v uteroplacentárním a intervilózním prostoru a tím vést k některým porodnickým komplikacím, jako jsou opakované ztráty plodu, infertilita, intrauterinní růstová retardace a úmrtí plodu, preeklampsie, HELLP syndrom a abrupce placenty. (59) Velmi často dochází k první klinické manifestaci trombofilního stavu právě v graviditě – obvykle jako potrat nebo žilní trombóza s či bez plicní embolie. (59) U 65 % žen s opakovaným potratem v anamnéze bývá nalezena vrozená či získaná trombofilie. (64,65)

* + 1. **Vrozené a získané trombofilní stavy**

Faktor V Leiden

V kavkazské populaci je tzv. Leidenská mutace nejčastějším genetickým defektem způsobujícím trombózu. Je podmíněna bodovou mutací faktoru V (FV:R506Q – záměna glutaminu za arginin v pozici 506) koagulační kaskády v místě, kde se váže protein C a poté

je F V štěpen a inaktivován, což má za následek narušení této inaktivace a dlouhodobý hyperkoagulační stav. Prokoagulační aktivita takto mutovaného F V zůstává zachována. (11) Na trombofilním efektu Leidenské mutace se podílí i ztráta schopnosti změněného F V podílet se na inaktivaci F VIIIa. (4,11)

Výskyt tohoto trombofilního stavu kolísá v závislosti na geografické poloze (v Evropě severojižním směrem nosičů ubývá, u původního obyvatelstva Asie, Afriky, Austrálie i Ameriky se nevyskytuje) a pohybuje se mezi 2-15% u vyšetřovaných, v neselektované skupině nemocných s žilní trombózou se vyskytuje ve 20-50% a ve vybraných rodinách s trombofilií se vyskytuje u více než poloviny probandů. (11) Riziko trombembolie v průběhu života je u nosičů 30% a dále významně stoupá, pokud se přidruží jiné získané či vrozené koagulopatie. Heterozygotní forma faktoru V Leiden zvyšuje riziko trombózy 5-10násobně, naproti tomu homozygotní postižení představuje až 50-100násobné riziko. (59, 66)Rovněž riziko opakování trombotických příhod je u nosičů zvýšeno oproti pacientům s trombózou bez průkazu trombofilie.Nosiči heterozygotní formy FV:R506Q s první atakou trombembolické příhody mají po 8 letech 30,3% pravděpodobnost rekurence. (67) Také u těhotných žen s trombózou je nejčastější vrozenou trombofilií.V této skupině byla prokázána ve 43,7 % oproti 7,7% u netěhotných žen s trombózou. (68) Riziko trombózy v graviditě je u nosiček heterozygotní formy Leidenské mutace 0,2%. (69)

Získaná APC rezistence

Klinicky významná je i rezistence na aktivovaný protein C bez přítomnosti Leidenské mutace – tzv. získaná forma APC rezistence. Provází často graviditu, užívání hormonální antikoncepce, hormonální substituční terapie estrogeny nebo antifosfolipidový syndrom. Získaná forma APC rezistence představuje stejné navýšení trombotického rizika jako její vrozená forma, tj. Leidenská mutace.

Mutace protrombinu 20210 G-A

Mutace v oblasti protrombinového genu v pozici 20210 G-A (náhrada guanidinu za adenin v pozici 20210 v nepřepisované oblasti genu pro faktor II) bývá spojena se zvýšenou hladinou protrombinu a současně představuje zvýšené riziko vzniku trombózy. Výskyt mutace v bílé populaci kolísá mezi 1-4 % s mnoha geografickými variacemi. Na Evropském kontinentu je častější v jižních oblastech, kde představuje nejčastější vrozenou trombofilii. (11) Mutace protrombinu 20210 G-A v heterozygotní formě zvyšuje riziko vzniku trombózy téměř trojnásobně. (70) Mechanismus, jakým mutace protrombinu 20210 G-A ovlivňuje hladinu protrombinu a zvyšuje riziko trombembolismu, není zcela jasný. Hladinu protrombinu nelze užít jako screeningový test, mutaci protrombinu 20210 G-A lze odhalit pouze metodami PCR.

Riziko trombózy v graviditě je u nosiček heterozygotní formy mutace protrombinu 20210 G-A 0,4% . (71)

Deficit antitrombinu

Deficit antitrombinu je velmi vážná protrombotická porucha, ve skupině vrozených koagulopatií mají pacienti s deficitem antitrombinu největší riziko vzniku trombózy. (11)

Antitrombin je glykoprotein syntetizovaný převážně v játrech. Mimo své inhibiční působení na trombin antitrombin inaktivuje faktory IXa, Xa, VIIa a plazmin. Je kofaktorem heparinu, bez dostatečné hladiny antitrombinu není heparin v terapii TEN efektivní. Deficit antitrombinu se jako trombofilní stav projeví při jeho snížení pod 50% normy, v těhotenství již pod 80%. (4)

Rozlišujeme 2 typy dědičného nedostatku antitrombinu. Typ I je provázen odpovídajícím snížením jak aktivity (v testu s chromogenním substrátem), tak antigenu (ELISA test) antitrombinu, u typu II se jedná o funkční defekt při  normální hladině antigenu. Gen pro antitrombin se nachází na 1. chromozomu, deficit je způsoben množstvím bodových mutací, delecí a inzercí, které jsou téměř vždy dědičné autozomálně dominantně. Kromě dělení na typ I a II je u typu II důležité i rozlišení místa defektu v molekule antitrombinu – zda je poškozené vazebné místo pro trombin či heparin. Klinicky se poškození vazebného místa pro trombin projevuje stejně závažně, jako deficit I. typu, zatímco u defektního vazebného místa pro heparin nedochází ke klinické manifestaci, tedy trombotickým komplikacím, tak často. (11) Homozygotní forma je s největší pravděpodobností neslučitelná se životem. Vrozený deficit typu I se vyskytuje u 0,02% osob, prevalence u typu II je vyšší - 0,15%. (11) Riziko rozvoje trombotických komplikací u nosičů dosahuje v průběhu života 70 – 90 %, navíc jsou spojeny se závažnějším průběhem, především s rozsáhlými trombózami dolních končetin a plicní embolizací. Ke klinické manifestaci dochází již v adolescentním období.

Neméně významné jsou i získané formy deficitu antitrombinu. V graviditě mírně klesá aktivita antitrombinu, stejně tak jako při užívání hormonální antikoncepce. Významně snížená hladina antitrombinu vlivem zvýšené konzumpce může provázet rozsáhlé trombózy, terapii heparinem a diseminovanou intravaskulární koagulaci, dále můžeme snížení antitrombinu pozorovat při nemocech jater vlivem jeho snížené produkce či z důvodu zvýšených ztrát při nefrotickém syndromu nebo chronických zánětlivých procesech.

Riziko trombózy v graviditě je u žen s deficitem antitrombinu typu I bez užití profylaxe 36%. (11)

Deficit proteinu C

Protein C je členem skupiny vitamin K-dependentních glykoproteinů. V plazmě cirkuluje v neaktivní formě, po aktivaci trombinem pak působí jako inhibitor koagulace inaktivací F VIIIa a FVa. Aktivace proteinu C je 1000násobně urychlena vytvořením komplexu trombinu s trombomodulinem produkovaným endotelovými buňkami a exprimovaným na jejich povrchu, kde probíhá vazba tohoto komplexu s proteinem C prostřednictvím dalšího produktu endotelových buněk, endotelového receptoru proteinu C. Dalšími účinky APC jsou útlum aktivace trombocytů a snížení zánětlivé odpovědi. (4)

Dědičný nedostatek proteinu C je způsoben mutacemi v jeho genu, kterých bylo dosud popsáno asi 160, tyto se projeví častěji jako snížení hladiny proteinu C (typ I) nebo jeho dysfunkce (typ II). Klinická manifestace je stejná u obou typů. (11) V populaci se vyskytuje vzácně, u 0,2% osob, dědičnost je autozomálně dominantní. V homozygotní formě vyvolává u novorozenců rozsáhlé nekrózy a neonatální purpuru fulminans, většinou se setkáváme s nosiči heterozygotní formy.

Frekvenci žilní trombózy deficit proteinu C v heterozygotní formě zvyšuje 10násobně, riziko vzniku trombózy v průběhu života je okolo 50%. (4) V graviditě hladina proteinu C zůstává na stejné úrovni, ale významně klesá funkční aktivita systému aktivovaného proteinu C, a to z důvodu jak snížení jeho kofaktoru proteinu S, tak výrazného zvýšení koagulačních faktorů, především F VIII, což nezřídka vede až ke vzniku získané formy APC rezistence. Syntéza proteinu C probíhá v játrech a je závislá na vitaminu K, což se projeví snížením jeho hladiny při warfarinizaci.

Riziko trombózy v graviditě je u žen s deficitem proteinu C 0,9%. (11)

Deficit proteinu S

Protein S je glykoprotein tvořený v především v játrech. Cirkulující protein S se vyskytuje ve formě volné (30-40%) a ve formě vázané (60-70%). Je významným kofaktorem aktivovaného proteinu C, čímž zvyšuje jeho schopnost inaktivovat F Va a F VIIIa. Protein S má i na proteinu C nezávislou antikoagulační aktivitu, inhibuje tenázový komplex

(FIXa/FVIIIa/fosfolipidy) a protrombinázový komplex (F Va/FXa/fosfolipidy). (11) Prevalence deficitu je 0,03-0,13 %, dědičnost téměř vždy autozomálně dominantní. Byly popsány 3 typy deficitu proteinu S - typ I s poklesem jak antigenu volného a vázaného proteinu S, tak i jeho aktivity, typ II s normální hladinou antigenu volného i vázaného proteinu S, ale sníženou aktivitou, u typu III se jedná o normální hladinu antigenu celkového proteinu S, ale sníženou hladinu antigenu volného proteinu S i jeho aktivity. (11)

Heterozygot s deficitem nebo dysfunkcí proteinu S má riziko žilní trombozy navýšeno 5-10krát. Syntéza proteinu S je  závislá na vitaminu K, takže při antikoagulační terapii warfarinem bývá jeho hladina významně snížena. Klinicky významné je „fyziologické“ snížení proteinu S v těhotenství, a to průměrně o 30%.

Elevace faktoru VIII

Bylo zjištěno, že jedinci s non 0 krevní skupinou v AB0 systému mají zvýšené riziko jak arteriální, tak žilní trombózy, a to z důvodu vyšší hladiny F VIII. Zvýšení hladiny faktoru VIII nad 150% normálu představuje nezávislý rizikový faktor trombózy. Riziko trombembolismu je při tomto nálezu zvýšeno asi šestkrát, nezávisle na tom, zda se jedná o dědičnou odchylku (s dosud neznámou kauzální mutací), či sekundární elevaci F VIII např. při zánětlivém či nádorovém onemocnění nebo vlivem hormonálních změn (gravidita, terapie estrogeny). Primární zvýšení hladiny F VIII je možno konstatovat po pečlivém vyloučení jiné příčiny a setrvalé elevaci hodnot. Primární zvýšení hladiny F VIII se vyskytuje asi u 11% populace. (4)

Hyperhomocysteinémie

Homocystein je odvozen od aminokyseliny methioninu. V plazmě je obsažen v koncentraci přibližně 5–16 μmol/l. Vrozená hyperhomocysteinémie může být zapříčiněna řadou enzymatických defektů, kromě velmi vzácné homocystinurie jako součásti komplexní vrozené metabolické vady se mnohem častěji vyskytuje jako následek některé z mutací genu pro cystathion beta-syntetázu nebo genu pro metylentetrahydrofolátreduktázu (MTHFR). Nejčastější mutace MTHFR, záměna cytozinu tyminem v pozici 677, způsobuje asi 25% nárůst hladiny homocysteinu z důvodu jeho narušené konverze na methionin a vyskytuje se v kavkazské populaci v homozygotní formě u 8-10% osob. (4) Klinické projevy se mohou zvýraznit při deficitu vitamínů B6, B12 a kyseliny listové (často v těhotenství) nebo při léčbě methotrexatem.

Homocystein indukuje zvýšenou expresi tkáňového faktoru na monocytech a makrofázích, což poškozuje endotelové buňky a vede k hyperkoagulačnímu stavu jak v arteriálním, tak venózním řečišti. Dalším mechanismem vedoucím ke zvýšené incidenci trombóz je snížení fibrinolýzy způsobené zvýšenou produkcí PAI-1 z aktivovaných endotelových buněk a inhibice exprese trombomodulinu na povrchu endotelu, což snižuje účinnost antikoagulačního působení proteinu C. (4)

Lehké a střední formy vedou k urychlení aterosklerózy a častějšímu rozvoji trombembolické choroby. U plodů vyvolávají defekty neurální trubice a jsou asociovány se spontánními potraty.

Antifosfolipidový syndrom (APS)

Antifosfolipidový syndrom bývá řazen mezi získané formy trombofilií. Je charakterizován přítomností venózních i arteriálních či mikrocirkulačních trombóz nebo rekurentních předčasně ukončených těhotenství v přítomnosti antifosfolipidových protilátek. Antifosfolipidové protilátky jsou různorodou skupinou látek namířených proti makromolekulárním proteinůmvázaným na negativně nabité fosfolipidové povrchy. Protrombotický účinek je dán jejich vazbou na trombocyty, které tím aktivuje. Ty začnou vylučovat TF, PAI-1 a jiné prokoagulační faktory. Dále dochází ke snížení antikoagulační aktivity vazbou protilátek na inhibitory koagulace, k poškození endotelu a expresi cytoadhezivních molekul – to vše vede k trombofilii. (72)

Laboratorně nacházíme antifosfolipidové protilátky (antikardiolipinové nebo proti β-2 glykoproteinu I) typu IgG nebo IgM v různě vysokém titru. Nález musí být prokázán 2x v odstupu minimálně 12ti týdnů. Dále prokazujeme lupus antikoagulans – nejméně 2x v odstupu 12ti týdnů. Velmi často nás na přítomnost antifosfolipidových protilátek upozorní prodloužené aPTT**.**

**Tabulka č. 2 – Prevalence významných vrozených trombofilií a riziko trombozy v graviditě (McColl et al., upraveno)**

Trombofilní stav Celk. populace Odhadované riziko

(%) TEN v graviditě

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Deficit antitrombinu – typ I 0,02 36% (1/2,8)

Deficit proteinu C 0,2 0,9% (1/42)

Leidenská mutace 3 0,2% (1/437)

Mutace protrombinu 20210 G-A 2 0,4% (1/232)

* + 1. **Trombofilie a patologické stavy v graviditě**

Již dlouho je znám význam antifosfolipidových protilátek jako důležitého vyvolávajícího faktoru opakovaných potratů v různých fázích gravidity. Tato skutečnost byla potvrzena jak klinickým pozorováním, tak závěry četných studií.

Sporná a nezodpovězená zůstává otázka asociace vrozených trombofilních stavů s porodnickými komplikacemi - časnými i pozdnímu ztrátami plodu, placentárními poruchami, tj. abrupcí placenty, intrauterinní retardací plodu, preeklampsií a HELLP syndromem. Dosud provedené studie vykazují silně rozporuplné výsledky – od jasné statistické významnosti trombofilních stavů v etiologii těchto stavů až po zjištění identického výskytu těchto poruch u gravidních žen s trombofilií či bez ní. Interpretace výsledků je ztížena nehomogenitou souborů žen ve smyslu tíže porodnické komplikace, geografickými rozdíly ve výskytu jednotlivých trombofilních poruch a v neposlední řadě designem studií – tedy, zda se jednalo o „case control“ studii či populačně observační šetření. Podle metaanalýzy Reyové et al. (2003) zahrnující 31 studií (73) je Leidenská mutace asociována s časnými (do 13. týdne gestace) opakovanými potraty (OR 2,01, 95% CI 1,13-3,58) pozdními opakovanými potraty (OR 7,83, 95% CI 2,83-21,67) i pozdními nerekurentními potraty (OR 3,26, 95% CI 1,82-5,83). APC rezistence je provázena časnými opakovanými potraty (OR 3,48, 95% CI 1,58-7,69), mutace protrombinu 20210 G-A časnými rekurentními potraty (OR 2,56, 95% CI 1,04-6,29) a pozdními neopakovanými potraty (OR 2,30, 95% CI 1,09-4,87), deficit proteinu S  opakovanými potraty (OR 14,72, 95% CI 0,99-218,01) a pozdními nerekurentními potraty (OR 7,39, 95% CI 1,28-42,63). Mutace MTHFR, deficit proteinu C ani deficit antitrombinu není podle této metaanalýzy spojen se ztrátami plodu. Metaanalýza Rodgera et al. (2010), která zahrnovala 10 studií (74) a hodnotila mimo jiné vztah mezi trombofiliemi a preeklampsií či růstovou retardací nenalezla asociaci mezi Leidenskou mutací a preeklampsií (OR 1,23, 95% CI 0,89-1,70), mutací protrombinu 20210 G-A a preeklampsií (OR 1,25, 95% CI 0,79-1,99), mezi Leidenskou mutací a růstovou retardací plodu (OR 1,0, 95% CI 0,80-1,25) či mutací protrombinu 20210 G-A a růstovou retardací plodu (OR 1,25, 95% CI 0,92-1,70).

Interpretaci výsledků těchto studií dále výrazně komplikuje skutečnost, že na rozvoji výše uvedených porodnických komplikací se mohou podílet vrozené trombofilní stavy nejen matky, ale i plodu, jak dokládá např. zjištění Dizon-Townsonové et al., kteří pozorovali vyšší frekvenci spontánních potratů plodů s Leidenskou mutací oproti plodům bez této mutace. (75)

## Preeklampsie a HELLP syndrom

Závažnými klinickými jednotkami provázejícími těhotenství, které vznikají na podkladě poškození endotelu, jsou preeklampsie a HELLP syndrom.

Na rozvoji těchto onemocnění se podílí placentární ischémie podmíněná abnormální imunitní odpovědí mateřského organismu na fetální tkáně exprimující antigeny otcovského původu, která potom indukuje generalizovanou dysfunkci endotelu vyplavováním cirkulujících faktorů do mateřského oběhu. Podstatou obou klinických jednotek je poškození endotelu v důsledku poruchy invaze fetálního trofoblastu do spirálních arteriol mateřské cirkulace. (76) Za fyziologických okolností dochází při invazi trofoblastu do děložní sliznice ke vzniku vysokokapacitních, nízkoodporových cév schopných zajistit dostatečnou placentární perfúzi. (77) U žen, u kterých v pozdějším stadiu gravidity dojde k rozvoji HELLP syndromu nebo preeklampsie, dochází k mělké invazi cév, které zůstávají vysokoodporovými a nízkokapacitními, což ve svém důsledku vede k poruše uteroplacentární cirkulace a následné placentární ischémii. U pacientek dochází k uvolňování fragmentů mikrovilárního syncitiotrofoblastu a vazoaktivních faktorů do mateřské cirkulace. Placentární ischémií indukované vyplavení cirkulujících faktorů je součástí generalizované zánětlivé odpovědi organismu, která vede k alteraci vaskulární reaktivity a  poškození endotelových buněk stávajících se cílovou tkání těchto změn. (77) Významné změny se odehrávají i v cévách samotné placenty. Ve stěnách spirálních artérií dochází k „akutní ateroskleróze“ charakterizované fibrinoidní nekrózou cévní stěny s infiltrací pěnovými buňkami, které se podobají typickým pěnovým buňkám vyskytujícím se v aterosklerotických plátech.

Generalizovaná dysfunkce endotelu je příčinou klinických projevů preeklampsie a HELLP syndromu. Vede k hypertenzi, zvýšené vaskulární permeabilitě způsobující mimo jiné proteinurii, ke koagulopatii a poškození nejrůznějších orgánů následkem trombotické mikroangiopatie. Mikroangiopatické změny jsou u HELLP syndromu obdobné změnám při prosté preeklampsii, preferenčně je však postižena jaterní tkáň, kde dochází k ukládání fibrinových depozit v poškozených jaterních sinusoidech a vzniku hepatálních nekróz.

Preeklampsie je jednou z nejdůležitějších příčin mateřské a neonatální morbidity a mortality. Vyskytuje se u 6-8 % těhotenství. (76) Preeklampsií je nazývána hypertenze provázená proteinurií, která vznikla ve druhé polovině těhotenství u předtím normotenzní ženy. Preeklampsie může být provázena otoky, poruchou hemokoagulace a známkami jaterního či ledvinného poškození. Stupňuje-li se tento vývoj a přidají-li se další orgánové léze a tonicko-klonické křeče, jde o eklampsii. K nejzávažnějším komplikacím patří hypertenzní krize a intrakraniální krvácení.

U žen, které v graviditě prodělaly preeklampsii, bylo prokázáno zvýšené riziko kardiovaskulární morbidity v budoucnu, což svědčí pro trvající dysfunkci endotelu i po ukončení těhotenství a odeznění příznaků preeklampsie. Studie zabývající se asociací mezi výskytem preeklampsie a rozvojem hypertenze, ischemické choroby srdeční či cerebrovaskulárních onemocnění v dalších desetiletích života prokázaly statisticky významné zvýšení rizika těchto komplikací ve skupině žen s preeklampsií oproti ženám s nekomplikovanou graviditou. (76)

HELLP syndrom je jednou z nejzávažnějších komplikací těhotenství, vyskytující se buď v souvislosti s preeklampsií nebo jako samostatná nozologická jednotka. Postihuje 0,2-0,4% těhotných žen a 10-20% žen s těžkou preeklampsií. Nejčastěji se vyskytuje ke konci těhotenství, ale 25-30% všech případů syndromu HELLP se klinicky manifestuje až po porodu a tyto mívají těžší průběh.

Jako klinická jednotka byl HELLP syndrom poprvé popsán v r. 1982 Weinsteinem. Typickými laboratorními nálezy, které jsou diagnostické a dávají syndromu název, jsou hemolýza (H), elevace jaterních testů (EL) a trombocytopenie (LP). Mikroangiopatická hemolýza je hlavním kritériem HELLP syndromu. Je následkem mechanického poškození červených krvinek, ke kterému dochází v mikrocirkulaci. Fibrinová depozita a destičkové tromby uložené podél edematózních endotelových buněk vedou k poškození nebo úplné destrukci erytrocytů, které proudí poškozeným cévním řečištěm relativně velkou rychlostí. Významně se na těchto změnách podílí i generalizovaný vazospasmus. V nátěru z periferní krve nacházíme různě velké nepravidelné fragmenty červených krvinek, tzv. schistocyty. V důsledku probíhající hemolýzy dochází k retikulocytóze, vzestupu sérových hladin nepřímého bilirubinu a celkové laktátdehydrogenázy (LDH), zatímco hladina sérového haptoglobinu klesá. Elevace jaterních testů, především transamináz, je způsobena poškozením hepatocytů následkem trombotizace mikrocirkulace v jaterním parenchymu, který je u HELLP syndromu poškozen nejvíce. Při tvorbě mikrotrombů dále dochází k masivní konzumpci trombocytů, což způsobuje pokles jejich počtu.

Dominujícím klinickým příznakem je bolest v epigastriu, která je způsobená napínáním jaterního pouzdra při drobných krváceních do Disseho prostoru, dále nauzea a zvracení. Dalšími příznaky bývají bolesti hlavy a poruchy vizu, obávanými komplikacemi jsou rozvoj diseminované intravaskulární koagulace, subkapsulárního hematomu až ruptury jater a intracerebrálního krvácení.

Průběh onemocnění bývá většinou velmi rychlý. Jedinou kauzální léčbou, stejně jako u preeklampsie, je ukončení gravidity, neméně důležitá je intenzivní podpůrná terapie. Při péči o ženy s těžkým HELLP syndromem je nutná mezioborová spolupráce porodníka s hematologem a anesteziologem.

V kontrastu s jasnými diagnostickými kritérii jsou limitované možnosti predikce onemocnění. V praxi bývajípreeklampsie a HELLP syndrom diagnostikovány až na základě klinických projevů, což jsou již příznaky pokročilého stádia onemocnění. Zásadní změny, jako jsou dysfunkce endotelu, metabolické změny, zvýšená reaktivita cév a generalizovaná vazokonstrikce, stejně jako aktivace koagulační kaskády, probíhají již podstatně dříve. V současné době existuje mnoho klinických, laboratorních a genetických testů, které byly použity pro predikci preeklampsie a HELLP syndromu. Žádný z nich doposud neprokázal výraznější klinický význam.

**2.7. Arteriální hypertenze v graviditě**

Arteriální hypertenze komplikuje průběh gravidity v 8-10%. (78) Představuje jednu z nejčastějších příčin mateřské i fetální morbidity a mortality. Hypertenze v těhotenství je definována podle Světové zdravotnické organizace jako vzestup krevního tlaku (TK) na hodnoty 140/90 a více.

V graviditě dělíme hypertenzi na preexistující hypertenzi, která je přítomná již před těhotenstvím nebo vzniká do 20. týdne gestace a po šestinedělí se neupravuje, těhotenstvím indukovanou hypertenzi (neboli gestační hypertenzi) vyvíjející se až ve druhé polovině gravidity a upravující se po šestinedělí a dále preexistující hypertenzi s nasedající gestační hypertenzí. Chronická preexistující i gestační hypertenze jsou významným predisponujícím faktorem pro vznik preeklampsie, tyto ženy mají až 5x vyšší riziko rozvoje této komplikace oproti normotenzním gravidním. (79) Z důvodu hemodynamických změn v graviditě často dochází u chronických hypertoniček v I. trimestru k přechodnému poklesu TK, tento efekt ale v pozdějších fázích gravidity mizí a hodnoty tlaku jsou indikací k znovuzahájení terapie modifikované kontraindikacemi některých antihypertenziv z důvodu prokázané či suspektní teratogenity. Rizikem neléčené hypertenze v těhotenství je vznik preeklampsie, abrupce placenty a intrauterinní růstové retardace plodu, v případě hypertenzní krize i krvácení do mozku, diseminovaná intravaskulární koagulace a selhání srdce, ledvin či jater. (78)

**3. Cíle práce**

Cílem studie bylo nalezení optimálního laboratorního vyšetření k odhalení aktivace endotelu během fyziologické gravidity stanovením vybraných markerů v průběhu těhotenství a dále srovnání vývoje hladin těchto markerů s hodnotami u žen, u kterých se v průběhu těhotenství vyvinula preeklamsie či HELLP syndrom. Je pravděpodobné, že plazmatické vzorky žen s preeklampsií či HELLP syndromem ve srovnání se vzorky plazmy od žen s normálním těhotenstvím vykazují významné rozdíly v některých parametrech. Cílem byla identifikace takových markerů, u nichž dochází k signifikantním změnám již před nástupem klinicky zjevných příznaků preeklampsie a HELLP syndromu a které by tedy bylo možné použít k predikci těchto onemocnění.

Dalším cílem studie bylo porovnání hladinmarkerů aktivace endotelu u žen s fyziologicky probíhající graviditou ve srovnání s těhotnými ženami s preexistujícím onemocněním charakterizovaným dysfunkcí endotelu – tj. hypertenzí.

Do složitého systému hemostázy během gravidity zasahuje významným způsobem i eventuální přítomnost vrozených trombofilií – cílem naší studie bylo i vyšetření vrozených trombofilních stavů a posouzení, zda má přítomnost trombofilie vztah k typu a tíži známek zátěže endotelu.

Na základě recentních literárních údajů jsme pro dosažení cílů provedli vyšetření aktivity a antigenu von Willebrandova faktoru, tkáňového aktivátoru plazminogenu, inhibitoru aktivátoruplazminogenu 1, trombomodulinu, endoteliálního receptoru aktivovaného proteinu C, endotelových mikropartikulí, tkáňové metalloproteinázy 2 a 9 a inhibitoru tkáňové metalloproteinázy 9.

1. **Vlastní výzkumný projekt** 
   1. **Charakteristika souboru**
      1. **Skupina žen s fyziologickou graviditou:**

Do souboru žen s fyziologickou graviditou jsme zařadili celkem 403 těhotných žen s fyziologicky probíhající graviditou, které byly během těhotenství sledovány na Porodnicko-gynekologické klinice FN a LF UP Olomouc. Ženy v této skupině byly v době 1. odběru (na konci I. trimestru) bez interních, neurologických či jiných závažných onemocnění.

Výběr těhotných a jejich zařazení do studie probíhalo formou náhodného výběru, všechny gravidní se zařazením do studie souhlasily, vyplnily dotazník a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

* + 1. **Soubor těhotných žen s preexistující hypertenzí:**

Soubor tvořily prospektivně sledované těhotné ženy sesenciální hypertenzí, která byla diagnostikována a léčena již před těhotenstvím. Tyto pacientky byly během gravidity sledovány v poradně pro riziková a patologická těhotenství Porodnicko-gynekologické kliniky FN Olomouc. Souboru těhotných hypertoniček, které jsme kompletně vyšetřili, tvořilo celkem 75 pacientek.

Rovněž v této skupině všechny gravidní ženy se zařazením do studie souhlasily, vyplnily dotazník a podepsaly informovaný souhlas a studie byla schválena Etickou komisí.

* + 1. **Soubor těhotných se syndromem HELLP:**

Z důvodu nízké incidence tohoto onemocnění jsme vyšetřili také ženy se vznikem HELLP syndromu ve III. trimestru gravidity, které nebyly prospektivně sledovány. Tyto ženy byly ošetřovány na Porodnicko-gynekologické klinice FN Ostrava, kde absolvovaly 1x odběr krve k vyšetření markerů aktivace endotelu při vzniku této komplikace.V této skupině jsme vyšetřili celkem 33 žen.

* + 1. **Soubor žen vyšetřených mimo těhotenství:**

Vyšetření markerů aktivace endotelu u žen mimo graviditu bylo provedeno za účelem zhodnocení eventuálního vlivu trombofilie na úroveň aktivace endotelu. Z tohoto důvodu jsme vyšetřili soubor žen, které v době odběru nebyly gravidní, nebylo u nich diagnostikováno žádné onemocnění provázené dysfunkcí endotelu a také neužívaly žádnou medikaci s možným vlivem na hemostatický systém. Do tohoto souboru bylo zařazeno celkem 171 žen sledovaných v poradně pro infertilitu Porodnicko-gynekologické kliniky FN Olomouc.

Práce probíhala za podpory grantu IGA Ministerstva zdravotnictví České republiky NR 9282-3 (2007-2009), který byl obhájen v r. 2010 a navržen na Cenu ministra zdravotnictví České republiky.

* 1. **Odběry, zpracování vzorků a vyšetřovací metody**

U vyšetřených souborů bylo komplexně vyšetřeno poškození endotelu pomocí sledovaných markerů. Těhotným ženám byla 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, 3. odběr ve III. trimestru, opět v rámci těhotenských odběrů. U žen s HELLP syndromem byl odběr proveden při průkazu tohoto onemocnění, vždy ve III. trimestru. Netěhotným ženám byla krev odebrána standardním způsobem v rámci komplexních odběrů z důvodu infertility. Získané krevní vzorky byly následně zpracovány v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc. Pro vyšetření bylo použito vzorků venózní krve odebrané do 0,129 M citrátu sodného (Vacuette, Greiner). Pro samotné vyšetření pak byla použita plasma chudá na destičky (PPP), která byla získána centrifugací při 3000 g po dobu 10 minut a uchována do doby vyšetření při -80 Cº. Pro stanovení EMP bylo použito vzorku venózní krve odebraného do K3EDTA.V  laboratoři byly uvedené parametry vyšetřovány následujícími metodikami: vWF – EIA (imunologické stanovení využívající imunoturbidimetrie), t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, ePCR – ELISA , MMP-2,9 – ELISA s fluorogenní detekcí,  TIMP-2 – ELISA, endoteliální mikropartikule – průtoková cytometrie, F VIII - modifikovaný aktivovaný parciální tromboplastinový čas, Leidenská mutace + mutace protrombinu 20210 G-A – PCR.Vzhledem k náročnosti odběru a preanalytické fáze byly mikropartikule vyšetřeny pouze u pacientek sledovaných ve FN Olomouc.

* 1. **Laboratorní vyšetření** 
     1. **Metodika laboratorních vyšetření**

Von Willebrandův faktor

Hladina VWF antigenu byla stanovena enzymovou imunoanalýzou. 20 µl PPP 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%.

##### Hladina aktivity VWF byla stanovena enzymovou imunoanalýzou. Protilátkou je specifická monoklonální protilátka absorbovaná na povrchu latexových mikropartikulí, namířená proti vazebnému místu vWF na trombocytech (glykoprotein Ib receptor), reagujícímu s vWF v plasmě. 20 µl PPP bylo inkubováno s monoklonální 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.

Thrombomodulin

Stanovení trombomodulinu jsme prováděli technikou mikro ELISA.

Vlastní stanovení – vzorek 200 µl 2x naředěné PPP byl inkubován 2 hodiny s monoklonální protilátkou za laboratorní teploty. 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.

Tkáňový aktivátor plazminogenu

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 aktivátoru plazminogenu 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).

Endoteliální 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-konjugované CD144. Vzorky byly následně ředěny s 1,0 ml PBS pufru a známým množstvím fluorescenčních latexových kuliček (Flowcount, BeckmanCoulterImmunotech), které sloužily jako standard pro počet mikropartikulí při analýze průtokovou cytometrií. EMP byly měřeny na průtokovém cytometru CoulterEpics 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 µl plné krve.

Metalloproteináza 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 metalloproteinázy 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.

Faktor VIII

Hladina faktoru VIII byla stanovena na základě modifikovaného aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APPT). Plazma pacienta byla předředěna a přidána k plasmě deficitní na stanovovaný faktor VIII. Korekce koagulačního času deficitní plasmy byla přímo úměrná koncentraci (aktivitě) faktoru v plasmě pacienta, která byla odečtena z kalibrační křivky, a výsledek byl udán v procentech.

Leidenská mutace a mutace protrombinu 20210 G-A

Přítomnost bodové mutace faktoru V (FV R/Q 506) a bodové mutace genu protrombinu (F II 20210 G/A) v heterozygotní či homozygotní formě byla stanovena pomocí TC Genotyping kitu. Stanovení sestávalo ze tří kroků: DNA extrakce, DNA amplifikace metodou PCR a analýzy produktů PCR gelovou elektroforézou. Druhý krok je založen na "multiplex" PCR reakci, která kombinuje více kombinací primerů v jediné reakci. V tomto stanovení bylo využito specifických kombinací primerů pro amplifikaci mutantní stejně jako zdravé alely k rozlišení homozygotní a heterozygotní formy mutace.

* 1. **Statistické metody**

Veškeré kalkulace byly provedeny za pomocí SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA) a Statistica. Pro analýzy byly použity Kruskal – Wallisův test, studentův test, chi-squared test, Fisherův exact test, t-test a Mann-Whitneyův U test.

* 1. **Výsledky**
     1. **Demografická data**

Ženy zařazené do skupiny fyziologické gravidity měly negativní osobní a bezvýznamnou rodinnou anamnézu, 298 žen, tj. 74% z celého souboru, byly primipary, 72 žen, tj. 18 % z celého souboru byly sekundipary, 33 žen, tj. 8,1 % byly tercipary. Průměrný věk těhotných žen byl 27,6 roku (±4,5 roku). Průměrná hmotnost rodiček na začátku gravidity byla 62,6 kg (±8,8 kg). Průměrný váhový přírůstek činil 10,03 kg (±4,4 kg), průměrná výška rodiček byla 167 cm (±5,6 cm).

Soubor žen s preexistující hypertenzí tvořily hypertoničky s hypertenzí vzniklou a léčenou již před graviditou. Celkem jsme v této skupině kompletně vyšetřili 75 žen, 12 žen, tj. 16 % byly primipary, 43 žen, tj. 57 % byly sekundipary, ostatní ženy, tj. 27 % byly vícerodičky. Průměrný věk v tomto souboru byl 34,3 let (± 5,1 roku). Průměrná hmotnost rodiček na začátku gravidity byla 76,8 kg (± 9,3 kg), průměrný váhový přírůstek činil 14,1 kg (± 5,3 kg), průměrná výška rodiček byla 166 cm (± 5,3 cm).

Demografická data u skupiny těhotných s HELLP syndromem a žen vyšetřených mimo graviditu nebyla zjišťována, tyto pacientky nebyly sledovány prospektivně.

* + 1. **Průběh těhotenství**

Z celkového počtu 403 žen v souboru s fyziologickou graviditou se u 39 (9,7%) vyvinul lehčí až středně těžký stupeň preeklampsie, u 8 rodiček (1,98 %) byl diagnostikován HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. 28 rodiček (7%) porodilo předčasně před ukončeným 37. týdnem gravidity. 5 těhotenství (1,24 %) bylo ukončeno z genetické indikace pro vrozenou vadu plodu. Kompletní protokol studie (odběry ve všech třech trimestrech) absolvovalo 358 těhotných.

Ženy s preexistující hypertenzí byly v případě komplikací vzniklých v těhotenství (preeklampsie apod.) vyřazeny ze souboru. U 75 žen vyšetřených ve všech trimestrech proběhlo těhotenství bez komplikací.

* + 1. **Laboratorní výsledky**

**4.5.3.1. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství - soubor žen s fyziologickou graviditou**

Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3 a grafech č. 1-10

Hladina antigenu vWf stoupala během celého těhotenství (v I. trimestru průměrná hladina 152,32 %, ve II., resp. III. trimestru 173,34, resp. 216,20 %), 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 (graf č. 1). Současně stoupala aktivita vWf (v I. trimestru průměrná hladina 130,20 %, ve II., resp. III. trimestru 150,09, resp. 181,91 %), v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi II. a III. trimestrem, rozdíl mezi I. a II. trimestrem nebyl statisticky významný (graf č. 2). Hladina trombomodulinu významně stoupala během gravidity (v I. trimestru průměrná hladina 19,05 ng/ml, ve II. resp. III. trimestru 28,47 ng/ml, resp. 39,86 ng/ml), v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem (graf č. 3). Hladina t-PA se během gravidity významněji neměnila (v I. trimestru průměrná hladina 2,48 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 2,97, resp. 3,34 ng/ml) (graf č. 4). Hladina PAI – 1 stoupala během celého těhotenství (v I. trimestru průměrná hladina 36,14 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 50,07, resp. 60,12 ng/ml), v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. i II. a III. trimestrem (graf č. 5). Hladina solubilní formy EPCR stoupala během gravidity (v I. trimestru průměrná hladina 201,76 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 274,68, resp. 324,07 ng/ml), v našem souboru jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin mezi I. a II. trimestrem, rozdíl mezi II. a III. trimestrem nebyl statisticky významný (graf č. 6). Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladinách MMP-2 (v I. trimestru průměrná hladina 9043,76 RFU (fluorescenčních jednotek), ve II., resp. III. trimestru, 9315,38 resp. 8800,27 RFU), MMP-9 (v I. trimestru průměrná hladina 8371,90 RFU, ve II., resp. III. trimestru 8290,81, resp. 7470,50 RFU), TIMP-2 (v I. trimestru průměrná hladina 92,5 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 98,5, resp. 96,5 ng/ml) ani endotelových mikropartikulí (v I. trimestru průměrná hladina 3838,38 částic/μl, ve II., resp. III. trimestru 3836,59, resp. 3630,59 částic/μl) v jednotlivých trimestrech (grafy č. 7-10).

**Tabulka č.3 - Srovnání hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech – soubor žen s fyziologickou graviditou**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **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** |
| t-PA | 2,48 | 2,97 | 3,34 | 0,85 | 0,96 |
| PAI - 1 | 36,14 | 50,07 | 60,12 | **0,000** | **0,012** |
| ePCR | 201,76 | 274,68 | 324,07 | **0,017** | 0,660 |
| 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 |

**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 1** | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
| **Graf č. 6**  **Endoteliání receptor proteinu C** | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
|  | | | |  |  | |  | |  | |  |
| **Graf č. 7**  **Endotelové mikropartikule** |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
| **Graf č. 8**  **Metalloproteináza 2** |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |
|  |  |  | |  | |  | |  | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  | | --- | |  | |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
| **Graf č. 9**  **Metalloproteináza 9** |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
|  |  |  | | | |  |  |  |
| **Graf. č. 10**  **Tkáňový inhibitor metalloproteináz 2** |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| **4.5.3.2. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství – soubory žen, u nichž se vyvinula  preeklampsie, resp. HELLP syndrom**  Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 4-8 a grafech č. 11-20. |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**4.5.3.2.1. Srovnání jednotlivých parametrů v souboru žen, u nichž se vyvinula preeklampsie oproti souboru zdravých těhotných:**

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 (průměrné hladiny 23,41 v I. trimestru, 34,33 ve II. trimestru a 53,56 ng/ml ve III. trimestru) oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 19,05 v I. trimestru, 28,47 ve II. trimestru a 39,86 ng/ml ve III. trimestru). 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 inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 ve srovnání se skupinou zdravých těhotných nepozorovali (průměrné hladiny u žen s preeklampsií 36,87 vI. trimestru, 59,54 ve II. trimestru a 77,03 ng/ml ve III. trimestru, průměrné hladiny u zdravých těhotných 36,14 v I. trimestru, 50,07 ve II. trimestru a 60,12 ng/ml ve III. trimestru). Neprokázali jsme 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.

**4.5.3.2.2. Srovnání jednotlivých parametrů v souboru žen s HELLP syndromem oproti souboru zdravých těhotných ve III. trimestru:**

V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrná hladina 369,78%) oproti kontrolní skupině zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity (průměrná hladina 216,2 %) Současně byly statisticky významně zvýšené hladiny aktivity vWf ve skupině žen s HELLP syndromem (průměrná hladina 301,7 %) oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity (průměrná hladina 181,91%). Rovněž jsme v našem souboru prokázali statisticky významné zvýšení hladin EPCR ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrná hladina 463,07 ng/ml ) oproti kontrolní skupině zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity (průměrná hladina 324,07 ng/ml). Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrná hladina 12776,2 RFU (fluorescenčních jednotek)) ve srovnání s kontrolním souborem zdravých těhotných žen ve III. trimestru ( průměrná hladina 8800,27 RFU)a v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrně 12939,8 RFU) oproti souboru zdravých těhotných žen ve III. trimestru ( 7470,5 RFU).

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami trombomodulinu (průměrné hladiny 36,41 versus 39,86 ng/ml), hladinami t-PA (3,89 versus 3,34 ng/ml) a PAI-1 (průměrné hladiny 67,19 versus 60,13 ng/ml) ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině zdravých těhotných. Ani rozdíly v hladinách TIMP-2 nebyly statisticky významné (110,5 ng/ml ve skupině žen s HELLP syndromem oproti 96,5 ng/ml ve skupině zdravých těhotných ve III. trimestru).

**4.5.3.2.3. Srovnání jednotlivých parametrů v souboru žen s HELLP syndromem oproti souboru žen s preeklampsií ve III. trimestru:**

V našem souboru jsme prokázali statisticky signifikantně významné zvýšení hladin antigenu vWf ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrná hladina 369,78%) oproti pacientkám s preeklampsií ve srovnatelném stadiu gravidity (průměrná hladina 219,03 %). Současně byly statisticky významně zvýšené hladiny aktivity vWf ve skupině žen s HELLP syndromem (průměrná hladina 301,7 %) oproti pacientkám s preeklampsií ve srovnatelném stadiu gravidity (průměrná hladina 213%). Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl jak v hladinách MMP-2 ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrná hladina 12776,22 RFU (fluorescenčních jednotek) ve srovnání se skupinou  pacientek s preeklampsií ve srovnatelném stadiu gravidity ( průměrná hladina 8403,28 RFU), tak v hladinách MMP-9 ve skupině pacientek s HELLP syndromem (průměrně 12939,8 RFU) oproti souboru pacientek s preeklampsií ve srovnatelném stadiu gravidity (7100,08 RFU). Při srovnání hladin trombomodulinu, resp. PAI-1 v obou skupinách pacientek jsme prokázali rovněž statisticky významný rozdíl hodnot, hladiny trombomodulinu i PAI-1 byly zvýšené ve skupině pacientek s preeklampsií (průměrná hladina 53,56 ng/ml, resp. 77,03 ng/ml) ve srovnání se skupinou žen s HELLP syndromem (průměrná hladina 36,41 ng/ml, resp. 67,19 ng/ml), obojí ve III. trimestru gravidity. Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi hladinami EPCR (průměrné hladiny 463,07 versus 398,69 ng/ml), hladinami t-PA (3,89 versus 2,92 ng/ml), a TIMP-2 (průměrné hladiny 110,5 versus 103 ng/ml) ve skupině pacientek s HELLP syndromem a ve skupině pacientek s preeklampsií ve srovnatelném stadiu gravidity.

**Tabulka č. 4 - Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s preeklampsií v jednotlivých trimestrech**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace endotelu** | **Průměr** | **Medián** | **Minimum** | **Maximum** | **Sm. odch.** |
| vWF  antigen I | 159,282 | 141 | 102 | 278 | 48,274 |
| vWF  antigen II | 181,385 | 177 | 110 | 334 | 50,585 |
| vWF  antigen III | 219,026 | 202 | 92 | 378 | 70,756 |
| vWF  aktivita I | 117,077 | 114 | 54 | 187 | 29,591 |
| vWF  aktivita II | 142,051 | 150 | 80 | 230 | 33,517 |
| vWF  aktivita III | 213 | 190 | 99 | 376 | 65,401 |
| TRM\_I | 23,41 | 22 | 4 | 49 | 11,521 |
| TRM\_II | 34,333 | 32 | 9 | 75 | 15,184 |
| TRM\_III | 53,564 | 48 | 16 | 151 | 28,622 |
| tPA\_I | 2,59 | 2 | 2 | 5 | 0,88 |
| tPA\_II | 3,333 | 3 | 2 | 17 | 2,698 |
| tPA\_III | 2,923 | 3 | 2 | 7 | 1,061 |
| PAI\_I | 36,872 | 33 | 12 | 76 | 16,497 |
| PAI\_II | 59,538 | 60 | 25 | 90 | 18,329 |
| PAI\_III | 77,026 | 85 | 8 | 99 | 19,838 |
| ePCR\_I | 151,256 | 118 | 25 | 373 | 90,72 |
| ePCR\_II | 233,744 | 183 | 52 | 840 | 170,475 |
| ePCR\_III | 398,692 | 371 | 104 | 992 | 235,449 |
| EMP\_I | 4161,205 | 3521 | 1583 | 16870 | 2781,549 |
| EMP\_II | 3082,41 | 2822 | 1573 | 7716 | 1374,054 |
| EMP\_III | 4238 | 3505 | 1537 | 13370 | 2559,077 |
| MMP2\_I | 9038,385 | 8441 | 4803 | 15096 | 2530,725 |
| MMP2\_II | 7419,769 | 6964 | 4683 | 11255 | 1672,04 |
| MMP2\_III | 8403,282 | 8192 | 5683 | 12416 | 1470,544 |
| MMP9\_I | 8278,923 | 8070 | 4446 | 17113 | 2526,465 |
| MMP9\_II | 6408,436 | 6189 | 1785 | 10459 | 1779,779 |
| MMP9\_III | 7100,077 | 7036 | 5157 | 9224 | 1135,127 |
| TIMP2\_I | 1,678 | 1,73 | 0,15 | 3,66 | 0,805 |
| TIMP2\_II | 1,834 | 1,69 | 0,82 | 4,27 | 0,706 |
| TIMP2\_III | 2,057 | 1,88 | 0,11 | 4,37 | 0,715 |

**Tabulka č. 5 - Srovnání výsledků mezi jednotlivými trimestry u souboru pacientek s preeklampsií**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| párově po dvojicích: |  |  | navzájem (kontextově) - vícenásobné porovnání: | | | | |
| **Test Statistics(d)** |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **Z** | **Asymp. Sig.**  **(2-tailed)** |  |  |  |  |  |
| Vwf Ag ii - vwf  Ag i | -2,247(a) | **0,025** | ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 38,76923 p = ,00000 | | | | |
| vwf\_Ag iii – vwf Ag ii | -4,320(a) | **0,000** |  |  |  |  |  |
| vwf\_AG iii -vwf  Ag i | -4,068(a) | **0,000** |  |  |  |  |  |
| vwF aKt. II - vwF aKt.\_i | -4,627(a) | **0,000** | ANOVA chí-kv. (N = 39, sv = 2) = 68,66667 p = ,00000 | | | | |
| vwF aKt.III–vwFaKt.\_II | -5,443(a) | **0,000** |  |  |  |  |  |
| vwF aKt. III- vwFaKt. 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\_iii - 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. 6 - Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek se syndromem HELLP (odběr v akutní fázi onemocnění)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | | |  | |  | |
| **Marker aktivace endotelu** | | **Průměr** | **Medián** | | **Minimum** | | **Maximum** | | **Sm.odch.** |
|  | |  |  | |  | |  | |  |
| **vWF ag III** | | 369,78 | 361 | | 227 | | 499 | | 60,289 |
| **vWF akt. III** | | 301,7 | 304 | | 198 | | 393 | | 45,903 |
| **TM\_III** | | 36,41 | 29 | | 12 | | 111 | | 24,761 |
| **tPA\_III** | | 3,89 | 3 | | 2 | | 13 | | 2,391 |
| **PAI\_III** | | 67,19 | 68 | | 41 | | 94 | | 12,023 |
| **ePCR\_III** | | 463,07 | 415 | | 194 | | 854 | | 201,525 |
| **MMP2\_III** | | 12776,22 | 12305 | | 5997 | | 23285 | | 3795,039 |
| **MMP9\_III** | | 12939,85 | 12237 | | 8970 | | 23394 | | 3540,125 |
| **TIMP2\_III** | | 2,21 | 1,76 | | 0,42 | | 6,95 | | 1,282 |

**Tabulka č. 7 -Srovnání jednotlivých parametrů v souboru žen s HELLP syndromem, souboru žen s preeklampsií a souboruzdravých těhotných ve III. trimestru**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivaceendotelu** | **Kontrolní skupina III. trimestr** | **Preeklampsie III. trimestr** | **HELLP syndrom III. trimestr** | **Srovnání kontroly/ HELLP p=** | **Srovnání preeklampsie/HELLP p=** |
| 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 |

**Tabulka č. 8 - Srovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u souboru žen s preeklampsií oproti kontrolnímu souboru**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace**  **endotelu** | **Mann-Whitneyův U test, významnost při hladině p ˂ 0,05** | | | | |
|  | U | Z | p = | Z uprav. | p = |
| vWF antigen I | 1521,0 | -0,328 | 0,7431 | -0,328 | 0,7430 |
| vWF antigen II | 413,5 | -0,829 | 0,4069 | -0,830 | 0,4068 |
| vWF antigen III | 1744,5 | -0,249 | 0,8032 | -0,249 | 0,8032 |
| vWF akt. I | 1245,5 | 1,871 | 0,0613 | 1,872 | 0,0613 |
| vWF akt. II | 1538,5 | 0,122 | 0,9031 | 0,122 | 0,9031 |
| vWF akt. III | 1214,0 | -2,919 | **0,0035** | -2,920 | **0,0035** |
| TRM I | 1129,5 | -1,989 | **0,0467** | -1,993 | **0,0463** |
| TRM II | 966 | -2,522 | **0,0117** | -2,523 | **0,0116** |
| TRM III | 1128,5 | -2,690 | **0,0071** | -2,691 | **0,0071** |
| tPA I | 1457 | -0,686 | 0,4925 | -0,825 | 0,4092 |
| tPA II | 1464,5 | 0,103 | 0,9177 | 0,113 | 0,9104 |
| tPA III | 1596 | 0,627 | 0,5305 | 0,674 | 0,5006 |
| PAI-1 I | 1489,5 | -0,504 | 0,6141 | -0,504 | 0,6139 |
| PAI-1 II | 1078 | -2,387 | **0,0170** | -2,387 | **0,0170** |
| PAI-1 III | 848,5 | -4,534 | **0,0000** | -4,535 | **0,0000** |
| EPCR I | 1002 | 2,483 | **0,0130** | 2,483 | **0,0130** |
| EPCR II | 1038 | 1,312 | 0,1896 | 1,312 | 0,1896 |
| EPCR III | 1277,5 | -1,783 | 0,0746 | -1,783 | 0,0746 |

**Tabulka č. 8 - Srovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u souboru s preeklampsií oproti kontrolnímu souboru – pokračování**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace endotelu** | **Mann-Whitneyův U test, významnost při hladině p ˂ 0,05** | | | | |
|  | U | Z | p = | Z uprav. | p = |
| EMP I | 1261,5 | -1,782 | 0,0748 | -1,782 | 0,0748 |
| EMP II | 1214,5 | 1,865 | 0,0622 | 1,865 | 0,0622 |
| EMP III | 1650,5 | -0,722 | 0,4701 | -0,722 | 0,4701 |
| MMP-2 I | 1315,5 | -0,431 | 0,6664 | -0,431 | 0,6664 |
| MMP-2 II | 676,5 | 3,801 | **0,0001** | 3,801 | **0,0001** |
| MMP-2 III | 1530,5 | 0,380 | 0,7040 | 0,380 | 0,7040 |
| MMP-9 I | 1313,5 | -0,444 | 0,5730 | -0,444 | 0,5730 |
| MMP-9 II | 635,5 | 4,083 | **0,0000** | 4,084 | **0,0000** |
| MMP-9 III | 1581,5 | -0,097 | 0,9227 | -0,097 | 0,9227 |
| TIMP -2 I | 1262,0 | 0,765 | 0,4440 | 0,765 | 0,4440 |
| TIMP -2 II | 1015,0 | 1,470 | 0,1415 | 1,470 | 0,1415 |
| TIMP -2 III | 1407,5 | -1,062 | 0,2882 | -1,062 | 0,2882 |

**Graf č. 11**

**Antigen vWF – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 12**

**Aktivita vWF – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 13**

**Trombomodulin – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 14**

**Tkáňový aktivátor plazminogenu – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 15**

**Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 - kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 16**

**Endoteliální receptor proteinu C – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 17**

**Endotelové mikropartikule – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 18**

**Metalloproteináza 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 19**

**Metalloproteináza 9 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**Graf č. 20**

**Tkáňový inhibitor metalloproteináz 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy**



**4.5.3.3. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech těhotenství - soubor chronických hypertoniček**

Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10.

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách antigenu vWF při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí, a to ve všech trimestrech (průměrné hladiny 215,43 v I. trimestru, 232,86 ve II. trimestru a 284,48 ng/ml ve III. trimestru) oproti hladinám antigenu vWF ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 152,32 v I. trimestru, 173,34 ve II. trimestru a 216,20 ng/ml ve III. trimestru), i hodnot aktivity vWF, a to ve II. a III. trimestru (průměrné hladiny 143,05 v I. trimestru, 193,52 ve II. trimestru a 224,57 % ve III. trimestru) oproti hladinám aktivity vWF ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 130,20 v I. trimestru, 150,09 ve II. trimestru a 181,91 % ve III. trimestru). Pozorovaný rozdíl hladin v I. trimestru byl na hranici statistické významnosti. Rovněž jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin trombomodulinu při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí se skupinou zdravých těhotných, a to ve všech trimestrech (průměrné hladiny 34,57 v I. trimestru, 40,62 ve II. trimestru a 53,62 ng/ml ve III. trimestru) oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 19,05 v I. trimestru, 28,47 ve II. trimestru a 39,86 ng/ml ve III. trimestru). Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí a zdravých těhotných, a to v I. a III. trimestru, ve II. trimestru byl rozdíl na hranici statistické významnosti (průměrné hladiny 49,38 v I. trimestru, 58,14 ve II. trimestru a 76,33 ng/ml ve III. trimestru) oproti hladinám inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 36,14 v I. trimestru, 50,07 ve II. trimestru a 60,12 ng/ml ve III. trimestru).

Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v hladinách tkáňového aktivátoru plazminogenu, endoteliálního receptoru proteinu C, endotelových mikropartikulí, metalloproteináz 2, 9 ani tkáňového inhibitoru metalloproteináz 2 při porovnání jejich hladin v jednotlivých trimestrech u skupiny žen s chronickou hypertenzí a skupiny žen s fyziologicky probíhající graviditou.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |

**Tabulka č. 9 - Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s chronickou hypertenzí v jednotlivých trimestrech**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace**  **endotelu** | **Průměr** | **Minimum** | **Maximum** | **Sm.odch.** |
| vWF antigen I | 215,43 | 69 | 347 | 66,25 |
| vWF antigen II | 232,86 | 78 | 350 | 66,35 |
| vWF antigen III | 284,48 | 92 | 401 | 77,76 |
| vWF akt I | 143,05 | 65 | 210 | 32 |
| vWF akt. II | 193,52 | 136 | 282 | 40,02 |
| vWF akt. III | 224,57 | 167 | 286 | 40,99 |
| TRM I | 34,57 | 12 | 70 | 15,38 |
| TRM II | 40,62 | 9 | 91 | 18,83 |
| TRM III | 53,62 | 17 | 109 | 25,68 |
| tPA I | 2,76 | 2 | 5 | 1 |
| tPA II | 3,67 | 2 | 11 | 2,5 |
| tPA III | 2,86 | 2 | 8 | 1,39 |
| PAI-1 I | 49,38 | 11 | 74 | 16,7 |
| PAI-1 II | 58,14 | 16 | 89 | 18,27 |
| PAI 1 III | 76,33 | 51 | 98 | 15,52 |
| ePCR I | 162,05 | 64 | 280 | 72,35 |
| ePCR II | 220,1 | 103 | 664 | 153,07 |
| ePCR III | 263,24 | 75 | 760 | 210,76 |
| EMP I | 3357,19 | 1716 | 8102 | 1639,17 |
| EMP II | 3736,62 | 1702 | 8633 | 1618,61 |
| EMP III | 5524,9 | 1604 | 18515 | 4507,37 |

**Tabulka č. 9 - Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s chronickou hypertenzí v jednotlivých trimestrech – pokračování**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace**  **endotelu** | **Průměr** | **Minimum** | **Maximum** | **Sm.odch.** |
| MMP-2 I | 8863,33 | 3256 | 14022 | 2767,4 |
| MMP-2 II | 8490,67 | 4803 | 14958 | 2275,72 |
| MMP-2 III | 8004,14 | 4953 | 12728 | 2324,99 |
| MMP-9 I | 7726,38 | 4567 | 11745 | 2178,28 |
| MMP-9 II | 7693 | 4446 | 12178 | 2331,44 |
| MMP-9 III | 7751,1 | 4576 | 17113 | 2724,15 |
| TIMP-2 I | 2,14 | 0,1 | 4,3 | 1,23 |
| TIMP-2 II | 1,69 | 0,15 | 3,7 | 0,78 |
| TIMP-2 III | 1,65 | 0,82 | 2,9 | 0,47 |

**Tabulka č. 10 - Srovnání markerů aktivace endotelu u chronických těhotných hypertoniček a těhotných s fyziologickou graviditou v jednotlivých trimestrech**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace**  **Endotelu** | **Mann-Whitneyův U test, významnost při hladině p ˂ 0,05** | | | | |
|  | U | Z | p = | Z uprav. | p = |
| vWF antigen I | 340,0 | -4,225 | **0,0000** | -4,225 | **0,0000** |
| vWF antigen II | 365,5 | -3,971 | **0,0001** | -3,971 | **0,0001** |
| vWF antigen III | 475,5 | -3,621 | **0,0003** | -3,621 | **0,0003** |
| vWF akt. I | 644,0 | -1,709 | 0,0875 | -1,709 | 0,0874 |
| vWF akt. II | 356,5 | -4,046 | **0,0001** | -4,047 | **0,0001** |
| vWF akt. III | 454,0 | -3,779 | **0,0002** | -3,780 | **0,0002** |
| TRM I | 359,5 | -4,015 | **0,0000** | -4,015 | **0,0000** |
| TRM II | 369,5 | -3,443 | **0,0006** | -3,444 | **0,0006** |
| TRM III | 397,0 | -3,374 | **0,0009** | -3,375 | **0,0009** |
| tPA I | 692,5 | -1,308 | 0,1910 | -1,551 | 0,1208 |
| tPA II | 696,0 | -0,893 | 0,3716 | -0,965 | 0,3343 |
| tPA III | 754,0 | 1,306 | 0,1915 | 1,400 | 0,1614 |
| PAI-1 I | 489,5 | -2,988 | **0,0028** | -2,989 | **0,0028** |
| PAI-1 II | 614,0 | -1,612 | 0,1070 | -1,612 | 0,107 |
| PAI-1 III | 501,0 | -3,250 | **0,0012** | -3,251 | **0,001** |

**Tabulka č. 10 - Srovnání markerů aktivace endotelu u chronických těhotných hypertoniček a těhotných s fyziologickou graviditou v jednotlivých trimestrech - pokračování**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace**  **Endotelu** | **Mann-Whitneyův U test, významnost při hladině p ˂ 0,05** | | | | |
|  | U | Z | p = | Z uprav. | p = |
| EPCR I | 673,0 | 0,763 | 0,4457 | 0,763 | 0,4456 |
| EPCR II | 519,5 | 1,467 | 0,1424 | 1,467 | 0,1424 |
| EPCR III | 658,5 | 1,658 | 0,0974 | 1,658 | 0,0974 |
| EMP I | 848,0 | 0,021 | 0,9835 | 0,021 | 0,9835 |
| EMP II | 787,0 | -0,360 | 0,7191 | -0,360 | 0,7191 |
| EMP III | 726,5 | -1,768 | 0,0771 | -1,768 | 0,0771 |
| MMP-2 I | 704,0 | -0,386 | 0,6995 | -0,386 | 0,6995 |
| MMP-2 II | 583,0 | 0,811 | 0,4174 | 0,811 | 0,4174 |
| MMP-2 III | 696,5 | 1,347 | 0,1781 | 1,347 | 0,1781 |
| MMP-9 I | 697,0 | 0,451 | 0,6519 | 0,451 | 0,6519 |
| MMP-9 II | 563,0 | 1,018 | 0,3089 | 1,018 | 0,3089 |
| MMP-9 III | 809,0 | -0,426 | 0,6704 | -0,426 | 0,6704 |
| TIMP -2 I | 597,5 | -1,377 | 0,1686 | -1,377 | 0,1686 |
| TIMP -2 II | 476,5 | 1,911 | 0,0560 | 1,911 | 0,056 |
| TIMP -2 III | 621,5 | 1,960 | 0,0499 | 1,961 | 0,0499 |

**4.5.3.4. Výsledky hladin markerů aktivace endotelu u netěhotných žen – srovnání žen s trombofilním stavem a bez prokázané trombofilie**

V souboru netěhotných žen jsme vyšetřili jak markery aktivace endotelu, tak významné trombofilní stavy. Hladiny markerů aktivace endotelu pak byly srovnány ve skupině žen bez prokázané trombofilie oproti skupině žen, u nichž byla trombofilie potvrzena. V tomto souboru jsme vyšetřili 171 žen, u 8 z nich jsme prokázali heterozygotní stav Leidenské mutace, ve 3 případech heterozygotní stav mutace protrombinu 20210 G-A a u 31 žen jsme nalezli výrazně zvýšenou hladinu F VIII nad 180%. Ostatní významné trombofilie se v našem souboru nevyskytly. Srovnání parametrů markerů aktivace endotelu oproti ženám bez trombofilie jsme provedli pouze ve skupině Leidenské mutace a elevace F VIII, skupinu s protrombinovou mutací jsme z důvodu nízkého zastoupení nehodnotili.

Kompletní výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 11 a 12.

Ve skupině žen s prokázanou Leidenskou mutací jsme u žádného vyšetřeného parametru aktivace endotelu nenalezli významný rozdíl ve výsledcích.

Ve skupině žen s výraznou elevací F VIII jsme prokázali statisticky významný rozdíl v hladině antigenu vWF (průměrná hladina 201,7%) oproti hladině antigenu vWF ve skupině žen s hodnotou F VIII do 179% (průměrná hladina 148,4%) i v hladině aktivity vWF (průměrná hladina 130,8%) oproti hladině aktivity vWF ve skupině žen s hodnotou F VIII do 179% (průměrná hladina 108,12). Rovněž jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin trombomodulinu při srovnání skupiny žen s výraznou elevací F VIII (průměrná hladina 28,6 ng/ml) oproti hladinám trombomodulinu ve skupině žen s hodnotou F VIII do 179% (průměrná hladina 23,40 ng/ml) a dále v hladině t-PA (průměrná hladina 3,51 ng/ml) u žen s elevací F VIII oproti hladině t-PA ve skupině žen s hodnotou F VIII do 179% (průměrná hladina 2,68 ng/ml). Rozdíl v hladinách PAI-1 v obou skupinách byl na hranici statistické významnosti.

**Tabulka č. 11 - Výsledky markerů aktivace endotelu u žen bez prokázané trombofilie, s Leidenskou mutací a výraznou elevací faktoru VIII**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Marker aktivace endotelu** | **Bez trombofilie** | | **Leidenská mutace** | | **Mut. protrombinu** | | **F VIII ≥** | **180%** |
|  | **Průměr** | **Sm. odchylka** | **Průměr** | **Sm. odchylka** | **Průměr** | **Sm. odchylka** | **Průměr** | **Sm. odchylka** |
| vWF antigen | 148,40 | 43,21 | 151,60 | 37,28 | 160, 8 | 58,2 | 201,7 | 68,7 |
| vWF aktivita | 108,12 | 27,13 | 106,08 | 24,17 | 98, 16 | 31,68 | 130,8 | 42,8 |
| TRM | 23,40 | 11,50 | 21,05 | 9,95 | 22,15 | 10,87 | 28,6 | 15,7 |
| t - PA | 2,68 | 0,84 | 2,65 | 0,83 | 2,71 | 0,89 | 3,51 | 0,97 |
| PAI – 1 | 36,87 | 16,46 | 34,50 | 15,30 | 38,70 | 17,10 | 43,8 | 18,1 |
| ePCR | 132,26 | 90,80 | 130,13 | 85,70 | 110,08 | 79,80 | 138,6 | 82,7 |
| EMP | 4021 | 2658,13 | 3890 | 1870,12 | 4089 | 1938 | 4430 | 2830,5 |
| MMP – 2 | 7046 | 2530,73 | 7456 | 2043,73 | 7320 | 1980,9 | 6560 | 1530,8 |
| MMP – 9 | 6489,25 | 2521,13 | 6390,8 | 2431,70 | 7058,8 | 2201,1 | 8230,4 | 1580,6 |
| TIMP – 2 | 1,58 | 0,79 | 1,601 | 0,787 | 1,507 | 0,69 | 1,61 | 0,539 |

**Tabulka č. 12 - Srovnání markerů aktivace endotelu u žen s prokázaným trombofilním stavem a souborem žen bez trombofilie**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Marker aktivace endotelu** | **Leidenská mutace / kontroly, p =** | **Faktor VIII ≥ 180% / kontroly, p =** |
| vWF antigen | 0,8374 | **0,0001** |
| vWF aktivita | 0,8351 | **0,0002** |
| TRM | 0,5713 | **0,0354** |
| t - PA | 0,9215 | **0,0001** |
| PAI – 1 | 0,6906 | **0,0388** |
| ePCR | 0,9483 | 0,7214 |
| EMP | 0,8908 | 0,4447 |
| MMP – 2 | 0,6528 | 0,3056 |
| MMP – 9 | 0,9063 | **0,0003** |
| TIMP – 2 | 0,9357 | 0,8401 |

1. **Diskuze**
   1. **Vliv gravidity na systém hemostázy**

Osud těhotenství a stav plodu závisí rozhodující měrou 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 při něm 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 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, metalloproteinázy a jejich inhibitory, trombomodulin a endotelové mikropartikule s prokoagulační aktivitou.

* + 1. **Faktory prokoagulační**

V těhotenství stoupají signifikantně hladiny koagulačních faktorů II, V, VII, VIII 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. (79)

* + 1. **Faktory antikoagulační**

Systém přirozených inhibitorů koagulace hraje v udržení gravidity klíčovou roli. Solubilní forma trombomodulinu v plazmě může být využívána jako významný marker endotelového poškození. Hladina TRM v průběhu gravidity stoupá signifikantně v jednotlivých trimestrech, navíc náhlé zvýšení hladiny by mohlo indikovat závažnou placentární komplikaci gravidity. (80) V našem souboru jsme prokázali statisticky významný vzestup trombomodulinu mezi jednotlivými trimestry. Kromě trombomodulinu patří do systému přirozených inhibitorů protein S, jehož hladina v průběhu gravidity klesá, 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 (81) jsme prokázali vzestup hladiny EPCR během gravidity.

* + 1. **Fibrinolýza**

Aktivita fibrinolytického systému je v průběhu těhotenství redukována, zůstává snížena během porodu, ale promptně se vrací k normě bezprostředně po porodu. (82) Hladina tkáňového aktivátoru plazminogenu se během gravidity v našem souboru neměnila, tento výsledek je v souladu s literárními údaji. (83) Hladiny t-PA nejsou ovlivněny pouze vzestupem hladiny PAI-1, 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. (84) V našem souboru jsme v souladu s literárními údaji prokázali významný vzestup PAI -1 během gravidity.

* + 1. **Endotelové mikropartikule**

Fyziologické těhotenství je charakterizováno zvýšením hladiny jak destičkových, tak endotelových mikropartikulí. Jejich role v etiopatogenezi porodnických komplikací zůstává nejasná. (85) Vanwijk et al. prokázali, že mikropartikule u žen s preeklampsií, avšak nikoli zdravých těhotných, vyvolávají na izolovaných myometrálních arteriích poškození endotelu. (86) V souboru jsme ve shodě s literaturou prokázali tendenci k růstu endotelových mikropartikulí během těhotenství, ale bez statistické významnosti.

* + 1. **Systém metalloproteináz**

Rovnováha mezi MMP a TIMP hraje důležitou roli při cévní remodelaci, angiogenezi a vazodilataci během těhotenství. Porucha této rovnováhy souvisí s celou řadou závažných klinických stavů, v těhotenství pak zejména s hypertenzí a preeklampsií. 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 anti-MMP-2. Vzestup v plazmatické hladině metalloproteináz byl popsán také v průběhu fyziologické gravidity a je dáván do souvislosti s cévními změnami, které probíhají zejména na začátku gravidity. (87) V naší studii jsme pozorovali konstantně zvýšenou hladinu MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 bez signifikantní změny hodnot během celé gravidity.

## Soubory těhotných s preeklampsií a se syndromem HELLP

Patofyziologie preeklampsie je stále předmětem výzkumu. Předpokládá se dvoustupňový průběh onemocnění v závislosti na průběhu trofoblastické invaze a následné dysfunkci endotelových buněk. Jedná se o heterogenní onemocnění s velkou variabilitou klinických projevů a s rozdílným nástupem potíží.

Role dysfunkce endotelu v patofyziologii preeklampsie je v posledních letech živě diskutována. Placentární hypoperfůze s následnou reperfůzí 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 určitými rozdíly v patofyziologii preeklampsie s časným a pozdním nástupem.

V našem souboru jsme v souladu s literaturou prokázali jak ve skupině preeklampsie, tak ve skupině žen s chronickou hypertenzí, tak i ve skupině žen s HELLP syndromem signifikantně zvýšené hladiny antigenu i aktivity von Willebrandova faktoru oproti kontrolní skupině. (88) 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 preeklamptiček pravděpodobné, že zdrojem zvýšeného vWF je endotel. Zda je poškození endotelu primární příčinou či následkem těchto patologických stavů, není zatím jasné.

V našem souboru jsme 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 literárními údaji. Hladina trombomodulinu je signifikantně zvýšená u těhotných s preeklampsií, výše hladiny koreluje s tíží onemocnění. (81,89) Sériové vyšetření trombomodulinu lze využít k selekci žen, které by mohly profitovat z časné farmakologické intervence. (80)

Podobně jako trombomodulin je i endoteliální receptor proteinu C (EPCR) glykoprotein exprimovaný převážně na povrchu endotelových buněk cév a také v placentě. EPCR má klíčovou roli v antikoagulačním systému proteinu C. U obou markerů se uplatňuje poměrně rozsáhlá genetická variabilita. Mutace EPCR byly popsány především u pacientek s opakovanými těhotenskými ztrátami a těžkým poškozením placenty OR 4,0 (95% CI 1,1 – 14,9). (90) 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 preeklampsií zjištěn signifikantní nárůst průměrných hladin EPCR ve II. trimestru a dále tendence k nárůstu, avšak nesignifikantní, i v I. a III. trimestru. Tento výsledek je ve shodě s literaturou. (81)

Systém fibrinolýzy je dán rovnováhou řady faktorů: inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) společně s urokinázou a tkáňovým aktivátorem plazminogenu jsou primárními regulátory fibrinolýzy. Ve shodě s literárními údaji jsme neprokázali změny v hladinách t-PA v žádné skupině těhotných. (83) Kromě endotelu je t-PA produkováno i řadou dalších buněk, jako jsou fibroblasty a synoviální buňky, což může vysvětlovat rozdílné výsledky některých studií. Nesignifikantní rozdíl jsme pozorovali pouze ve skupině se syndromem HELLP ve III. trimestru. 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 ve skupině 7 pacientek s preeklampsií nebo růstovou retardací plodu ve 23. týdnu došli k podobným závěrům. (91) 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. (91)

Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 je považován za jeden z hlavních markerů endoteliální dysfunkce u preeklampsie. PAI-2 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 žen s rozvojem preeklampsie a signifikantně vyšší hladiny i u žen s chronickou hypertenzí (I. a III. trimestr, II. trimestr je těsně pod hranicí významnosti). 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 signifikatní výsledky pouze u žen s časnou formou preeklampsie, avšak nikoliv u pozdní formy. (92) Koncentrace a vzestup hladiny PAI-1 u žen s preeklampsií je v některých pracech potvrzen, v jiných naopak popírán. (92,93) To dokresluje složitost situace a výraznou heterogenitu tohoto onemocnění. Rozdílné výsledky mohou být ovlivněny geneticky podmíněným polymorfismem PAI-1, 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 a neutrofily.

Studie zaměřené na vyšetření mikropartikulí u pacientek s preeklampsií prokázaly sníženou hladinu destičkových a zvýšenou hladinu endotelových mikropartikulí ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých těhotných. (85) Snížení destičkových mikropartikulí u těchto pacientek pravděpodobně souvisí s absolutním poklesem trombocytů u preeklampsie. Endotelové mikropartikule odrážejí stav aktivace endotelu u preeklamptiček. Zvýšení mikropartikulí úzce koreluje s hladinou CRP, který v tomto případě funguje jako aktivátor komplementu. (94) V naší studii jsme však jednoznačný vzestup neprokázali, hladiny mikropartikulí se jak u zdravých těhotných, tak u těhotných s preeklampsií výrazněji neměnily. V metodice jsme zvolili vyšetření průtokovou cytometrií na základě imunotypizace s anti CD 144. Nesignifikantní vzestup oproti ostatním pracem by mohl být způsoben zaměřením na odlišný antigen ve srovnání s uvedenými pracemi. (86,95) 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 dysfunkci endotelu. 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 preeklamptiček a to jak s, tak bez mikropartikulí. Statisticky signifikantní efekt byl zaznamenán pouze při užití izolovaných mikropartikulí preeklamptiček. (86)

Složitý systém matrix metalloproteináz u pacientek s preeklampsií a hypertenzními chorobami byl předmětem zkoumání u řady studií. Poon et al. prokázali signifikantní prediktivní vztah u MMP 2 a 9 u těhotných s pozdějším rozvojem preeklampsie. (96) Palei et al. studovali vztah MMP 2, 9 a TIMP 2 v průběhu jednotlivých trimestrů. Signifikantní vzestup zaznamenali u MMP 9, ale nikoliv MMP2. (97) Podobné výsledky jsme zjistili i v našem souboru. Signifikantní byl vzestup MMP 9 ve II. trimestru a nesignifikantní tendence ke vzestupu byla zaznamenána i ve III. trimestru.

* 1. **Soubor těhotných chronických hypertoniček**

Hypertenze je systémové onemocnění provázené zvýšenou zátěží endotelu, jak potvrzuje např. nález zvýšených hladin vWF, t-PA a E-selektinu nebo zvýšených hladin vazokonstrikčně působících produktů endotelu endotelinu-1 a tromboxanu u hypertoniků ve srovnání s normotenzní populací. (98,99) Pro poškození endotelu u gravidních žen s těhotenstvím indukovanou hypertenzí ve srovnání s normotenzními gravidními ženami svědčí nález zvýšených hodnot trombomodulinu, vWF a E-selektinu, kdy se trombomodulin dokonce ukázal jako nezávislý prediktor rozvoje hypertenze v pokračujícím těhotenství. (100) V souladu s tímto jsme v našem souboru pozorovali významně zvýšenou endotelovou zátěž gravidních hypertoniček oproti ženám s fyziologickou graviditou, jak dokládá signifikantní vzestup antigenu i aktivity vWF, trombomodulinu a PAI-1 ve všech trimestrech.

* 1. **Soubor netěhotných žen – srovnání markerů aktivace endotelu u souboru žen bez prokázané trombofilie a souboru žen s trombofilním stavem**

Neprokázali jsme statisticky významné změny v parametrech markerů aktivace endotelu ve skupině netěhotných žen s Leidenskou mutací oproti kontrolní skupině netěhotných žen bez této mutace.

Prokázali jsme statisticky významné změny antigenu i aktivity vWF, TM a t-PA ve skupině žen s elevací F VIII mimo těhotenství. Bylo prokázáno, že jak F VIII, tak vWF jsou během tzv. „reakce akutní fáze“ (v rámci akutní či chronické infekce, při maligních onemocněních, po operacích nebo traumatech) zvýšeny ve stejné míře a je zachován jejich normální poměr. (101) Zvýšenou zátěž endotelu v této skupině tedy přičítáme spíše společné vyvolávající příčině elevace F VIII a aktivace endotelu než přímému vlivu hladiny F VIII na tyto parametry.

* 1. **Závěr**

Těhotenství vede k fyziologickému vystupňování prokoagulačních procesů, které jsou nezbytné pro správný vývoj fetoplacentární jednotky i jako ochrana před peripartálním krvácením. Dochází k hemodynamickým změnám, ke vzestupu koagulačních faktorů, potlačení aktivity přirozených antikoagulancií, změnám fibrinolytické aktivity a také aktivaci endotelu. V naší studii jsme se zaměřili na výzkum změn některých markerů aktivace endotelu. Potvrdili jsme hypotézu o výrazném vlivu gravidity na změny hladin těchto markerů. U některých markerů jsme rovněž nalezli ve shodě s očekáváním i literaturou významné rozdíly v jejich hladinách ve skupině žen s graviditou komplikovanou preeklampsií a HELLP syndromem v době jejich vzniku či krátce předtím. Za nejzásadnější nález považuji možný prediktivní potenciál trombomodulinu – hladiny tohoto parametru byly podle naší studie statisticky významně zvýšené ve skupině žen s pozdějším rozvojem preeklamsie již od začátku gravidity, tedy řadu měsíců před možností diagnostikovat toto onemocnění běžně dostupnými metodami.

Dále jsme nalezli signifikantní známky dysfukce endotelu ve skupině žen s preexistující hypertenzí, parametry celé řady vyšetřených markerů svědčily pro významně zvýšenou endotelovou zátěž gravidních hypertoniček, což potvrzuje nutnost přísné dispenzarizace těhotných žen s hypertenzní nemocí.

Neprokázali jsme významné změny v parametrech markerů aktivace endotelu vyvolané přítomností trombofilního stavu.

Do budoucna bude nutné další studium k určení klinického významu změn hladin markerů aktivace endotelu a zpřesnění jejich prediktivního potenciálu k určení rizika vývoje závažných komplikací těhotenství a tím možnosti jejich prevence a včasné terapie.

1. **Souhrn**

**Cíl studie:** Stanovit markery aktivace endotelu k odhalení stupně poškození endotelu během fyziologické gravidity, preeklampsie, HELLP syndromu a v těhotenství s chronickou hypertenzí. Posoudit vliv přítomnosti trombofilie na tyto parametry u žen mimo těhotenství.

**Metodika:**Vyšetřili jsme 403 těhotných žen s fyziologickou graviditou, 75 žen s chronickou hypertenzí, 33 žen s HELLP syndromem a 171 žen v období mimo graviditu. Parametry byly vyšetřovány metodikami: vWF Ag – EIA, t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, ePCR – ELISA,  MMP-2,9 – ELISA s fluorogenní detekcí, TIMP-2- ELISA, endoteliální mikropartikule – průtoková cytometrie, F VIII – modifikovaný APTT, Leidenská mutace a mutace protrombinu 20210 G-A – PCR.

**Výsledky:** Hladina antigenu vWF stoupala během celého těhotenství. Současně stoupala i aktivita vWF. Hladina trombomodulinu významně stoupala během gravidity, stejně jako solubilní forma EPCR. Hladina PAI – 1 stoupala během celého těhotenství, zatímco hladina t- PA se během gravidity významněji neměnila. Hladiny MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ani endotelových mikropartikulí se neměnily významně v jednotlivých trimestrech.

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 PAI-1 při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve II. a III. trimestru oproti skupině zdravých těhotných. V našem souboru jsme prokázali statisticky významné zvýšení hladin antigenu i aktivity vWF a EPCR ve skupině pacientek s HELLP syndromem oproti ženám z kontrolní skupiny zdravých těhotných ve srovnatelném stadiu gravidity.

V souboru žen s preexistující hypertenzí jsme prokázali statisticky významný rozdíl v hladinách antigenu vWF při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí, a to ve všech trimestrech oproti hladinám antigenu vWF ve skupině zdravých těhotných. Dále jsme v souboru žen s preexistující hypertenzí prokázali statisticky významný rozdíl v hodnotách aktivity vWF, a to ve II. a III. trimestru oproti hladinám aktivity vWF ve skupině zdravých těhotných, pozorovaný rozdíl hladin byl na hranici statistické významnosti. Rovněž jsme prokázali statisticky významný rozdíl hladin trombomodulinu při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí, a to ve všech trimestrech oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných. Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách PAI-1 při srovnání skupiny žen s chronickou hypertenzí, a to v I. a III. trimestru, ve II. trimestru byl rozdíl hladin na hranici statistické významnosti, oproti hladinám PAI-1 ve skupině zdravých těhotných.

Neprokázali jsme statisticky významné změny v parametrech markerů aktivace endotelu ve skupině žen s Leidenskou mutací oproti kontrolní skupině žen bez této mutace. Prokázali jsme statisticky významné změny vWF, TM a t-PA ve skupině žen s elevací F VIII mimo těhotenství, což ale přičítáme spíše společné vyvolávající příčině elevace F VIII a aktivace endotelu než přímému vlivu hladiny F VIII na tyto parametry.

**Závěr:** Potvrdili jsme hypotézu o výrazném vlivu gravidity na změny hladin celé řady markerů aktivace endotelu a statisticky významné rozdíly těchto markerů u žen, u nichž se vyvinula preeklampsie či HELLP syndrom oproti ženám s fyziologicky probíhající graviditou. Stejně tak jsme prokázali statisticky významný rozdíl některých markerů aktivace endotelu ve skupině žen s chronickou hypertenzí oproti skupině žen s fyziologickým těhotenstvím. V našem souboru přítomnost Leidenské mutace nijak neovlivnila vyšetřené markery aktivace endotelu.

**Klíčová slova:** endotel, těhotenství, aktivace, preeklampsie, trombofilie

1. **Summary:**

**The aim of the study:** To specify markers of endothelial activation and to reveal the degree of endothelium damage during physiological pregnancy, preeclampsia, HELLP syndrome and in pregnancy with chronic hypertension. To determine the influence of thrombophilia on these parametres in non-pregnant women.

**Methods:** We examined 403 women with physiological pregnancy, 75 women suffering from chronic hypertension, 33 women with HELLP syndrome and 171 non-pregnant women. Parametres were assessed by methods as follows: t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, vWF AG – EIA ePCR – ELISA, MMP-2,9 – ELISA with fluorogenic detection, TIMP-2 – ELISA, endothelial microparticules – flow cytometry, FVIII – modified APTT, Leiden mutation and prothrombine 20210 G-A mutation – PCR.

**Results:** The antigen of vWF level was rating during the whole pregnancy. Simultaneously also the activity of vWF was determined. Thrombomodulin level was increasing significantly during pregnancy as well as EPCR soluble form. PAI – 1 level was increasing during the whole pregnancy, t-PA level did not change remarkably during gravidity. MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and endothelial microparticules levels did not change considerably in particular trimestres.

We proved statistically significant difference in thrombomodulin levels when comparing group of women, who developed preeclampsia in the course of pregnancy with the group of healthy pregnant women, in all three trimestres, respectively. Further on we proved statistically significant difference in PAI-1 levels when comparing group of women, who developed preeclampsia in the course of pregnancy, with the group of heatlhy pregnant women in the second and third trimester, respectively. We proved statistically significant increase of antigen as well as vWF and EPCR activity in the group of patiens with HELLP syndrome when compared with women from the control group of healthy pregnant in the comparable stadium of pregnancy.

In the group of women with pre-existing hypertension we proved statistically signifiant difference when comparing antigen vWF levels in the group of women with chronic hypertension in all three trimesters, respectively, with antigen vWF levels in healthy pregnant group. Further on we proved in the group with pre-existing hypertension statistically signifiant diference in the vWF activity values in the second and third trimester, respectively when compared with the vWF activity levels in healthy pregnant group, the observed levels was on the border-line of statistical significance.

We also proved statistically significant difference in thrombomoduline levels when comparing thrombomoduline levels in women with chronic hypertension with thrombomoduline levels in healthy pregnant group in all trimestres, respectively. Further on we proved statistically significant difference in PAI-1 levels when comparing group of women with chronic hypertension with group of healthy pregnant in the first and third trimester and the diference in levels on the border-line of statictical significance.

We did not prove statistically significant changes in markers of endothelial activation parametres in group of women with Leiden mutation when compared with the control group of women without mutation. We proved statistically important changes of vWF, TM and t-PA in group of women with F VIII elevation off-pregnancy but we attribute the fact more likely to be common provoking cause of F VIII elevation and endothelial activation than the direct influence of VIII level on the parametres.

**Conclusion:** We confirmed the hypothesis on important influence of pregnancy on the alteration of levels of many activation endothelium markers and statistically significant differences in these markers in women, that developed preeclampsia or HELLP syndrome when compared with women with physiologically evolving pregnancy We also proved statistically significant diference in some endothelium activation markers in the group of women with chronic hypertension when compared with the group of women with physiological pregnancy. In our group the presence of Leiden mutation did not influence endothelial activation markers studied.

**Key words:** endothelium, pregnancy, activation, preeclampsia, thrombophilia

### Seznam obrázků, tabulek a grafů:

Obr. č. 1 - str. 14 Endotelová buňka

Obr. č. 2 - str. 19 Role endotelu v hemostáze

Tabulka č. 1 - str. 13 Produkty endotelových buněk

Tabulka č. 2 - str. 33 Prevalence významných vrozených trombofilií a riziko trombózy v graviditě

Tabulka č. 3 - str. 48 Srovnání hladin markerů aktivace endotelu v jednotlivých trimestrech – soubor žen s fyziologickou graviditou

Tabulka č. 4 - str. 57 Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s preeklampsií v jednotlivých trimestrech

Tabulka č. 5 - str. 58 Srovnání výsledků mezi jednotlivými trimestry u skupiny pacientek s preeklampsií

Tabulka č. 6 - str. 59 Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek se syndromem HELLP (odběr v akutní fázi onemocnění)

Tabulka č. 7 - str. 60 Srovnání jednotlivých parametrů ve skupině žen s HELLP syndromem, skupině žen s preeklampsií a skupině zdravých těhotných ve III. trimestru

Tabulka č. 8 - str. 61-62 Srovnání jednotlivých markerů aktivace endotelu u skupiny s preeklampsií oproti kontrolnímu souboru

Tabulka č. 9 - str. 69-70 Výsledky markerů aktivace endotelu u pacientek s chronickou hypertenzí v jednotlivých trimestrech

Tabulka č. 10 - str. 71-72 Srovnání markerů aktivace endotelu u chronických těhotných hypertoniček a těhotných s fyziologickou graviditou v jednotlivých trimestrech

Tabulka č. 11 - str. 74 Výsledky markerů aktivace endotelu u žen bez prokázané trombofilie, s Leidenskou mutací a výraznou elevací faktoru VIII

Tabulka č. 12 - str. 75 Srovnání markerů aktivace endotelu u žen s prokázaným trombofilním stavem a souborem žen bez trombofilie

Graf č.1 – str. 49 Antigen von Willebrandova faktoru

Graf č. 2 - str. 49 Aktivita von Willebrandova faktoru

Graf č. 3 - str. 50 Trombomodulin

Graf č. 4 - str. 50 Tkáňový aktivátor plazminogenu

Graf č. 5 - str. 51 Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1

Graf č. 6 - str. 51 Endoteliání receptor proteinu C

Graf č. 7 - str. 52 Endotelové mikropartikule

Graf č. 8 - str. 52 Metalloproteináza 2

Graf č. 9 - str. 53 Metalloproteináza 9

Graf. č. 10 - str. 53 Tkáňový inhibitor metalloproteináz 2

Graf č. 11 - str. 63 Antigen vWF – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 12 - str. 63 Aktivita vWF – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 13 - str. 64 Trombomodulin – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 14 - str. 64 Tkáňový aktivátor plazminogenu – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 15 - str. 65 Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 - kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 16 - str. 65 Endoteliální receptor proteinu C – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 17 - str. 66 Endotelové mikropartikule – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 18 - str. 66 Metalloproteináza 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 19 - str. 67 Metalloproteináza 9 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

Graf č. 20 - str. 67 Tkáňový inhibitor metalloproteináz 2 – kontroly, preeklampsie, HELLP sy

# Literatura

1. De Caterina R and Libby P: Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease. Blackwell Publishing, 2007, ISBN: 978-1-4051-2208-5: 3-32
2. von Recklinghausen F: Eine method, mikroskopische hohle und solide gebilde voneinander zu untersheiden. Virchow Arch, 1860, 19:451
3. P: Vacek Z: Embryologie. Grada Publishing, 2006, ISBN 80-247-1267-9: 54-55
4. Kvasnička J: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Grada Publishing, 2003, ISBN: 80-7169-993-4:22-29, 40-65, 99-113, 199-202
5. van Hinsbergh VWM: Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation. Semin. Imunopathol., 2012, 34(1): 93-106
6. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC: Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. Bioessays, 1994, 16:901-906
7. Aird WC: Phenotypic heterogenity of the endothelium II. Representative vascular beds. Circ Res, 2007, 100:174-190
8. Aird WC: Phenotypic heterogenity of the endothelium I. Structure, function, and mechanisms. Cir Res, 2007, 100:158-173
9. Aird WC: Endothelial cell heterogeneity. Critical Care medicine , 2003, 31:S221-S230
10. Pecka M: Laboratorní hematologie v přehledu- Fyziologie a patofyziologie hemostázy. 2004, ISBN 80-86682-03-X:22-24, 87-97, 113-118
11. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD: Postgraduate Hematology. Blackwell Publishing*,* 2005, ISBN: 1-4051-0821-5:787-807, 885-899
12. Blann AD: Assessment of endothelial dysfunction: Focus on atherothrombotic disease. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 2005, Vol. 34, ISSN 1424-8832
13. Ignarro LJ, Byrns RE, BUGA GM, et al: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res, 1987, 61:866-879
14. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological aktivity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987, 327:524-526
15. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine Nature, 1988, 333:664-666
16. Calles- Escandon J, Cipolla M:Diabetes and endothelial dysfunction: A clinical perspective. Endocrine Reviews , 2001, 22(1): 36-52
17. Griendling KK, Alexander RW: Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. FASEB J, 1996, 10:283-292
18. Fields CE, Makhoul RG: Vasomotor tone and the role of nitric oxide. Semin Vasc Surg, 1998, 11:181-192
19. McFarlane R, McCredie RJ, Bonney MA, et al: Angiotensin-converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with type 1 diabetes mellitus. Diabet Med, 1999, 16:62-66
20. Mombouli JV: ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide. Drugs 1997, 54, Suppl 5: 12-22
21. Cannon R: Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on endothelium. Clin Chem, 1998, 44:1808-1819
22. Marcum JA, Rosenberg RD: Anticoagulantly active heparin-like molekules from vascular issue. Biochemistry, 1984, 23:1730-1737
23. Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD: Acceleration of thrombin-antithrombin comlex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. J Clin Invest, 1984, 74:341-350
24. Broze Jr GJ: Tissue factor pathway inhibitor. Thromb Haemost, 1995, 74:90-93
25. Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP: Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiological and pathological conditions. Thromb Haemost, 1995, 73:873-875
26. Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW: Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. Blood, 1986, 67:362-365
27. Feistritzer C, Riewald M: Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor -1 crossactivation. Blood, 2005, 105:3178-3184
28. Niessen F, Furlan-Freguia C, Fernandes JA: Endogenous EPCR/aPC-PAR1 signaling prevents inflammation – induced vascular leakage and lethality. Blood, 2009, 113:2859-2866
29. Bae JS, Yang LK, Rezaie AR: Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104:2867-2872
30. Cao CZ, Gao YM, Li Y, Antalis TM, Castellino FJ, Zhang L: The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD 11b. J Clin Investig, 2010, 120:1971-1980
31. Sen P, Gopalakrishnan R, Kothari H, et al: Factor VIIa bound to endothelial cell protein C receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. Blood, 2011, 117:3199-3208
32. Berriman JA, Li S, Hewlett LJ, et al: Structural organization of Weibel-Palade bodies revealed by cryo-EM of vitrified endothelial cells. Proc Natl Aca Sci USA, 2009, 106:17407-17412
33. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, et al: Functional architecture of Weibel-Palade bodies. Blood, 2011, 117(19):5033-5043
34. Turner NA, Nolasco L, Ruggeri ZM, et al: Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. Blood, 2009, 114:5102-5111
35. Valentijn KM, Driel LF, Mourik MJ, et al: Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelials cells. Blood, 2010, 116:1807-1816
36. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol, 1989, 134:1087-1097
37. Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, et al: Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. Circulation, 1996, 94:1226-1232
38. Taubman MB, Fallon JT, Schecter AD, et al:Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. Thromb Haemost, 1997, 78:200-204
39. Colluci M, Balconi G, Lorenzet R,et al: Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. J Clin Invest, 1983, 71:1893-1896
40. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, et al: Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant aktivity in human vascular endothelial cells. J Exp Med, 1984, 160:618-632
41. Mulder AB, Hegge-Paping KS, Magielse CP, el al: Tumor necrosis factor alpha-induced endothelial tissue factor is located on the cell surface rather than in the subendothelial matrix . Blood, 1994, 84:1559-1566
42. Levin EG, Santell L: Association of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with growth substratum and membrane of human endothelial cells. J Cell Biol, 1987, 105:2543-2549
43. Medcalf RL: Fibrinolysis, inflammation and regulation of the plasminogen activating systém. J Thromb Haemost, 2007, 5:132-142
44. Emeis JJ, vanden Eijnden Schrauwen Y, vanden Hoogen CM, et al: An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen aktivátor. J Cell Biol, 1997, 139:245-256
45. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, et al: Vascular endothelial growth factor receptor -2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. Circ Res, 2004, 94:1562-1570
46. van Hinsberg VWM, Engelse MA, Quax PHA: Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26:716-728
47. Connolly BM, Choi EY, Gardsvoll H et al: Selective abrogation of the uPA-uPAR interaction in vivo reveals a novel role in suppresion of fibrin-associated inflammation. Blood, 2010, 116:1593-1603
48. Bajzar L, Morser J., Nesheim M: TAFI, or plasma procarboxypeptidase b, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. J Biol Chem 1996, 271:16603-16608
49. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, et al: Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Heatlh Promotion Project. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17:1121-1127
50. Parmar KM, Larman HB, Dai GH, et al: Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel like factor 2. J Clin Investig, 2006116:49-58
51. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, et al: Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. Circ Res, 2005, 96:e48-e57
52. Dekker RJ, Thienen JV, Rohlena J, et al: Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. Am J Pathol, 2005, 167:609-618
53. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, et al: Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels – Implication for the control of the protein C pathway. Circulation, 1997, 96:3633-3640
54. Masopust J: Patogeneze aterosklerozy, www.stefajir.cz/medicina
55. Hadi AR, Al Suwaidi J: Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Vasc Health Risk Manag., 2007, 3(6): 853-876
56. Pilka R, Hrachovec P: Matrix metaloproteinázy a menstruace. Česká gynekologie*,* 2003, 68:36-40.
57. H: Binder T, Salaj P, Vavřinková B: Hematologické nemoci a poruchy v porodnictví a gynekologii. Triton, 2004, ISBN 80-7254-540-X: 13-16
58. Szecsi PB, Jөrgensen M, Klajnbard A, et al: Haemostatic reference intervals in pregnancy, Thromb and Haemost, 2010, 103:718-727
59. Bick RL et al.: Hematological complications in obstetrics, pregnancy, and gynecology. Cambridge University Press, 2006, ISBN 978-0-521-83953-2:122-148
60. Holmes VA, Wallace JMW: Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? Biochemical Society Transactions, 2005, Vol. 33, part 2:428-432
61. Kitchens CS, Alving BM, Kessler CM: Consultative Hemostasis and Thrombosis. W.B. Saunders Company, An Imprint of Elsevier Science, 2002, ISBN 0-7216-8264-2
62. Dөrup I, Skajaa K, Sөrensen KE: Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium – dependent flow – mediated vasodilatation. Am. J. of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 1999, 276(3): 821-825
63. Greer IA: The special case of venous thromboembolism in pregnancy. Haemostasis, 1998, 28(Suppl.3)
64. Bick RL: Introduction to thrombosis: proficient and cost- effective approaches to thrombosis. Hematology Oncology Clinics North Amerika, 2003, 17(1)
65. Krabbendam I, Dekker G: Pregnancy outcome in patients with a history of recurrent spontaneous miscarriages and documented thrombophilias. Obstet. Gynecol. Surv., 2004, 59(651)
66. Bick RL: Syndromes of thrombosis and hypercoagulability. Current Concepts of Thrombosis, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1998, vol.82, 409
67. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, et. al: The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. Ann. Int. Med., 1996, 125:1
68. Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW et al.: Prothrombin and factor V mutation in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. New. Engl. J. Med., 2000, 342: 374-380
69. McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, et al: Risk factors for pregnancy associated venous thrombembolism. Thromb and Heamost, 1997, 78:1183-1187
70. McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, et al: Risk factors for pregnancy associated venous thrombembolism. Thromb and Heamost, 1997, 78:1183-1187
71. McColl MD, Ellison J, Reid F, et al: Prothrombin 20210 G-A, MTHFR C677T mutations in women with venous thrombembolism associated with pregnancy. British Journal of Obstetrics and Gynecology, 2000, 107:565-569
72. Penka M, Tesařová E, a kol: Hematologie a transfuzní lékařství I. Grada, 2011, ISBN 978-80-247-3459-0: 271-274
73. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I: Thrombophilic disordes and fetal loss: a meta-analysis. The Lancet, 2003, 361: 901-908
74. Rofger MA, Betancorurt MT, Clark P, Lindquist PG, Dizon-Townson D et al.: The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta – mediated pregnancy complications: A systematic review and meta – analysis of prospective cohort studies. Plos Medicine, 2010, 7(6): e1000292
75. Dizon-Townson DS, Meline L., Nelson LM, Varner M, Ward K: Fetal carries of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177: 405-405
76. Lyall F, Belfort M: Pre-eclampsia. Etiology and clinical practice. Cambridge University Press, 2007, ISBN 13 978-0-521-83189-5: 3-31, 325-335, 369
77. Šimetka O, Brychtová P, Procházková J, Procházka M: Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP. Gynekolog, 2008, 2:48-53
78. Hájek Z a kol.: Rizikové a patologické těhotenství. Grada, 2004, ISBN 80-247-0418-8:115-116
79. Greer IA, Ginsberg J, Forbes CHD: Women҆s Vascular Health. Hodder Arnold, 2007, ISBN 13 978-0-340-809976: 85-102
80. Boffa MC, Valsecchi L, Fausto A: Predictive value of plasma thrombomodulin in preeclampsia and gestational hypertension. Tromb Haemost, 1998, 79:1092-1095
81. Brenner B: Haemostatic changes in pregnancy. Thrombosis Research, 2004, 114: 409-414
82. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW: Haemostasis in normal pregnancy. Thromb Haemost 1984, 52:176-182
83. Ishii A, Yamada R, Hamada H: t-PA activity in peripheral blond obtained from pregnant women. J Perinat Med, 1994, 22:113-117
84. Bremme K, Ostlund E, Almquist I: Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in the normal pregnancy and the puerperium. Obstet Gynecol, 1992, 80:132-137
85. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes VD, Ercole C, Dignat-George F: Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy complicated by preeclamsia or intrauterine growth restriction. Thromb Haemost, 2003, 89:486-492
86. VanWijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E, Kublickiene KR: 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: 1686-1693
87. Raffaetto JD, Khalil RA: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol. 2008 Jan 15;75(2): 346-59
88. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sinaj BM: Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 202-3
89. 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):135-9
90. Franchi F, Biguzzi E, Cetin I, Facchetti F, Radaelli T, Bozzo M, Pardi G, Faioni EM: Mutations in the thrombomodulin and endothelial protein C receptor genes in women with late fetal loss. Br J Haematol. 2001 Sep; 114(3):641-6
91. Hunt BJ, Missfelder-Lobos H, Parra-Cordero M, Fletcher O, Parmar K, Lefkou E, Lees CC: Pregnancy outcome and fibrinolytic, endothelial and coagulation markers in women undergoing uterine artery. Doppler screening at 23 weeks. J Tromb Haemost 2009 (7): 955-61
92. Wilkström AK, 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; 201:597.e1-8
93. Halligan A, Bonnar J, Sheppard B, Darling M, Walse J: Heamostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 1994; 101:488-92
94. Toth B: Mikropartikel in der Frauenheilkunde. Hämostaseologie 2009; 29, s 46-50
95. Gonzáles-Quintero VH, Jiménez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, OˋSullivan MJ, Ahn Y: Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2003; 189:589-93
96. Poon LC, Nekrasova E, Anastopoulos P, Livanos P, Nikolaides KH: First trimester serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adverse pregnance outcome. Prenat. Diagn. 2009 Jun;29(6):553-9
97. 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 Jul;41(10-11):875-80
98. Petrák O, Widimský JJr., Zelinka T, Kvasnička J et al.: Biochemical markers of endothelial dysfunction in patients with endocrine and essential hypertension. Physiol. Res., 2006, 55: 597-602
99. Sainani GS, Vibhuti GM: Role of endothelial cell dysfunction of essential hypertension. www.japi.org, 2004, Vol 52: 966-969
100. Nadar SK, Yemeni EA, Blann AD, Lip GYH: Thrombomodulin, von Willebrandfactor and E-selektin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. Thrombosis Research, 2004, Vol 113, Issue 2:123-128
101. Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Bertina RM: Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2001, 21: 731-738
102. **Přílohy**

**10.1. 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. Abuzus drog

*Osobní anamnéza:*

1. Hypertenze před těhotenstvím      2. Anamnéza trombembolické 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

* 1. **Informovaný souhlas**

Paní:                                  Narozena:

Souhlasím se zařazením do studie organizované Porodnicko - gynekologickou klinikou, Hemato-onkologickou klinikou FN a LF UP Olomouc a Ústavem pro péči o matku dítě, Praha. Jedná se o práci zaměřenou na zjištění výskytu biochemických změn a poruch krevního srážení u některých porodnických komplikací. Vyšetření se provede odběrem a následným zpracováním žilní krve, která Vám bude odebrána současně  s běžnými těhotenskými odběry a dále mezi 24.- 28.týdnem a ve III.trimestru. Součástí výzkumu je i krátký přiložený dotazník, který s Vámi vyplníme. Pokud budete mít zájem, písemně Vás seznámíme s výsledky nálezů.

Potvrzuji,že mne MUDr.                               seznámil/a s podmínkami účasti ve studii. Souhlasím, aby mé údaje byly použity pro účely vyhodnocení studie a publikaci výsledků. Byla jsem seznámena s možností ze studie kdykoliv vystoupit a ukončit tak svoji účast.

 V Olomouci dne                                  Jméno a příjmení (hůlkovým písmem)

                                                            Podpis:

 Podpis zařazujícího lékaře:

* 1. **Publikace** 
     1. **Práce související s tématem dizertační práce:**

Přehledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

The pathophysiology of endothelial function in pregnancy and the usefulness ofendothelial markers

Slavík L., Procházková J., Procházka M., Šimetka O., Hluší A., Úlehlová J., Biomedical Papers Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc, 2011, Dec., 155(4), p 219-224, ISSN 1213-8118

IF 0,702

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Dysfunkce endotelu u těhotných s chronickou formou hypertenze

Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Dhaifalah I., Lubušký M., Šimetka O., Česká Gynekologie, 2013, č.2, ISNN 1210-7832

Monitorování hladin markerů aktivace endotelu během fyziologické gravidity

Procházková J., Dhaifallah I., Měchurová A., Pilka R, Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušký M.,Procházka M., Česká Gynekologie, 2010, č.2, s. 92-100, ISNN 1210-7832

Detection of MMP-2 and MMP-9 in normal uncomplicated pregnancy

Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, Mechurova A., Medimond, International Proceedings, 2008, p 57-60, ISBN 978-88-7587-423-0

Průběh a výsledky 34 těhotenství komplikovaných syndromem HELLP

Šimetka O., Michalec I.**,** Zewdiová H., Kolářová R., Procházková J., Procházka M.**,** Česká Gynekologie, 2010, č.3, s. 242-247, ISNN 1210-7832

Syndrom HELLP – průběh onemocnění a aktivita markerů aktivace endotelu

Šimetka O., Procházková J., Gumulec J., Michalec I., Zewdiová H., Kolářová R., ProcházkaM.: Vnitřní lékařství 2010, č. 56 (Suppl 1), s. 98-103, ISSN 0042-773X

Přehledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Markery aktivace endoteliálních buněk – možnosti jejich vyšetření a klinický význam

v gynekologii a porodnictví

Procházková J., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Brychtová P., Procházka M.

Česká gynekologie, 2009, 74, č. 4, s. 279-281, ISNN 1210-7832

Diagnostika a léčba žilní trombozy v těhotenství

Procházková J., Medicína po promoci, 2008, č. 4, s. 35-37, ISSN 1212-9445

Antitrombotická terapie v graviditě

Procházka M., Procházková J:, Slavík L., Vnitřní lékařství, 2010, č. 56(2), s. 130-137, ISSN 0042-773X

Mikropartikule

Slavík L., Úlehlová J., Hluší A., Procházková J., Procházka M., Krčová V., Indrák K., Vnitřní lék 2010, 56 Suppl 1, s 112-116,ISSN 0042-773X

Nové léky v prevenci a léčbě trombóz

Krčová V., Procházková J.,Postgraduální medicína, 2010, 12, č. 6, s. 735-737, ISSN 1212-4184

Antitrombotická terapie v graviditě

Procházka M., Procházková J., Slavík L., Postgraduální medicína, 2010,12, č. 2, s. 43-49, ISSN 1212-4184

Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics

Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Procházka M., Úlehlová J., Indrák K.

Biomedical Papers Medical Faculty University Palacky Olomouc, 2009, 153(1)

Molekulární metody v diagnostice trombofilních stavů

Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Úlehlová J. Vnitřní lékařství 2009, 55, č. 3, s. 302-309, ISSN 0042-733X

Laboratorní změny aktivace endotelu u syndromu HELLP

O. Šimetka, P. Brychtová, J. Procházková, M. Procházka; Gynekolog, 2008, ročník 17, č. 2, s. 54-56

Tromboembolická nemoc v porodnictví

Procházka M., Krčová V., Procházková J., Lubušký M., Praktická gynekologie 2003, č. 6, s. 9-13.

Kapitoly v monografiích

Hormonální terapie a trombofilní stavy

Procházka M., Procházková J., Sexuologie pro urology a gynekology, Turčan P., Pokorný P., Fait T., Maxdorf Jessenius, Praha, 2012, kap. 10.2., s. 216-221, ISBN 978-80-7345-291-9

Publikovaná abstrakta

Thrombin generation test in pregnancy

Procházka M., Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Lattová V., Lubušký M., Pilka R., The 4th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 2/2011, Berlin, Germany, Thrombosis Research, 2011, Vol. 127, suppl. 3, ISSN 0049-3848, poster, abstrakta

Markery aktivace endotelu během fyziologické gravidity, preeklampsie, u těhotenství při chronické hypertenzi a u diabetiček

Procházková J., Dhaifallah I., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušký M., Procházka M., Vaskulárna medicína, XVII. Slovensko – česká konferenci o hemostáze a trombóze, Martin, 5/2010, poster, abstrakta

Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou

Procházková J., Hluší A., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušký M., Procházka M., Vaskulárna medicína, XVII. Slovensko – česká konferencia o hemostáze a trombóze, Martin, 5/2010, poster, abstrakta

Stanovení trombogenního potenciálu mikropartikulí v těhotenství

Slavík L., Procházka M., Úlehlová J., Procházková J., Hluší A.: Vaskulárna medicína, sborník abstrakt, XVII. Slovensko – česká konferenci o hemostáze a trombóze, Martin, 5/2010, ISSN 1338-0214, poster, abstrakta

Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou

Lattová V., Slavík L., Úlehlová J., Procházková J., Pilka R., Procházka M., Transfuze a hematologie dnes, XXIV. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, ISSN 1213-5763, 6/2010, poster, abstrakta

Markery aktivace endotelu během fyziologické gravidity a těhotenství s rozvojem preeklampsie

Procházková J., Dhaifallah I., Šimetka O., Měchurová A., Pilka R., Lubušký M., Slavík L., Úlehlová J., Lattová V., Procházka M., Transfuze a hematologie dnes, XXIV. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 6/2010, poster, abstrakta

Trombin generation test in pregnancy

Procházková J., Hluší A., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušký M., Procházka M., 21th International Congress on Thrombosis, Milan, 7/2010, poster, abstrakta

Endothelial activation markers during physiological pregnancy

Procházka M., Procházková J., Měchurová A., Slavík L., Úlehlová J., Lubušký M., 21th International Congress on Thrombosis, Milan, 7/2010, ISBN 978-3-8055-9388-5, ISSN 1424-8832, poster, abstrakta

The measurement of thrombogenic potential of microparticles in pregnancy

Slavík L., Procházka M., Úlehlová J., Krčová V., Procházková J., Hluší A., 21th International Congress on Thrombosis, Milan, 7/2010, ISBN 978-3-8055-9388-5, ISSN 1424-8832, poster, abstrakta

Markers of endothelial activation in high risk pregnancies

Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Šimetka O., Měchurová A., Placenta, 2009, Vol. 30, Issue 9, 13th EPG Konference, Adelaide, 10/2009, poster, abstrakta

The significance of endothelial markers activation in the prediction of subsequent development of preeclamsia   
M. Procházka, J. Procházková, R. Pilka, L. Slavík, J. Úlehlová, A. Mechurová, O.Šimetka, XXI. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2009,Boston, J Tromb Haemost Volume 7, Suplement 2, ISSN 1538-7836, poster, abstrakta

Markery aktivace endotelu u rizikových těhotenství

Procházková J., Procházka M., Slavík L.,Úlehlová J., Pilka R., Měchurová A., Šimetka O., XVI. Česko-slovenská konference o hemostáze a trombóze, Hradec Králové, 5/2009, poster, abstrakta

Markers of endothelial activation in the prediction of subsequent development of preeclampsia

J.Procházková, L.Slavík, J.Úlehlová, M. Procházka, R.Pilka, I.Dhaifalah, A. Měchurová,

XIVth congress of the European Hematology Association, Berlin, 6/2009, Haematologica,the hematology journal,2009/S2, ISSN 0390-6078, abstrakta

Prokoagulační potenciál mikropartikulí u pacientů s trombofilií

L. Slavík, A. Hluší, V. Krčová, J. Procházková, J. Úlehlová, N. Klusová, XV. Slovensko-česká konferenci o hemostáze a trombóze, Martin, Slovenská Republika, 5/2008, ISBN 978-80-223-2478-6, poster, abstrakta

Detection of MMP-2 and MMP-9 in normal uncomplicated pregnancy

Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, 20th International Congress on Thrombosis, Athens, Greece, 6/2008, ISBN 978-3-8055-8633-7, poster, abstrakta

Influence of platelet microparticles on thrombin generation test in thrombophilia patients

A. Hluší, L. Slavík, V. Krčová, J. Procházková, J. Úlehlová, N. Klusová,

20th International Congress on Thrombosis, Athens, Greece, 6/2008, ISBN 978-3-8055-8633-7, poster, abstrakta

Factor V Leiden andplacental pathology

M. Procházka, R. Laurini, K. Maršál, J. Procházková, P. G. Lindqvist, XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneve 7/2007, J Tromb Haemost, ISSN 1538-7836, poster, abstrakta

HELLP syndrom- terapeutické možnosti

Procházková J., Procházka M., Krčová V., Lubušký M., Hluší A., Látalová E.

XIV. Slovensko-český hematologický a transfuziologický sjezd s mezinárodní účastí, 9/2005, Štrbské pleso, SR, poster, abstrakta

Změny hladiny faktoru VIII v časném poporodním období

Procházková J., Procházka M., Krčová V., Slavík L., Lubušký M., Hrachovec P., Zielina P., s. 41, XVIII. Olomoucké hematologické dny, 6/2004, poster, abstrakta

Factor VIII levels in the early pospartum period.

Procházka M., Slavík L., Procházková J., Hrachovec P., Krčová V., Zelina P., 18th International Congress on Thrombosis, Ljubljana, Slovenia , June 20 -24, 2004, poster, abstrakta

Přednášky/postery na veřejných odborných fórech přednesené autorem práce

Antitrombotická profylaxe v těhotenství

Procházková J. a spol., Přednáškový večer Spolku lékařů v Olomouci, 4/2009, přednáška

HELLP syndrom z pohledu hematologa

Procházková J.

Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť Střední a Severní Moravy, 11/2005, přednáška

* + 1. **Ostatní publikace:**

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Mikroangiopatická hemolytická anemie jako vůdčí projev pokročilého nádorového onemocnění

J. Procházková, A. Hluší, D. Kurfürstová, K. Indrák, Praktický lékař, 2007, 87, 12, 11, s. 673-675, ISSN 0032-6739

Idiopatická trombocytopenická purpura v těhotenství refrakterní na farmakoterapii- kazuistika

Procházková J., Procházka M., Papajík T., Látalová E., Hluší A., Lubušký M., Neoral Č., Geierová M.

Transfuze a hematologie dnes, 2006, č. 2, ISSN 1213-5763

Trombocytopenie v graviditě

P. Brychtová, O. Šimetka, J. Procházková, M. Procházka

Gynekolog, 2009, č. 1

Kombinovaná chelatační léčba u pacienta s myelodysplastickým syndromem a vrozenou hemochromatózou

J. Vondráková, J. Procházková, K. Indrák, L. Kučerová

Praktický lékař, 2008, 88, 3, s. 166-168, ISSN 0032-6739

Aspergilóza plic - fatální komplikace u pacienta s akutní promyelocytární leukémií

Hubáček J., Procházková J., Kučerová L., Indrák K.

Praktický lékař, 2006, 86, č.5, ISSN 0032-6739

Přehledné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Problematika krvácivých chorob v porodnictví

Procházková J., Procházka M., Lubušký M.,Česká Gynekologie, 2013, č.1, s. 83-88, ISNN 1210-7832

Současné možnosti laboratorní diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie

Slavík L., Svobodová G., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J.: Transfuze a hematologie dnes, 2012, č.2, s. 76-80, ISSN 1213-5763

Terapie imunitní trombocytopenie v graviditě

Hluší A., Procházková J., Krčová V., Indrák K.: Vnitřní lék 2010, 56 Suppl 1, s. 78-80

Idiopatická trombocytopenická purpura

Raida L., Hluší A., Procházková J., Juráňová J.: Praktický lékař, 2008, 88, 12, s. 690-694

ISSN 0032-6739

Komplikace dlouhodobé léčby heparinem v těhotenství

Krčová V., Procházka M., Krč I., Procházková J., Slavík L.:

Interní medicína pro praxi 2003/4, s.199 – 201

Anémie v těhotenství

Procházka M., Procházková J.

Praktická gynekologie, 2003, č.3

Kapitoly v monografiích

Cerebral Venous Thrombosis in Patients Using Oral Contraceptives (Chapter 7)

Procházka Václav, Procházka Martin, Ľubušký Marek, Procházková Jana and Hrbáč Tomáš, Venous Thrombosis – Principles and Practice, Edited by Ertugrul Okuyan, ISBN 978-953-307-885-4, Hard cover, 232 pages, Publisher: InTech, Published: January 05, 2012 under CC BY 3.0 license, in subject Cardiology and Cardiovascular Medicine

Publikovaná abstrakta

Antifosfolipidový syndrom jako primomanifestace systémového onemocnění pojiva

Procházková J., Žurek M., Indrák K., III.ročník Olomouc kazustická, Olomouc, 11/2012, přednáška, abstrakta

Thrombin generation test in neonates

Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, Lattova V, and Pilka R., 56. Jahrestagung der Gesellschaft für Hämostaseund Trombose Forschung e.V. St. Gallen, 2/2012, Hämostaseologie Jan. 2012, poster, abstrakta

Heparin-induced thrombocytopenia diagnosis with multiple electrode aggregometry

Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J., XXIII Congress The International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2011, Kjoto, Japan, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, Vol. 9, suppl. 2,ISSN 1538-7836 , poster, abstrakta

Assessment of thrombin generation in primary thrombophilia and acquired risk factors for venous thrombembolism

Hluší A., Slavík L., Úlehlová J., Procházková J., Krčová V., XXIII Congress The International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2011, Kjoto, Japan, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, Vol. 9, suppl. 2,ISSN 1538-7836 , poster, abstrakta

Thrombin generation test in neonates

Procházka M., Procházková J., Lattová V., Slavík L., Úlehlová J., Pilka R., XXIII Congress The International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2011, Kjoto, Japan, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, Vol. 9, suppl. 2,ISSN 1538-7836 , poster, abstrakta

Prevalence výskytu HIT na základě využití moderních agregačních metodik

Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Česko-slovenská konference o tromboze a hemostáze, Hradec Králové, 5/2011, Transfuze a hematologie dnes, 2011, č 1., ISSN 1213-5763, poster, abstrakta

Thrombin generation test in neonates

Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, Lattova V, and Pilka R., 10th World Congress in Fetal Medicine, 6/2011, Malta, poster, abstrakta

Are high levels of coagulation factors IX and XI risk factor of thrombofilia

Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., 21th International Congress on Thrombosis, Milan, 7/2010, ISBN 978-3-8055-9388-5, ISSN 1424-8832, poster, abstrakta

The correlation of the mutation status PAI -1 4G/5G with plasmatic aktivity PAI-1 and TPA, Slavík L., Úlehlová J., Divoká M., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Vlachová I., 21th International Congress on Thrombosis, Milan, 7/2010, ISBN 978-3-8055-9388-5, ISSN 1424-8832, poster, abstrakta

Zvýšená hladina koagulačních faktorů jako riziko trombofilie

Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Vaskulárna medicína, sborník abstrakt, XVII. Slovensko – česká konferenci o hemostáze a trombóze, Martin, 5/2010, ISSN 1338-0214, poster, abstrakta

The effect of lupus anti-coagulans on anti-coagulant therapy monitoring

Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J.: XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2009, Boston, J Tromb Haemost Volume 7, Suplement 2, ISSN 1538-7836, poster, abstrakta

Laboratory monitoring of dabigatran dutiny orthopedic surgery

Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Čech L.: XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2009, Boston, J Tromb Haemost Volume 7, Suplement 2, ISSN 1538-7836, poster, abstrakta

Úspěšná terapie refrakterní TTP monoklonální protilátkou anti CD 20, kazuistika

Procházková J., Hluší A., Klusová N., Slavík L., Úlehlová J.

XXIII. Olomoucké hematologické dny, 6/2009, abstrakta

Stanovení základních parametrů koagulace, proteinu C, a volného proteinuS u nezralých novorozenců

Procházková J., Procházka M., Kantor L., Hálek J., Lubušký M.,Slavík L., Hluší A., Kilián T., Krčová V.: XXI. Olomoucké hematologické dny, 6/2007, Olomouc, poster, abstrakta

Vybrané krvácivé stavy v gynekologii porodnictví

M.Procházka, J.Procházková,M.Lubušký, XIII. Pařízkovy dny, 3/2007, Nový Jičín, přednáška, abstrakta

Cerebral vein thrombosis in oral contraceptive (OCP) users

M.Procházka, V. Procházka, D. Maděřič, J. Procházková, M. Lubušký, The 2nd International Symposium on Women´s Health Issues in Thrombosisand Haemostasis, Vienna, 2/2007, poster, abstrakta

Retrievable Gunther Tulip Vena Cava Filter in prevention of pulmonary embolism in patiens indicated to obstetric operation

M. Procházka, M.Kocher., E.Buriánková,J. Procházková, V.Krčová, M.Černá, M. Lubušký. The 2nd International Symposium on Women´s Health Issues in Thrombosisand Haemostasis,

Vienna, 2/2007, poster, abstrakta

Hodnocení účinnosti profylaktických dávek LMWH měřením aktivity anti Xa u pacientek podstupujících porod císařským řezem či vaginální hysterektomii

Procházková J,. Procházka M., Lubušký M., Zahradníčková V., Slavík L., Krčová V., XX. Olomoucké hematologické dny 6/2006, ISBN 80-7346-065-3, poster, abstrakta

Cerebral veins thrombosis in oral contraceptive (OCP) users

Procházka M., Procházka V., Maderic D., Prochazkova J., Lubušky M., 19th International Congress on Thrombosis, Tel-Aviv, Izrael, 5/2006, Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis ISBN 3-8055-811-4, 35(1-2), poster, abstrakta

Anti Xa aktivity after LMWH thromboprophylaxis in patiens undergoing caesarea sedtion and vaginal hysterectomy

Prochazkova J., Prochazka M., Lubusky M., Zahradníčkova V., Slavik L., Krcova V., 19th International Congress on Thrombosis, Tel-Aviv, Izrael, 5/2006, Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis ISBN 3-8055-811-4, 35(1-2), poster, abstrakta

Idiopatická trombocytopenická purpura v těhotenství refrakterní na farmakoterapii – kazuistika

Procházková J., Procházka M., Papajík T., Látalová E., Hluší A., Lubušký M., Neoral Č., Generová M. XIX. Olomoucké hematologické dny, 6/2005, Olomouc, ISBN 80-7346-051-3, poster, abstrakta

Plicní aspergiloza u pacienta s APL- kazuistika

Hubáček J., Procházková J., Indrák K., XIX. Olomoucké hematologické dny, 6/2005, Olomouc, ISBN 80-7346-051-3, poster, abstrakta

Přednášky/postery na veřejných odborných fórech přednesené autorem práce

Méně časté a vyloženě vzácné krvácivé choroby v graviditě

J. Procházková, M. Procházka, A. Hluší, V. Krčová, Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy, Prostějov, 11/2010, přednáška

Anamnéza jako nezbytná součást diagnostiky krvácivých a trombotických chorob

J. Procházková, A. Hluší, J. Úlehlová, L. Slavík, K. Indrák, Přednáškový večer Spolku lékařů v Olomouci, 4/2010, přednáška

Případové studie

Procházková J., Klusová N., Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť Střední a Severní Moravy, Prostějov, 11/2008, přednáška