

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Antropologie a genetiky člověka



Bc. Lenka Dvořáková

**Význam proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice
těhotenských komplikací**

**Heat shock proteins - their role in diagnosis and prognosis of pregnancy
related complications**

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2013

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma *Význam proteinů tepelného šoku v diagnostice a prognostice těhotenských komplikací* vypracovala pod vedením prof. RNDr. Ilony Hromadníkové, Ph.D. samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31. 7. 2013

.....
Lenka Dvořáková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. a své kolegyni v laboratoři, Mgr. Kateřině Kotlabové, za metodické vedení a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za příjemné pracovní prostředí. Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu při studiu a vypracovávání práce.

Tato diplomová práce byla vypracována na Oddělení molekulární biologie a patologie buňky, 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a byla finančně podpořena grantem 264705/SVV/2012.

Abstrakt

Proteiny tepelného šoku zvyšují svou genovou expresi po vystavení buňky, respektive organismu, určité formě stresu, kterou může být vysoká teplota, infekce, zánět, hypoxie, nedostatek živin nebo vody. Stresovou situací pro organismus jsou i těhotenské komplikace související s placentární insuficiencí – preeklampsie a intrauterinní růstová retardace, ale i další těhotenské komplikace jako fetální růstová retardace a gestační hypertenze. Proto jsem také ve své diplomové práci zjišťovala, zda má výskyt těhotenských komplikací (preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze) vliv na genovou expresi proteinů tepelného šoku.

Detekovala jsem 5 hsp systémů, kterými byly Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1. Detekci jsem prováděla na vzorcích placentární tkáně a plné periferní krve matky. K dispozici jsem měla vzorky jak od žen s fyziologickým průběhem těhotenství, tak od žen, u kterých se během gravidity vyvinula určitá komplikace (PE, FGR, GH). Ze vzorků jsem izolovala RNA. Detekce hsp exprese byla provedena pomocí RT-PCR v reálném čase s využitím komparativní Ct metody. Zjišťovala jsem změny genové exprese testovaného vzorku oproti vzorku referenčnímu. K posouzení rozdílu exprese hsp mezi fyziologickými graviditami a graviditami s vybranými těhotenskými komplikacemi jsem využila analýzy rozptylu (ANOVA). Výsledky studie prokázaly, že ve vzorcích placentární tkáně došlo k signifikantnímu zvýšení exprese Hsp27 a Hsp90 u pacientek trpících čistou preeklampií nebo v kombinaci s fetální růstovou retardací. Dále jsem pozorovala zvýšenou expresi HspBP1 ve skupině žen s mírnou preeklampií ve srovnání s ženami s preeklampií závažnou a slabou negativní korelaci u HspBP1 a PI v *arteria umbilicalis*. Ve vzorcích plné krve matky jsem zaznamenala up-regulaci Hsp60 ve skupině PE+/-FGR a zároveň up-regulaci Hsp70 a down-regulaci Hsp90 ve všech sledovaných skupinách, jakožto projev mateřské systémové odpovědi na vyskytující se onemocnění. Také jsem pozorovala zvýšenou expresi Hsp60 u pacientek s oligo/anhydramnionem ve srovnání s ženami s normálním množstvím plodové vody a slabé negativní korelace mezi expresí Hsp27 a HspBP1 a PI v *arteria cerebri media*.

Klíčová slova

proteiny tepelného šoku, těhotenské komplikace související s placentární insuficiencí, preeklampsie, FGR, RT-PCR

Abstract

Heat shock proteins increase their gene expression after exposure of cells or organisms to some forms of stress, which may be high temperature, infection, inflammation, hypoxia, lack of nutrients and water. Stressful situations for the body are also pregnancy-related complications associated with placental insufficiency - preeclampsia and IUGR, as well as other pregnancy-related complications such as fetal growth restriction and gestational hypertension. Therefore, I examined whether the occurrence of pregnancy-related complications (preeclampsia, fetal growth retardation, gestational hypertension) affect the gene expression of heat shock proteins.

Five hsp systems was detected, namely Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and HspBP1 in placental tissue samples and whole maternal peripheral blood. Samples came from women with physiological pregnancy and from women with certain pregnancy-related complications (PE, FGR, GH). RNA was isolated from the samples. Detection of hsp expression was performed by using real-time RT-PCR and the comparative Ct method. Changes in gene expression between the test samples and reference sample were examined. To assess the difference between physiological pregnancies and pregnancies with selected pregnancy-related complications, an analysis of variance (ANOVA) was used. Results of the study showed a significantly increased expression of Hsp27 and Hsp90 in placental tissue derived from women suffering preeclampsia with or without FGR. Increased expression HspBP1 in the group of women with mild preeclampsia compared with women with severe preeclampsia and a weak negative correlation between HspBP1 gene expression and pulsatility index in the umbilical artery were also observed. Then up-regulation of Hsp60 in group PE+/-FGR was identified while up-regulation of Hsp70 and Hsp90 down-regulation in all treatment groups in the whole peripheral blood samples, as a manifestation of maternal systemic response to the pregnancy-related disorder. Increased expression of Hsp60 in patients with oligo/anhydramnion compared with women with normal amniotic fluid volume and a weak negative correlation between the expression of Hsp27 and HspBP1 and pulsatility index in the middle cerebral artery were also observed.

Keywords

heat shock proteins, pregnancy-related complications associated with placental insufficiency, preeclampsia, FGR, RT-PCR

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Proteiny tepelného šoku	12
2.1. Historie hsp	12
2.2. Funkce hsp	12
2.3. Hsp rodiny	13
2.3.1. Rodina malých hsp	13
2.3.2. Hsp40 rodina	14
2.3.3. Hsp60 rodina	15
2.3.4. Hsp70 rodina	15
2.3.5. Hsp90 rodina	16
2.3.6. Hsp110 rodina	17
3. Hypertenzní poruchy komplikující těhotenství	18
3.1. Klasifikace hypertenzních poruch během těhotenství	18
3.2. Gestační hypertenze	19
3.3. Preeklampsie	19
3.3.1. Rizikové faktory preeklampsie	20
3.3.2. Příznaky preeklampsie	20
3.3.3. Etiologie a patofyziologie preeklampsie	21
3.3.4. Diagnostika a predikce preeklampsie	24
3.3.5. Léčba preeklampsie	28
4. Fetální růstová retardace	28
5. Expres proteinů tepelného šoku během těhotenství	31
5.1. Hladiny Hsp70 během fyziologického těhotenství	32
5.2. Hladiny Hsp70 během preeklampsie	33
6. Kvantifikace hsp genové exprese pomocí RT-PCR v reálném čase	35
7. Cíle práce	39
8. Materiál a metody	40
8.1. Materiál	40
8.1.1. Placentární tkáň	40

8.1.2. Plná periferní krev matky	41
8.2. Metody	42
8.2.1. Izolace RNA z placenty	42
8.2.2. Izolace RNA z plné periferní krve	43
8.2.3. RT-PCR v reálném čase	44
8.2.4. Komparativní Ct metoda a statistické vyhodnocení výsledků	47
9. Výsledky	48
9.1. Výsledky exprese hsp v placentární tkáni	48
9.1.1. Exprese hsp v jednotlivých skupinách těhotenských patologií	48
9.1.2. Vztah mezi expresí hsp v placentární tkáni a závažností preeklampsie	50
9.1.3. Exprese hsp v placentární tkáni u PE+/-FGR ve vztahu k výskytu předchozí hypertenze	51
9.1.4. Exprese hsp v placentární tkáni ve vztahu k závažnosti růstové retardace plodu	52
9.1.5. Exprese hsp v placentární tkáni ve vztahu k Dopplerovským ultrazvukovým parametrům	53
9.2. Výsledky exprese hsp v plné periferní krvi matky	56
9.2.1. Exprese hsp v jednotlivých skupinách těhotenských komplikací	56
9.2.2. Vztah závažnosti preeklampsie a exprese hsp v periferní krvi matky	59
9.2.3. Exprese hsp v plné periferní krvi u PE+/-FGR ve vztahu k výskytu předchozí hypertenze	59
9.2.4. Exprese hsp v plné periferní krvi matky a závažnost růstové retardace plodu	60
9.2.5. Vliv Dopplerovských ultrazvukových parametrů na expresi hsp v plné periferní krvi matky	61
10. Diskuze	65
11. Závěr	70
12. Seznam použité literatury	72
13. Přílohy	84

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AMV-RT	reverzní transkriptáza z viru ptačí myeloblastózy
ANOVA	analýza rozptylu
APO-1	apoptózový antigen 1
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární DNA
Ct	prahová hodnota
C-terminální konec peptidu	označení pro ten konec peptidu, který končí karboxylovou skupinou
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DYS14	sekvence, která je součástí lidského Y-specifického genu TSPY
ENG	endoglin
F	<i>forward</i> (přímý) primer
FAM	6-carboxyfluorescein
FGR	fetální růstová retardace
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets</i>
HLA	lidské leukocytární antigeny
HO-1	hem oxygenáza-1
hsp	proteiny tepelného šoku
IUGR	intrauterinní růstová retardace
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MMLV-RT	reverzní transkriptáza Molonayova myšího leukemického viru
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NK buňka	<i>natural killer cell</i> , „přirozený zabíječ“
N-terminální konec peptidu	označení pro ten konec peptidu, který končí aminovou skupinou
PAPP-A	plazmatický specifický těhotenský protein A
PE	preeklampsie
PI	index pulsatility
PIGF	placentární růstový faktor
PLAC1	<i>placenta-specific 1</i>

PP13	placentární protein 13
R	<i>reverse</i> (zpětný) primer
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce
sFlt-1	solubilní Fms-podobná tyrozinová kináza 1
SGA	plody malé vzhledem ke gestačnímu věku
SOD	superoxid dismutáza
TAMRA	tetramethylrhodamine
TGFβ1	transformující růstový faktor β1
ÚPMD	Ústav pro péči o matku a dítě
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VIC	4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. Úvod

V současné době se lékaři snaží o co nejčasnější diagnostiku různých onemocnění, ve snaze zmírnit negativní vlivy dané nemoci na lidský organismus. Proto byly a jsou hledány nové markery, které poukazují na rozvoj nemoci ještě v době, kdy pacient nevykazuje žádné známky onemocnění. Stejně tomu tak je i v odvětví prenatalní diagnostiky. Z tohoto důvodu jsem ve své diplomové práci testovala vybrané markery ve vztahu k těhotenským komplikacím (preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze). Preeklampsie má negativní vliv na růst a vývoj plodu a je jednou z hlavních příčin mateřské morbidity a mortality během těhotenství. Proto je důležitá včasná diagnostika onemocnění, kdy může být těhotná žena častěji sledována v prenatalní poradně, kde je mimo jiné ženě měřen krevní tlak a také se zkoumá přítomnost bílkovin v moči. Pokud je diagnostikován vysoký krevní tlak a proteinurie a zároveň je vyloučeno jiné onemocnění projevující se těmito příznaky, lékař může nasadit příslušnou léčbu a žena je zařazena do kategorie rizikového těhotenství.

Výživa plodu je během těhotenství závislá na placentě a umbilikálních cévách, které přepravují kyslík a živiny z mateřské krve směrem k plodu a odvádí oxid uhličitý a odpadní produkty metabolismu plodu do krve matky. Placenta je dočasný orgán, jejíž funkcí je nejen výměna krevních plynů a dodávání živin plodu, ale také produkce hormonů nezbytných pro udržení těhotenství, a dále pak funguje jako imunologická bariéra. Pokud nedojde ke správné diferenciaci buněk trofoblastu, tak dochází k nedostatečné remodelaci mateřských spirálních arterií, proto je placenta vystavena hypoxii a neplní správně své fyziologické funkce. Z toho vyplývají negativní vlivy jak pro nastávající matku, tak pro vyvíjející se plod. Vzhledem k tomu, že nastalá situace je pro organismus značně stresová, předpokládáme zvýšení exprese proteinů tepelného šoku (hsp) během manifestace těchto komplikací. Proteiny tepelného šoku jsou evolučně vysoce konzervované proteiny, vyskytující se jak u prokaryotických, tak u eukaryotických organismů. Většina hsp se v buňkách exprimuje během fyziologických podmínek a jejich exprese je výrazně zvýšena, pokud jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám, kdy navíc dochází také k expresi inducibilních forem těchto proteinů.

Ve své diplomové práci jsem sledovala expresi vybraných proteinů tepelného šoku, jakožto možných markerů pro včasnou diagnostiku preeklampsie. Nejprve jsem expresi hsp testovala na vzorcích placent. Následně jsem expresi stejných proteinů zkoumala

v plné krvi matky, kde se jednalo o maternálně produkované hsp. Svou diplomovou práci mám rozdělenou do dvou hlavních oddílů. První část se zabývá teoretickým úvodem k dané problematice, kde popisuji, co jsou proteiny tepelného šoku, jakou mají funkci a do jakých rodin se dělí. Dále zde rozebírám těhotenské komplikace, včetně těch souvisejících s placentární insuficiencí a vliv těchto těhotenských komplikací na genovou expresi proteinů tepelného šoku. Druhá část práce je věnována vlastnímu výzkumu, kde jsem se mimo jiné pokusila zodpovědět otázku týkající se diagnostiky a prognostiky těhotenských komplikací souvisejících s placentární insuficiencí.

2. Proteiny tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku, neboli heat shock proteins (hsp), patří mezi nejrozšířenější proteiny v biosféře. Vyskytují se v různých variantách jak u prokaryotických, tak u eukaryotických organismů. Konstituční formy těchto proteinů jsou exprimovány buňkou za fyziologických podmínek a jejich exprese se mnohonásobně zvýší, pokud je buňka vystavena náhlým změnám teploty anebo jiným formám stresu. Za těchto nefyziologických podmínek je také indukována exprese inducibilních forem proteinů tepelného šoku.

2.1. Historie hsp

Buněčnou stresovou odpověď popsal poprvé v roce 1962 Ritossa na základě pozorování chromozomů ze slinných žláz *Drosophila melanogaster*. Ritossa zjistil, že po zvýšení teploty se v určitých lokusech chromozomů tvoří charakteristické smyčky, které indikují zvýšenou transkripční aktivitu (Ritossa, 1962). Proteiny kódované geny v těchto oblastech pojmenoval Tissières se svým týmem jako proteiny tepelného šoku, protože zvýšení jejich syntézy bylo dosaženo náhlým zvýšením teploty (Tissières *et al.*, 1974). Další studie ukázaly, že zvýšení exprese hsp vyvolává mnoho dalších faktorů v buňce. Mezi tyto faktory patří například změna pH, osmolarita, radiace, vyšší koncentrace těžkých kovů, ethanol, antibiotika nebo reaktivní kyslíkové formy (Donati *et al.*, 1990, Boreham *et al.*, 1994, Sheikh-Hamad *et al.*, 1994). Z tohoto důvodu není označení „proteiny tepelného šoku“ zcela přesné, protože ke zvýšení jejich exprese nedochází pouze při zvýšení teploty. Tento název se však stále používá.

2.2. Funkce hsp

Hsp mají dvojí roli v závislosti na jejich intracelulární nebo extracelulární lokalizaci. Intracelulární hsp mají ochrannou funkci a umožňují buňce přežít smrtící podmínky. Extracelulární hsp nebo hsp lokalizované na buněčné membráně zprostředkovávají imunologické funkce a hrají klíčovou roli při stimulaci imunitního systému (Schmitt *et al.*, 2007). U lidí je jejich přítomnost v séru spojena s výskytem stresových faktorů, jako je například zánět, bakteriální nebo virová infekce.

Někteří členové rodiny proteinů tepelného šoku jsou exprimovány pouze během buněčného stresu, který může být vyvolán změnou teploty, přítomností volných

kyslíkových radikálů, virovou nebo bakteriální infekcí, těžkými kovy nebo ischemií (tzv. indukibilní formy). Jiní členové této rodiny jsou konstitutivně exprimovaní za fyziologických podmínek a jejich exprese se v nepříznivých podmínkách zvýší (konstituční formy).

Během fyziologických podmínek se intracelulární proteiny tepelného šoku chovají jako molekulární chaperony a napomáhají nově vznikajícím nebo špatně sbaleným proteinům získat jejich nativní konformaci. Dále napomáhají inkorporaci polypeptidů do intracelulárních membrán nebo v transportu přes tyto membrány, a dále pak v degradaci proteinů závislé na ubikvitinu.

Stresem vyvolaná aktivace genů pro hsp se nazývá buněčná stresová odpověď. Tato buněčná stresová odpověď je často nalézána během klinických obtíží, jako je například ischemie, infekce nebo hemoragický šok.

2.3. Hsp rodiny

Lidské hsp jsou rozděleny do několika rodin na základě jejich molekulární hmotnosti měřené v kDa. Těmito rodinami jsou: rodina malých proteinů tepelného šoku, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp110. Každá rodina se skládá z členů buď konstitutivně nebo regulovaně exprimovaných hsp a je zaměřena na různé subcelulární oddíly. Nomenklatura hsp není v současné době ještě přesně standardizována. Jednu z možných forem nomenklatury pro lidské hsp rodiny navrhl Kampinga se svým týmem (Kampinga *et al.*, 2009).

2.3.1. Rodina malých hsp

Rodina malých hsp je skupina proteinů o velikosti 15-30 kDa, které mají podobnou strukturu a biochemické vlastnosti, jako je fosforylace a oligomerizace. Malé hsp se často nacházejí v oligomerních komplexech zahrnujících jednoho nebo více členů rodiny (Kampinga *et al.*, 2009). Jedním z dobře prostudovaných členů této rodiny je Hsp27. Hsp27 je konstitutivně exprimován v mnoha tkáních a jeho exprese je v nepříznivých podmínkách zvýšena. Původně byl považován za teplotně indukibilní protein, který funguje jako chaperon a usnadňuje správné sbalení poškozených proteinů. Další studie však ukázaly, že Hsp27 reaguje také na jiné stresové podmínky než je teplotní šok,

například na oxidační nebo chemický stres (Rogalla *et al.*, 1999). Hsp27 může vytvářet oligomery o velikosti až 1000 kDa, přičemž základním stavebním kamenem takového multimerního komplexu je dimer Hsp27. Oligomerizace Hsp27 je dynamický proces závislý na fosforylačním stavu proteinu a na vystavení stresovým podmínkám. Lidský Hsp27 může být fosforylován na třech serinových zbytcích - Ser15, Ser78 a Ser82 (Landry *et al.*, 1992). Fosforylace Hsp27 je reverzibilní proces katalyzovaný MAPKAP kinázami 2 a 3, které mohou být indukovány různými formami stresu. Fosforylace zapříčiňuje rozpad velkých oligomerních komplexů Hsp27 do menších jednotek, nejčastěji dimerů nebo tetramerů, zatímco nefosforylované proteiny vytváří velké oligomerní struktury (Rogalla *et al.*, 1999). Hsp27 je ATP – nezávislý chaperon a jeho hlavní chaperonovou funkcí je ochrana jiných proteinů před agregací (Ehrensperger *et al.*, 1997). Během oxidačního stresu funguje Hsp27 jako antioxidant, protože snižuje hladiny reaktivních forem kyslíku díky zvyšování koncentrace intracelulárního glutathionu a snižování hladiny železa v buňce. Exprese Hsp27 také chrání buňku před apoptotickou buněčnou smrtí vyvolanou různými podněty, jako například hypertermie, oxidační stres nebo ligace APO-1 receptoru (Mehlen *et al.*, 1996). Proto můžeme Hsp27 označit také jako negativní regulátor programované buněčné smrti.

2.3.2. Hsp40 rodina

Rodina Hsp40 obsahuje proteiny o molekulární hmotnosti okolo 40 kDa. Jedná se pravděpodobně o nejpočetnější hsp rodinu u lidí. Charakteristickou vlastností této rodiny je přítomnost konzervované J-domény, která je zodpovědná za stimulaci ATPázové aktivity Hsp70. Proteiny rodiny Hsp40 stimulují hydrolýzu ATP u Hsp70 a tím regulují interakce klientského proteinu s Hsp70. J-doména je tvořena 70 aminokyselinami, přičemž je zde nalézána sekvenční podobnost s proteinem Hsp40 z *E. coli*, známým také jako DnaJ. Proteiny z rodiny Hsp40 lze rozdělit do tří podskupin na základě jejich homologie s proteinem DnaJ z *E. coli*. První podskupina (typ I) je tvořena proteiny, které vykazují homologii s DnaJ z *E. coli* a obsahují N-terminální J-doménu, oblast bohatou na glycin a fenylalanin, oblast bohatou na cystein a variabilní C-terminální doménu. Druhou podskupinu (typ II) tvoří proteiny obsahující N-terminální J-doménu a glycin/fenylalanin bohatou oblast. Poslední podskupinou (typ III) jsou proteiny obsahující J-doménu, která se nemusí nacházet na N-terminálním konci proteinu (Cheetham *et Caplan*, 1998).

2.3.3. Hsp60 rodina

Hsp60 rodina molekulárních chaperonů, která je známá také jako tzv. chaperoniny, hraje důležitou úlohu ve skládání proteinů a intracelulárním transportu bílkovin. Chaperoniny jsou soudkovité komplexy, které vážou nesbalené polypeptidy do své centrální dutiny a zprostředkovávají správné sbalení pomocí ATP-závislého opětovného navazování a uvolňování proteinu (Hartl *et al.*, 1995). Lidská chaperoninová rodina obsahuje jednak zástupce nacházející se v mitochondriích (HSPD a HSPE) a jednak zástupce nacházející se v cytosolu (CCT) (Kampinga *et al.*, 2009).

Funkce HspD (Hsp60) a HspE (Hsp10) byla nejlépe prostudována u *E. coli*. HspD je přibližně 800 kDa protein s ATPázovou aktivitou, který je složen ze dvou sedmičlenných kruhů, jehož podjednotky jsou veliké 57 kDa. Každý kruh obsahuje centrální dutinu s hydrofobním povrchem pro navázání rozložených nebo denaturovaných proteinů (Braig *et al.*, 1993). HspE funguje jako cochaperonin (Langer *et al.*, 1992). Jedná se o heptamerický prstencový komplex, který je složený z 10kDa podjednotek a tvoří víko HspD. Navázání klientské bílkoviny do centrální dutiny nejen chrání daný protein před agregací, ale také urychluje proces skládání. Mitochondriální chaperoniny katalyzují skládání proteinů určených pro mitochondriální matrix a dále udržují proteiny v nesbaleném stavu pro transport přes vnitřní mitochondriální membránu.

V cytosolu lidských buněk se nachází cylindrické proteiny známé jako CCT. Jedná se o heterooligomerní chaperoninové komplexy složené z osmi různých podjednotek, které hrají důležitou roli ve sbalování nově syntetizovaných cytosolických proteinů, kromě jiných také aktinu a tubulinu, a chrání buňky před proteinovou agregací (Kampinga *et al.*, 2009). Obdobně jako mitochondriální chaperoniny, tak i CCT váží ATP a hydrolyzuje ho během proteinového skládání.

2.3.4. Hsp70 rodina

Členové této rodiny jsou známí zejména díky své schopnosti vázat peptidový řetězec. Proto hrají důležitou roli při ochraně nově vznikajících proteinů, transportu proteinů přes membrány, opakovaném skládání nesložených proteinů nebo při proteinové degradaci (Frydman *et al.*, 1994). Obecný mechanismus jejich účinku je založen na jejich chaperonové aktivitě, tzn. na jejich schopnosti rozpoznat a vázat hydrofobní peptidové

segmenty, které se za normálních okolností nevyskytují ve vodném prostředí, ale jsou skryty uvnitř daného proteinu.

Lidský genom kóduje 13 genů rodiny Hsp70, s vyloučením mnoha pseudogenů (Brocchieri *et al.*, 2008). Nejvíce studovanými geny v této rodině jsou HSPA1A a HSPA1B, jejichž produkty se liší pouze mezi dvěma aminokyselinami a spolu s HSPA6 jsou nejvíce teplotně indukovatelní členové této rodiny. Hsp70 interagují s polypeptidy během jejich skládání do nativní konformace a zabraňují tak vzniku nefunkčních struktur. Částečně nesložený protein asociuje s C-terminální doménou Hsp70, čímž dojde ke zvýšení ATPázové aktivity N-terminální domény Hsp70. K dalšímu zvýšení ATPázové aktivity dojde po navázání cochaperonu, u eukaryot se jedná především o Hsp40. To vede ke konformační změně a ke vzniku Hsp70/ADP komplexu. Následně dojde k disociaci cochaperonu a k navázání proteinu způsobujícího výměnu ADP za ATP (např. BAG-1, HspBP1). Poté tento protein disociuje a také dojde k uvolnění původně špatně sbaleného proteinu. Většinou je potřeba tento cyklus několikrát zopakovat, než dojde ke sbalení proteinu do správné nativní konformace (Bukau *et al.*, 1998).

Hsp70 funguje také jako negativní regulátor programované buněčné smrti. Například studie z roku 2000 ukázala, že Hsp70 může regulovat apoptózu inhibicí kaspázy-3, která tak nemůže naštěpit DNA. Ze studie také vyplývá, že C-terminální doména, obsahující peptid vázající oblast, je postačující pro zabránění aktivace kaspázy-3 (Li *et al.*, 2000).

HspBP1, neboli Hsp70 vazebný protein 1, patří do rodiny eukaryotických proteinů identifikovaných jako nukleotidový výměnný faktor pro Hsp70 (Kabani *et al.*, 2002). HspBP1 je lokalizován především v cytoplazmě a v jádře, ale můžeme ho nalézt také extracelulárně. HspBP1 inhibuje HSPA1A chaperonovou aktivitu změnou konformace ATP vazebné domény tohoto proteinu, čímž ruší vazbu s ATP (Raynes *et al.*, 1998), a tak HSPA1A nemůže uplatňovat svou antiapoptotickou funkci.

2.3.5. Hsp90 rodina

Hsp90 rodina obsahuje členy s průměrnou molekulární hmotností 90 kDa, jejichž asociace je důležitá pro udržení stability a funkce mnoha proteinů. Jedná se o vysoce konzervované molekulární chaperony, které tvoří 1-2 % všech buněčných proteinů ve většině buněk za fyziologických podmínek (Schmitt *et al.*, 2007). Funkcí těchto proteinů je

účast na skládání, sestavení, maturaci a stabilizaci specifických proteinů. Lidský genom kóduje 17 genů Hsp90, přičemž u jedenácti z nich se jedná pravděpodobně o pseudogeny (Chen *et al.*, 2005). Proteiny této rodiny se vyskytují jak v cytosolu, tak v různých buněčných kompartmentech. Nejznámějšími cytosolickými izoformami jsou Hsp90 α (inducibilní a majoritní forma) a Hsp90 β (konstitutivní a minoritní forma), které se liší svou funkcí a buněčnou lokalizací (Subbarao Sreedhar *et al.*, 2004). Isoforma Hsp90 α se nachází také na buněčném povrchu a je secernována do extracelulárního prostoru (Eustace *et al.*, 2004). U izoformy Hsp90 β bylo prokázáno, že hraje významnou roli v diferenciaci trofoblastu. To dokazuje studie, ve které u Hsp90 β deficientních homozygotních myší s normální expresí Hsp90 α nedocházelo k diferenciaci placentárního labyrintu (Voss *et al.*, 2000). Hsp90 se v cytoplazmě nachází ve formě dimeru, nejčastěji se jedná o homodimer ($\alpha\alpha$ nebo $\beta\beta$), ale heterodimery, monomery nebo vyšší oligomery také existují. Každý monomer je složen ze třech domén – N-terminální, centrální a C-terminální domény. N-terminální doména obsahuje ATP vazebnou kapsu, a tudíž zodpovídá za vazbu a hydrolýzu ATP. Centrální doména slouží k rozlišení typů klientských proteinů (Hawle *et al.*, 2006) a C-terminální doména je zodpovědná za dimerizaci proteinu (Minami *et al.*, 1994). Stejně jako další hsp, tak i Hsp90 spolupracují s různými cochaperony. Příkladem cochaperonu interagujícím s Hsp90 je imunofilin nebo p23 (Hawle *et al.*, 2006). Za fyziologických podmínek je Hsp90 asociován s některými intracelulárními proteiny, jako je kalmodulin, aktin, tubulin či některými receptory. Příkladem receptorů mohou být receptory pro steroidní hormony. Hsp90 se podílí na stabilizaci neaktivní formy některých receptorů do doby, než se na receptor naváže příslušný hormon (Catelli *et al.*, 1985).

2.3.6. Hsp110 rodina

110-kDa proteiny tepelného šoku (Hsp110) jsou jedny z hlavních molekulárních chaperonů savčích buněk. Jedná se o rodinu, která je evolučně spjata s rodinou Hsp70, přičemž členové obou dvou rodin vykazují vysokou homologii s výjimkou existence delší domény lokalizované mezi N-terminální ATPázovou doménou a C-terminální substrát vázající doménou u Hsp110 rodiny (Kampinga *et al.*, 2009). Členové Hsp110 rodiny zabraňují tvorbě proteinových agregátů a udržují denaturované proteiny ve stavu vhodném pro následné správné složení (Oh *et al.*, 1997). Takto denaturované proteiny jsou následně skládány do nativní konformace pomocí Hsp70. Proteiny rodiny Hsp110 fungují také jako

nukleotidový výměnný faktor pro cytosolické Hsp70. Mutační analýza ukázala, že funkční ATPázová doména a C-terminální doména jsou důležité pro nukleotid výměnnou aktivitu (Dragovic *et al.*, 2006). V lidském genomu se vyskytují 4 zástupci této rodiny.

3. Hypertenzní poruchy komplikující těhotenství

Hypertenzní poruchy se vyskytují u 6-8% těhotenství a významně přispívají k mateřské, fetální a neonatální morbiditě a mortalitě. Nastávající matky s vysokým krevním tlakem jsou náchylnější k rozvoji potenciálně smrtelných komplikací, jako je například předčasné odlučování placenty, diseminovaná intravaskulární koagulace, cévní mozková příhoda, selhání jater nebo akutní renální selhání.

3.1. Klasifikace hypertenzních poruch během těhotenství

Ve své práci používám klasifikaci podle National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy z roku 2000. Podle této klasifikace hypertenzní poruchy komplikující těhotenství členíme na 1. chronickou hypertenzi, 2. gestační hypertenzi, 3. preeklampsii/eklampsii, 4. chronickou hypertenzi se superponovanou preeklampsii (Gifford *et al.*, 2000).

Chronická hypertenze je definována jako trvalá systolická a diastolická hypertenze (tlak krve vyšší než 140/90 mm Hg), která je přítomna před těhotenstvím nebo je diagnostikována před 20. týdnem gestace. Jako chronická hypertenze je také nazýván stav, kdy je hypertenze diagnostikována poprvé během těhotenství, ale po porodu nevymizí.

Gestační hypertenzi se nazývá stav, kdy je zjištěna hypertenze v graviditě po 20. týdnu těhotenství, ale bez výskytu proteinurie. Do 12 týdnů po porodu gestační hypertenze postupně vymizí. Pokud k poklesu tlaku po porodu nedojde, jedná se o hypertenzi chronickou.

Preeklampsie je diagnostikována tehdy, pokud se u doposud zdravé těhotné ženy vyskytne po 20. týdnu těhotenství hypertenze a proteinurie. Eklampsie je nejzávažnější komplikací preeklampsie, při které dochází k nedostatečnému okysličení mozku a může vést ke smrti jak plodu, tak matky.

Chronická hypertenze se superponovanou preeklampií je stav, kdy se u ženy trpící chronickou hypertenzí objeví po 20. týdnu těhotenství proteinurie a další příznaky preeklampsie.

3.2. Gestační hypertenze

Gestační hypertenze je stav, kdy je vysoký krevní tlak diagnostikován poprvé po 20. týdnu těhotenství, ale nedochází k výskytu proteinurie. Tato nespecifická diagnóza zahrnuje jednak ženy s preeklampií, u kterých se ještě proteinurie nerozvinula, a dále pak hypertenzní těhotné ženy bez preeklampsie. Definitivní určení této diagnózy a zároveň vyloučení preeklampsie je možné až po porodu. Pokud hypertenze do několika týdnů po porodu nevyjmizí nebo se vysoký krevní tlak vyskytoval ještě před 20. týdnem těhotenství, tak se jedná o hypertenzi chronickou. Během fyziologické gravidity dochází k podstatným změnám kardiovaskulárního systému matky. Zvyšují se hodnoty tepového objemu a tepové frekvence, na základě čehož dochází ke zvýšení srdečního výdeje přibližně o 40%. Krevní tlak je naopak v průběhu těhotenství snížen ve srovnání s hodnotami před graviditou. K poklesu tlaku dochází postupně od 12. do 26. týdne těhotenství, přičemž po 36. týdnu se tlak vrací opět k hodnotám před těhotenstvím. Toto kolísání tlaku se vyskytuje jak u normotenzních, tak u hypertenzních žen. Původně byla hypertenze v těhotenství diagnostikována na základě zvýšení krevního tlaku během druhého trimestru v porovnání s hodnotami z prvního trimestru. V dnešní době je však vysoký krevní tlak během gravidity charakterizován absolutními hodnotami. Jedná se o zvýšení systolického krevního tlaku nad hodnotu 140 mm Hg anebo zvýšení diastolického tlaku nad 90 mm Hg (Gifford *et al.*, 2000).

3.3. Preeklampsie

Preeklampsie je těhotensky specifické multisystémové onemocnění, které ohrožuje zdraví a život jak matky, tak plodu. Ačkoliv úmrtnost žen v souvislosti s preeklampií v rozvinutých zemích klesá, v zemích třetího světa je mortalita díky nedokonalé zdravotnické péči stále vysoká. Jedná se o onemocnění vznikající na začátku těhotenství, přičemž ke klinickým projevům dochází ve druhé polovině gestace. Pro preeklampsii je charakteristická snížená placentární perfuze. Pokud nedojde ke správné diferenciaci buněk

trofoblastu, tak dochází k nedostatečné remodelaci mateřských spirálních arterií, a proto je placenta vystavena hypoxii a neplní správně všechny své fyziologické funkce. Z toho vyplývají negativní vlivy jak pro nastávající matku, tak pro vyvíjející se plod. Charakteristickými příznaky preeklampsie jsou hypertenze, proteinurie a případně edémy vyskytující se po 20. týdnu gravidity. Po odstranění placenty tyto příznaky postupně vymizí.

3.3.1. Rizikové faktory preeklampsie

Preeklampsie se vyskytuje zhruba u 2-5 % těhotenství v závislosti na studované populaci (WHO, 1988). Ačkoliv se preeklampsie může vyskytnout u kterékoliv gravidní ženy, existují zde určité rizikové faktory, které zvyšují riziko vzniku preeklampsie. Preeklampsie se vyskytuje dvakrát častěji u prvorodiček, než u žen, které mají druhé nebo další těhotenství. Tento fakt je dán tím, že mateřský organismus reaguje na cizí fetální antigeny, získané od otce. Reakce mateřského organismu může být snížena díky dlouhodobé expozici otcovského antigenu, například na základě předchozího těhotenství (Trupin *et al.*, 1996). Nicméně se změnou partnera se riziko vzniku preeklampsie u žen vícekrát těhotných opět zvýší. Ženy s darovaným vajíčkem mají také zvýšené riziko rozvoje preeklampsie oproti ženám s vlastním oocytem (Salha *et al.*, 1999). Dalšími rizikovými faktory je věk matky nižší než 20 let nebo naopak vyšší než 35 let, nízký socioekonomický status, vícečetná těhotenství, obezita, diabetes 1. typu, chronická hypertenze, genetické predispozice, preeklampsie v minulé graviditě, autoimunitní choroby, renální onemocnění nebo antifosfolipidový syndrom.

3.3.2. Příznaky preeklampsie

Hlavními příznaky preeklampsie jsou vysoký krevní tlak a výskyt bílkovin v moči vyskytující se po 20. týdnu těhotenství. Na základě závažnosti těchto příznaků členíme preeklampsii na mírnou a závažnou.

Mírná preeklampsie je definována jako přetrvávající hypertenze, kdy je krevní tlak vyšší než 140/90 mm Hg, a to během dvou měření v rozmezí alespoň 6 hodin. Hypertenze se objevuje obvykle po 20. týdnu gestace a je doprovázena proteinurií vyšší než 0,3 g za 24

hodin. Proteinurie u preeklampsie vzniká poškozením bazální membrány glomerulů a snížením zpětné resorpce proteinů v tubulech.

Závažná forma preeklampsie je diagnostikována na základě přítomnosti jednoho nebo více následujících kritérií: systolický krevní tlak vyšší než 160 mm Hg nebo diastolický krevní tlak vyšší než 110 mm Hg naměřený ve 2 případech v rozmezí 6 hodin, proteinurie vyšší než 5 g za 24 hodin, oligurie (< 500 ml moči za 24 hodin), plicní edémy nebo cyanóza, bolesti v epigastriu, porucha centrálního nervového systému (poruchy zraku, těžké bolesti hlavy), porucha funkce jater, trombocytopenie (pokles trombocytů v periferní krvi pod 100 000 buněk/mm³), výskyt fetální růstové retardace (Schroeder, 2002).

V současné době je možné rozdělit preeklampsii ještě na základě výskytu klinických obtíží na časnou (výskyt klinických znaků před 34. týdnem těhotenství), střední (výskyt obtíží mezi 34. - 37. týdnem těhotenství) a pozdní preeklampsii, kdy se obtíže objeví po 37. týdnu gestace (Akolekar *et al.*, 2011).

3.3.3. Etiologie a patofyziologie preeklampsie

Etiologie a patofyziologie preeklampsie nejsou v dnešní době ještě přesně známy. Existuje několik teorií o vzniku této choroby, přičemž se tyto teorie vzájemně nevylučují, ale mohou spolu navzájem interagovat.

Preeklampsie je charakterizována placentární hypoxií nebo ischemií, nadměrným oxidačním stresem a endoteliální dysfunkcí. Ischemická placenta uvolňuje do krevní plazmy matky faktory, které hrají důležitou roli v endoteliální dysfunkci, která je nejvýznamnějším rysem tohoto onemocnění, což má za následek klinické projevy preeklampsie jako je hypertenze, proteinurie nebo edémy. Endoteliální dysfunkce u preeklampsie vzniká následkem nerovnováhy mezi pro-angiogenezí a anti-angiogenezí. Během normálního těhotenství dochází k nárůstu pro-angiogenního faktoru PIGF (placentární růstový faktor) v prvních dvou trimestrech gravidity a následně se jeho hladiny postupně snižují. Hladina anti-angiogenního faktoru sFlt-1 (solubilní Fms-podobná tyrozinová kináza 1) zůstává naopak v prvních 2 trimestrech stabilní a na konci těhotenství rovnoměrně narůstá. Avšak během preeklampsie byly zjištěny vyšší hladiny sFlt-1 a nižší hladiny PIGF ve srovnání s normálním těhotenstvím. Solubilní Flt-1 působí jako inhibitor PIGF a VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) na základě vazby těchto molekul. A

právě vyšší hladiny sFlt-1 během preeklampsie mohou přispívat k hypertenzi, proteinurii a edémům (Maynard *et al.*, 2003).

Jedna z teorií vzniku preeklampsie předpokládá vznik této choroby v důsledku nedostatečné invaze trofoblastu do spirálních arterií. To vede k nedostatečnému zásobení placenty krví a vzniku ischemie placenty, což má za následek další komplikace. Ischemická placenta uvolňuje do krevní plazmy matky rozpustné faktory, které hrají ústřední roli v následné endoteliální dysfunkci. Podle skupiny oxfordských výzkumných pracovníků je preeklampsie dvoustupňové placentární onemocnění. V první fázi dochází k ovlivnění spirálních arterií, což má za následek nedostatečné prokrvení placenty. Druhá fáze zahrnuje účinky plynoucí z placentární ischemie na matku a plod (Smarason *et al.*, 1993). Během fyziologického průběhu těhotenství dochází k diferenciaci trofoblastu na cytotrofoblast (vnitřní část) a syncytiotrofoblast (vnější část). Syncytiotrofoblast je důležitý pro narušení sliznice dělohy pomocí proteolytických enzymů a vstřebání vzniklých produktů. To má za následek jak výživu zárodku, tak nidaci. Následně začne cytotrofoblast intenzivně proliferovat a prorůstá syncytiotrofoblastem. Vytvářejí se tak buněčné sloupce kryté syncytiem - primární klky. Pokud nedojde ke správné diferenciaci trofoblastu, tak dochází k nedostatečnému přizpůsobení spirálních arterií a nedostatečnému krevnímu zásobení plodu kyslíkem a živinami. Preeklampsie je také spojena s akumulací glykogenu v syncytiotrofoblastu, který může sloužit jako metabolický marker nezralosti buňky, která není schopna dělení (Arkwright *et al.*, 1993).

Během preeklampsie dochází ke zvýšené cirkulaci volných mastných kyselin, a to už před 20. týdnem gravidity, kdy ještě pacientka nevykazuje projevy onemocnění (Lorentzen *et al.*, 1994). To zapříčiní vyšší poměr volných mastných kyselin k albuminu, jehož funkcí je také transport těchto kyselin. Pokud má sérový albumin hodnotu izoelektrického bodu 5,6, má antitoxické účinky na endoteliální buňky. Avšak vyšší podíl volných mastných kyselin k albuminu způsobí posun izoelektrického bodu albuminu z hodnoty 5,6 na 4,8 a takovýto albumin ztrácí svou antitoxickou plazmatickou aktivitu. Pacientky s preeklampií mají tudíž menší množství antitoxické formy albuminu než normotenzní těhotné ženy. Nízká ochranná aktivita endoteliálních buněk a vyšší poměr VLDL pak způsobuje cytotoxicitu a akumulaci triglyceridů v endoteliálních buňkách. Během každého těhotenství se zvyšují energetické požadavky, které se projevují zvýšením koncentrace VLDL po celou dobu těhotenství, přičemž u žen s nízkou hladinou antitoxické

formy albuminu je pravděpodobnost, že se sníží jeho hladina až k bodu, kde se projeví toxicita VLDL, což vede k poškození endoteliálních buněk (Arbogast *et al.*, 1994).

Podle imunologické teorie dochází během těhotenství k porušení imunologické adaptace, konkrétněji k intoleranci fetoplacentární jednotky, přičemž zde hlavní roli sehrává inkompatibilita v HLA systému mezi matkou a plodem. Plod je z imunologického hlediska tolerovaným štěpem, který obsahuje také paternální antigeny. Pokud dojde k poruše této tolerance, dochází pak ke zpomalení invaze trofoblastu do myometria. Vlivem nedostatečné tolerance placenty dochází také k nastartování kaskády zánětlivé reakce a poškození cévního endotelu. Lidské jaderné buňky obsahují na svém povrchu glykoproteiny I. třídy (MHC I. třídy), které se dělí na klasické (HLA-A, HLA-B, HLA-C) a neklasické (HLA-E, HLA-F, HLA-G). Rodina klasických MHC I. třídy kóduje glykoproteiny na povrchu buněk zahrnující vysoce polymorfní transplantační molekuly, které prezentují na svém povrchu peptidové fragmenty produkované buňkou tak, aby byly potenciálně rozeznatelné T-lymfocyty. Neklasické MHC I. třídy se vyskytují pouze u některých typů buněk. HLA-E a HLA-F se vyskytují v mnoha fetálních i dospělých tkáních, zatímco HLA-G se vyskytují pouze na buňkách trofoblastu na materno-fetálním rozhraní, kde se klasické MHC molekuly nevyskytují. Tento omezený výskyt HLA-G naznačuje, že jejich funkce spočívá v udržení imunologické tolerance matky vůči plodu v průběhu těhotenství. Na rozdíl od klasických MHC I. třídy se u HLA-G vyskytuje polymorfismus ve velmi omezené míře (Morales *et al.*, 1993). V rozporu s tímto tvrzením je studie prováděná na afro-americké populaci, kde bylo nalezeno mnoho alel HLA-G, což naznačuje, že HLA-G je potenciálně schopen prezentovat velkou škálu peptidů a vyvolat alogenní reakci, podobně jako klasické MHC I. třídy (van der Ven *et al.*, 1994). Nicméně toto tvrzení žádná další studie nepotvrdila. O imunologickém faktoru vzniku preeklampsie vypovídají také studie, které poukazují na vyšší výskyt preeklampsie v souvislosti s darovaným oocytem (Salha *et al.*, 1999) nebo u prvorodiček ve srovnání s víceroďičkami, které mají stálého partnera (Trupin *et al.*, 1996).

Další teorií vzniku preeklampsie je genetická predispozice. U závažné preeklampsie a eklampsie byl pozorován dědičný charakter. Chesley se svým týmem zjistil 26% incidenci preeklampsie u žen, jejichž matky preeklampií trpěly také a pouze 8% incidenci u svých snach (Chesley *et al.*, 1968). Podobného výsledku dosáhla také studie z roku 2004, ze které vyplynulo, že dcery a sestry preeklamptických matek mají vyšší riziko vzniku

preeklampsie než nevlastní sestry, jejichž jeden rodič je jiný. Vlastní sestry a dcery žen s preeklampií mají také zvýšené riziko vzniku gestační hypertenze v porovnání s nevlastními sestrami (Nilson *et al.*, 2004). Bylo navrženo mnoho modelů dědičnosti preeklampsie a také mnoho kandidátních genů. Rozvoj preeklampsie tak může být založen na jediném recesivním nebo dominantním genu s neúplnou penetrancí nebo se může jednat také o multifaktoriální dědičnost. Podle některých studií existuje zvýšené riziko vzniku preeklampsie v souvislosti s určitými HLA antigeny. Kilpatrick se svým týmem uvádí, že existuje významná asociace mezi HLA-DR4 a preeklampií (Kilpatrick *et al.*, 1990). Nicméně na základě podrobné genetické analýzy byla asociace preeklampsie a HLA-DR4 vyloučena (Hayward *et al.*, 1992). V jiné studii bylo pozorováno, že matky s haplotypy HLA A23/29, B44 a DR7 mají vyšší riziko rozvoje preeklampsie a IUGR než matky bez těchto haplotypů (Peterson *et al.*, 1994). Jedním z dalších kandidátních genů byl navržen gen pro angiotenzinogen lokalizovaný na chromozomu 1. Substituce aminokyseliny methioninu za threonin na pozici 235 [T235] v aminokyselinovém řetězci vedla ke zvýšenému riziku vzniku preeklampsie, ale už nekorelovala s výskytem HELLP syndromu (Ward *et al.*, 1993). Jiné studie ale nenalezly asociaci mezi T235 a preeklampií (Wilton *et al.*, 1995) a zdá se, že tato alela souvisí spíše s vysokým krevním tlakem než s preeklampií. Dalším příkladem může být defekt lidského endogenního retrovirového genu pro syncytin. Syncytin je membránový protein vyskytující se v placentě, zejména v syncytiotrofoblastu, kde se podílí na fúzi buněk cytotrofoblastu. V oblasti kontaktu s děložní sliznicí tak vzniká vrstva syncytiálních buněk, která je zcela nezbytná pro správnou výměnu živin a plynů mezi krevními oběhy matky a plodu. U preeklampsie a HELLP syndromu byla nalezena snížená placentární exprese syncytinu oproti zdravým těhotným ženám, což může přispívat ke špatné funkci placenty (Knerr *et al.*, 2002). Žádný z navrhovaných modelů dědičnosti nebyl zatím jednoznačně přijat, nicméně se lze domnívat, že alespoň z části je preeklampsie genetického původu.

3.3.4. Diagnostika a predikce preeklampsie

V současné době ještě neexistuje vyšetření, které by spolehlivě rozpoznalo preeklampsii v dostatečném předstihu před vznikem klinických příznaků. Preeklampsie je tedy diagnostikována až na základě vysokého krevního tlaku a výskytu proteinurie. Nicméně existuje plno studií, které hledají konkrétní markery použitelné pro zjištění

zvýšeného rizika rozvoje preeklampsie. Marker pro diagnostiku preeklampsie by měl splňovat určité podmínky. Měl by být detekovatelný už v prvním trimestru (tedy ještě před projevem klinických příznaků), spolehlivý, snadno měřitelný, finančně nenáročný a co nejméně zatěžující pro těhotnou ženu a její plod (embryo).

Nejčastěji studovanými markery pro včasnou diagnostiku preeklampsie jsou biochemické markery. Jedná se o cirkulující faktory, které mohou být produktem buněk trofoblastu nebo přilehlé děložní sliznice, které odrážejí placentární dysfunkci. Dále jsou využívány zánětlivé a metabolické biomarkery, které vyplývají ze systémové reakce mateřského organismu na abnormální těhotenství. Velkou hodnotu v diagnostice preeklampsie má také ultrazvukové vyšetření.

Jedním ze studovaných markerů je PAPP-A (plazmatický specifický těhotenský protein A). Jedná se o glykoprotein, který funguje jako proteáza IGFBP-4. Tento glykoprotein je produkován buňkami trofoblastu a využívá se jako biomarker Downova syndromu. U plodů s normálním počtem chromozomů je snížená hladina PAPP-A spojena se zvýšeným rizikem vzniku preeklampsie, a to zejména její časné formy. Nicméně tento marker není až tak spolehlivý. Ze studie, kterou provedl Poon a jeho kolegové vyplývá, že pouze 21,9% žen s preeklampsií s časným výskytem (před 34. týdnem gestace) mělo hodnoty PAPP-A pod hranicí 5. percentilu. U preeklampsie, která se vyskytla po 34. týdnu těhotenství, se hladiny PAPP-A pod hranicí 5. percentilu vyskytovaly pouze u 6,5% pacientek (Poon *et al.*, 2009). V kombinaci s Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením se predikční spolehlivost tohoto markeru zvyšuje.

Placentární protein 13 (PP13) byl také studován jako možný predikční marker preeklampsie. Jedná se o protein produkován buňkami trofoblastu, který hraje roli při implantaci a remodelaci mateřských spirálních arterií. Snížená hladina sérového PP13 na konci prvního trimestru v kombinaci s Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením v *arteria uterina* se jeví jako slibný marker pro predikci preeklampsie vyskytující se před 34. týdnem gestace. Prediktivní hodnota se pohybovala okolo 90% s 6% falešně pozitivních výsledků (Nicolaidis *et al.*, 2006; Khalil *et al.*, 2009).

Další predikční marker studovaný v souvislosti s preeklampsií je cystatin C. Cystatin je proteázový inhibitor, který se používá jako citlivý marker funkčnosti ledvin a pro odhad glomerulární filtrace. Během preeklampsie dochází ke zvýšení hladiny cystatinu C v mateřské plazmě a studie ukázaly, že hladina cystatinu by mohla sloužit jako

prediktivní marker této nemoci. Thilaganathan provedl studii, ve které porovnával hladinu cystatinu C v mateřském séru během prvního trimestru u 30 žen, které postupně rozvinuly preeklampsii a u 90 fyziologických gravidit. Střední hodnoty koncentrací cystatinu C na začátku těhotenství byly signifikantně vyšší u žen, které následně vyvinuly preeklampsii oproti zdravým kontrolám, přičemž 47% preeklamptických žen mělo hladinu cystatinu C nad 80. percentilem (Thilaganathan *et al.*, 2009). Lepší prediktivní hodnoty bylo docíleno při kombinaci cystatinu C s dalšími sérovými markery a Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením (Thilaganathan *et al.*, 2010).

Inhibin A a activin A jsou studovány také jako predikční markery preeklampsie. Jedná se o glykoproteinové hormony, jejichž primárním zdrojem během těhotenství je placenta. Koncentrace inhibinu A v séru matky během rané fáze těhotenství postupně klesá a v průběhu druhého trimestru zůstávají hladiny inhibinu A nízké. Ve třetím trimestru pak dochází k výraznému zvýšení hladin s maximálními hodnotami ve 36. týdnu (Muttukrishna *et al.*, 1995). Hladina sérového activinu A je během normálního těhotenství vyšší než u netěhotných žen. Nicméně během prvních dvou trimestrů jsou hladiny activinu A konstantní. Ve třetím trimestru pak dochází ke zvýšení hodnot sérové koncentrace tohoto glykoproteinu (Muttukrishna *et al.*, 1996). Muttukrishna sledovala sérovou koncentraci inhibinu A a activinu A během druhého trimestru u žen s preeklampsií ve srovnání s fyziologickými graviditami, přičemž preeklamptické ženy měly vyšší hladiny sledovaných glykoproteinů než zdravé kontroly. Avšak prediktivní hodnota byla nízká (16-59%). Opět platilo, že preeklampsie s časným nástupem byla lépe predikovatelná než preeklampsie s pozdním nástupem (Muttukrishna *et al.*, 2000).

V průběhu normálního těhotenství dochází k neustálé remodelaci placenty a tím i k uvolňování apoptotických tělísek odvozených od buněk trofoblastu. V těchto apoptotických tělíscích se nacházejí extracelulární nukleové kyseliny placentárního původu, které jsou detekovatelné v periferní krvi těhotné ženy (Lo *et al.*, 1997). Během placentární insuficience dochází k nadměrnému uvolňování apoptotických tělísek trofoblastu a tím i ke zvýšenému výskytu fetálních nukleových kyselin, které by se mohly stát dobrým predikčním markerem preeklampsie. Pomocí kvantitativní polymerázové reakce a genu DYS14 jako markeru, který je lokalizován na Y chromozomu, byla sledována volná fetální DNA u těhotenství s mužskými plody. Do studie byly zahrnuty těhotné ženy s preeklampsií, fetální růstovou retardací a dále ženy s normálním průběhem

těhotenství, jako kontrolní skupina. Z výsledků vyplynulo, že se hladina volné fetální DNA během normálního těhotenství zvyšuje s narůstajícím stářím gestace. Výsledky dále ukázaly signifikantně vyšší hladiny volné fetální DNA u žen s preeklampsii a fetální růstovou retardací ve srovnání s kontrolní skupinou. Vyšší hladiny byly také zaznamenány u závažné preeklampsie ve srovnání s preeklampsii mírnou (Alberry *et al.*, 2009). Jiná studie se zabývala predikcí preeklampsie na základě analýzy několika placentárních mRNA markerů z krve těhotných žen v 15. - 20. týdnu gravidity. Do studie bylo zahrnuto 62 vzorků krve od žen, které v průběhu gravidity vyvinuly preeklampsii. Tyto vzorky byly porovnávány s 310 zdravými kontrolními vzorky. Na vzorcích se testovala hladina exprese mRNA devíti markerů. Výsledky ukázaly signifikantně zvýšené hladiny exprese mRNA Flt-1 (Fms-podobná tyrozinová kináza 1), ENG (endoglin), P-selektinu a PLAC1 (*placenta-specific 1*) u pacientek s preeklampsii oproti kontrolní skupině. Markery PIGF (placentární růstový faktor) a HO-1 (hem oxygenáza-1) naopak vykazovaly snížené hladiny exprese. Zbylé tři markery, TGFβ1 (transformující růstový faktor β1), VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), SOD (superoxid dismutáza), byly beze změny oproti kontrolní skupině. Nejvyšší citlivost byla zaznamenána u markerů Flt-1 a ENG, přičemž nejlepší predikční hodnota vzniku preeklampsie (66%, 10% hladina významnosti) byla získána kombinací markerů Flt-1, ENG, PIGF a paritou (Sekizawa *et al.*, 2010).

Angiogeneze během těhotenství vyžaduje komplexní interakci mezi pro-angiogenními faktory (VEGF, PIGF) a jejich receptory (Flt-1, VEGFR-2). Právě tyto faktory jsou také zkoumány jako možné predikční markery preeklampsie. Během preeklampsie dochází ke snížení hladiny sérového PIGF, která je detekovatelná už na konci prvního trimestru. To dokazuje studie, porovnávající hladiny sérového PIGF u preeklamptických žen, žen s gestační hypertenzí a zdravých kontrol na konci prvního trimestru (týden gravidity 11+0 až 13+6). U žen, které v průběhu gravidity rozvinuly preeklampsii, byly zjištěny snížené hladiny sérového PIGF, přičemž zde byla signifikantní asociace mezi hladinou PIGF a závažností preeklampsie. Autoři této studie sledovali také mateřskou charakteristiku. Zaměřili se na věk matky, rasovou příslušnost, užívání cigaret a léků během těhotenství, nemoci matky, způsob otěhotnění nebo předchozí těhotenství. Podle této studie lze kombinací mateřské charakteristiky, hodnotou PI v *arteria uterina* a hladinou PIGF v mateřském séru identifikovat okolo 90% pacientek, které rozvinou časnou preeklampsii a přibližně 50% pacientek s pozdní preeklampsii (Akolekar *et al.*, 2008).

Toto byly pouze některé vybrané markery testované pro včasnou predikci preeklampsie. Je vidět, že v posledních letech probíhá mnoho studií, které se danou problematikou zabývají. Zatím se však nenašel spolehlivý marker, který by sám o sobě měl vysokou predikční hodnotu, ale při kombinaci více markerů najednou se predikční hodnota zvyšuje.

3.3.5. Léčba preeklampsie

Hlavním cílem léčby preeklampsie je porodit pokud možno zdravý plod a ochránit matku před zbytečnými komplikacemi. Pacientkám s diagnostikovanou preeklampsií je proto léčen vysoký krevní tlak. K tomu jsou používány antihypertensiva, která jsou bezpečná v těhotenství. Obvykle se využívají přípravky s účinnou látkou methyldopa, skupinou beta-blokátorů nebo blokátory vápníkových kanálů. Dále se ženám s preeklampsií podávají antikonvulziva, tedy medikamenty sloužící k uvolnění křečových stavů, jako prevence eklamptických záchvatů. Antikonvulzivní látkou podávající se ženám s preeklampsií je například benzodiazepin nebo magnézium sulfát ($MgSO_4$) (Euser *et* Cipolla, 2009). Při těžkých formách preeklampsie, které závažně ohrožují plod nebo při rozvoji eklampsie, je nutné ukončení těhotenství, a to buď vyvoláním porodu anebo císařským řezem.

4. Fetální růstová retardace

Fetální růstová retardace (FGR, fetal growth restriction) zahrnuje plody, jejichž hmotnost se nachází pod 10. percentilem pro dané gestační stáří. Spadají sem jak plody trpící intrauterinní růstovou retardací (IUGR), tak plody malé vzhledem ke svému gestačnímu stáří (SGA, small for gestational age). Tyto dva termíny se často zaměňují, avšak termín IUGR značí plody, které nedosáhnou svého růstového potenciálu v důsledku širokého spektra etiologických faktorů. Tyto plody mají zvýšené riziko perinatální morbidity a mortality. Na druhou stranu SGA plody jsou konstitučně malé, ale dosahují svého růstového potenciálu, a tudíž mají dobrou prognózu.

Intrauterinní růstová retardace je dále členěna na dvě skupiny – symetrická (proporcionální) IUGR a asymetrická (dysproporcionální) IUGR. Symetrická růstová

retardace tvoří 20 – 30% případů plodů s IUGR. Dochází při ní ke stejnému opoždění všech ultrazvukových biometrických parametrů (biparietální průměr, obvod hlavy, obvod břicha, délka stehenní kosti) oproti gestačnímu stáří. Symetrická růstová retardace obvykle vzniká v rané fázi fetálního vývoje a je obvykle spojena s dědičnou nebo vrozenou poruchou. Faktory, které limitují jak růst mozku, tak růst těla plodu, jsou chromozomální aberace, fetální infekce, kongenitální malformace a syndromy. Růst je snížen symetricky, protože negativní faktory působí v době, kdy dochází především k hyperplastickému růstu.

Během asymetrické růstové retardace, která tvoří 70 – 80% všech případů IUGR, je ve větší míře omezen nárůst obvodu břicha oproti růstu obvodu hlavy a muskuloskeletálním rozměrům v důsledku subnormální velikosti jater a nedostatečnému množství podkožního tuku. K asymetrické růstové retardaci dochází ke konci druhého nebo ve třetím trimestru díky snížené dodávce kyslíku a živin k plodu. Jedná se tedy o dobu, kdy dochází především k hypertrofickému růstu buněk. V reakci na tuto situaci dochází ke kompenzačním mechanismům a preferenčnímu toku krve k životně důležitým orgánům, jako jsou mozek, srdce a nadledviny (Resnik, 2002).

Růst plodu závisí na několika faktorech, mezi které patří faktory mateřské, fetální, placentární, ale také faktory vnějšího prostředí. Proto fetální růstová retardace není specifická nemoc, ale je projevem mnoha různých možných poruch matky i plodu, a proto je důležité, aby lékař zjistil co nejrychleji konkrétní příčinu nedostatečného růstu a mohl ji včas řešit. Na základě fetální anatomie, množství plodové vody a Dopplerovským hodnocení průtoku v *arteria umbilicalis*, *arteria uterina* a *arteria cerebri media* lze odlišit fetální růstovou retardaci založenou na funkční nedostatečnosti placenty od FGR způsobené aneuploidii nebo virovou infekcí.

Existuje mnoho příčin vzniku fetální růstové retardace. Obecně lze rozdělit faktory podílející se na vzniku FGR na mateřské, fetální a placentární.

Mezi fetální faktory způsobující FGR patří chromozomální aberace, které zahrnují jak plody s aneuploidii (např. Downův, Edwardsův, Patauův nebo Turnerův syndrom), tak strukturální změny chromozomů, dále pak strukturální malformace, jako například srdeční vady, renální agenezi nebo anencefalii, virové infekce plodu nebo vícečetná těhotenství.

Placentární faktory zahrnují abnormální trofoblastickou invazi, placentární infarkty, včestné lůžko nebo chorioangiom.

Nejobsáhlejší skupinou faktorů, podílejících se na vzniku FGR jsou faktory mateřské. Jedná se o zdravotní stav matky (různá onemocnění ledvin, cév nebo dýchací soustavy), stravování během těhotenství, kouření, užívání některých návykových látek a léků nebo pobyt ve vysokých nadmořských výškách.

Jedním z faktorů, který hraje důležitou roli při vzniku fetální růstové retardace je i preeklampsie. Časný nástup závažné preeklampsie a chronická hypertenze se superponovanou preeklampsií mají obvykle velmi vážný vliv na růst plodu. Odegard se svým týmem sledoval porodní hmotnost u 307 dětí, které se narodily po těhotenství s preeklampsií ve srovnání s 619 zdravými kontrolami. Výsledky studie ukázaly, že preeklampsie byla asociována s 5% redukcí novorozenecké váhy. Během gravidity se závažnou preeklampsií došlo ke 12% redukcí hmotnosti a u časného výskytu preeklampsie byla porodní hmotnost dokonce o 23% nižší než u zdravých novorozenců (Odegard *et al.*, 2000). Placenty plodů s fetální růstovou retardací mají obvykle abnormální velikost nebo funkci. To dokládá studie, která se zabývala hmotností placenty, porodní hmotností a jejich poměrem u dětí s fetální růstovou retardací, které měly klasickou chromozomovou výbavu a novorozenců s normální porodní hmotností. Děti s FGR měly o 24% menší placentu než stejně staré děti s normální porodní váhou. A při srovnání hmotnosti placenty s FGR a zdravých novorozenců se stejnou porodní hmotností se ukázalo, že placenta od novorozenců s FGR měla menší hmotnost než placenta zdravých jedinců, což naznačuje, že růst plodu závisí na aktuální hmotnosti placenty (Heinonen *et al.*, 2001).

Diagnostika fetální růstové retardace vzniklé na základě placentární insuficience je důležitá pro správné odlišení těchto plodů od jiných, které jsou například konstitučně malé (SGA) nebo mají jinou etiologii FGR. Při diagnostice fetální růstové retardace hraje klíčovou roli ultrazvukové vyšetření. Pomocí ultrazvuku určí lékař správné gestační stáří plodu. V prvním trimestru se pro určení gestačního stáří sleduje temeno-kostrční délka (crown-rump length, CRL). Ve druhém trimestru se pak provádí biometrické vyšetření plodu, na základě kterého se provede váhový odhad plodu. Pokud je odhadovaná hmotnost plodu pod 10. percentilem, ale nebyly zjištěny žádné vrozené vývojové vady ani abnormální množství plodové vody, používá se Dopplerovské ultrazvukové vyšetření, které odliší plody konstitučně malé od těch, u kterých se vyskytuje placentární insuficience. Pomocí Dopplerovského vyšetření průtokových parametrů cév lékař zjistí případné změny v cirkulaci krve ve fetoplacentární jednotce. Pro zjištění funkčnosti

placenty se sledují průtoky v *arteria umbilicalis* a *arteria uterina*. Během normálního těhotenství dochází ke kontinuálnímu diastolickému průtoku v *arteria umbilicalis*, který narůstá se stářím gestace. Při rozvoji placentární dysfunkce dochází ke zvýšení vaskulární rezistence v *arteria umbilicalis*, což se projeví poklesem toku v diastole a tím i zvýšením indexu pulsatility (PI). V nejtěžších případech může dojít až k reverznímu toku krve, což signalizuje těžkou placentární insuficienci, kdy dochází k redukci počtu arteriol v terciárních klcích. Krev tedy proudí v malém množství proti většímu odporu a dochází k poruše výměny mezi matkou a plodem. Další vyšetřovanou cévou pomocí Dopplerovského vyšetření je *arteria cerebri media*. Během FGR dochází k redistribuci krevního oběhu s preferencí životně důležitých orgánů, jako jsou například mozek, srdce nebo nadledviny. Dochází tak ke snížení vaskulární rezistence v *arteria cerebri media*, zvýšení krevního toku v diastole a snížení indexu pulsatility. Poměrem PI v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* vznikne cerebroplacentární poměr (CPR), který má vyšší prediktivní hodnotu pro hypoxii plodu než samotné průtoky v obou tepnách (Harkness *et Mari*, 2004).

5. Expresse proteinů tepelného šoku během těhotenství

Proteiny tepelného šoku jsou aktivovány v buňkách většiny organismů jako reakce na zvýšenou teplotu nebo jinou formu stresu. Shah se svým týmem zkoumal pomocí imunohistochemické detekce lokalizaci proteinů tepelného šoku (Hsp27, Hsp60, Hsp70 a Hsp90) v děložní sliznici a placentě během normálního těhotenství. Všechny sledované proteiny tepelného šoku detekoval ve stromálních buňkách děložní sliznice po celou dobu těhotenství. Na základě intenzity zbarvení nezaznamenal žádné změny během gestace u Hsp27 a Hsp60. U zbylých dvou proteinů (Hsp70 a Hsp90) zaznamenal snížení intenzity barvení s postupujícím stářím gestace. Co se týče lokalizace v buňce, tak Hsp60 a Hsp90 byly lokalizovány převážně v jádře, zatímco Hsp70 byl rovnoměrně rozmístěn v jádře i v cytoplazmě. Hsp27 byl lokalizován převážně v cytoplazmě. V placentě byly Hsp60, Hsp70 a Hsp90 lokalizovány v cytotrofoblastu, syncytiotrofoblastu, intermediálním trofoblastu, Hofbauerových a endoteliálních buňkách, přičemž Hsp60 a Hsp90 byly lokalizovány primárně v jádře a Hsp70 se nacházel jak v jádře, tak v cytoplazmě. Hsp27

byl detekován pouze v buňkách syncytiotrofoblastu a intermediálního trofoblastu, a to pouze v prvních dvou trimestrech (Shah *et al.*, 1998).

V roce 2004 skupina japonských vědců sledovala proteinovou expresi výše zmiňovaných proteinů tepelného šoku u různých patologických nálezů na placentách plodů s intrauterinní růstovou retardací. Ve studii imunohistochemicky analyzovali 27 placent s IUGR, přičemž se na placentách nacházely různé patologie – krevní sraženiny, infarkty, ukládání fibrinu, chorangiózy, avaskulární klky a nadměrné syncytiální uzly. Kontrolní skupinou byly placenty z fyziologického těhotenství. Výsledky týkající se exprese Hsp60, Hsp70 a Hsp90 na vzorcích fyziologických gravidit byly v souladu se studií provedenou Shahem. Co se týče Hsp27, tak Shah zaznamenal pouze slabou detekci Hsp27 v syncytiotrofoblastu, zatímco v této studii byla ve stejné oblasti placenty zaznamenána silná detekce. Autoři se domnívají, že rozdíl může být způsoben v rozdílu senzitivity specifických protilátek. Dále autoři prokázali zvýšenou expresi všech sledovaných hsp u placent s krevní sraženinou, avaskulárními klky a nadměrnými syncytiálními uzly a naopak sníženou expresi hsp u placent s infarktem oproti fyziologickým placentám. Z toho vyplývá, že buňky choriových klků reagovaly na stresové podmínky (např. hypoxii) zvýšenou nebo sníženou expresí hsp (Wataba *et al.*, 2004).

Ve studii z roku 2006 byla sledována exprese Hsp90 β v lidských endotelových buňkách pupečnickové žíly, a to jak na genové, tak na proteinové úrovni. Do této studie bylo zahrnuto 12 žen s preeklamsií (z toho 11 pacientek trpělo preeklamsií vážnou) a 30 žen s normálním průběhem těhotenství. Z výsledků vyplynulo, že exprese mRNA Hsp90 β byla mírně, ale nesignifikantně snížena, zatímco proteinová exprese byla down-regulována statisticky významně. Studie dále ukázala, že inhibice Hsp90 pomocí geldanamycinu vedla ke zvýšené produkci superoxidu, což naznačuje, že snížená exprese Hsp90 může přispívat k oxidačnímu stresu endotelových buněk (Gu *et al.*, 2006).

5.1. Hladiny Hsp70 během fyziologického těhotenství

Hsp70 je nejvíce studovaný protein tepelného šoku během těhotenství. Obvykle je považován za intracelulární protein, který funguje jako molekulární chaperon a má cytoprotektivní funkci. Nicméně Hsp70 (HSPA1A) je také přítomen v periferní cirkulaci zdravých těhotných i netěhotných jedinců. Během normálního těhotenství je hladina cirkulujícího Hsp70 oproti zdravým netěhotným ženám snížena a vykazuje pozitivní

korelaci s gestačním stářím matky a negativní korelaci s věkem matky. To znamená, že se koncentrace Hsp70 v séru zvyšuje s délkou gestace, ale také klesá s rostoucím věkem matky (Molvarec *et al.*, 2007). Ačkoliv intracelulární Hsp70 má protizánětlivé účinky, extracelulární Hsp70 vyvolává přirozenou a adaptivní prozánětlivou imunitní odpověď, což může být během těhotenství škodlivé a může vést k mateřské imunitní rejekci plodu.

Vzhledem k tomu, že polovina HLA antigenů plodu pochází od otce a plod je tedy semialogenní, musí existovat určité mechanismy, které udržují imunologickou toleranci matky k embryu/plodu během těhotenství. Během těhotenství dochází k přechodu imunitní reakce od Th1 typu k typu Th2 a dochází tak k upřednostňování humorální imunity a buněčná (cytotoxická) imunitní odpověď, která by mohla být škodlivá pro plod je potlačena. Imunitní reakce typu Th1 je pro plod nebezpečná z toho důvodu, že Th1 buňky secernují cytokiny, jako například interleukin 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ), tumor nekrotizující faktor (TNF), které ohrožují těhotenství. Naopak Th2 buňky produkují cytokiny, které inhibují sekreci Th1 cytokinů (Wegmann *et al.*, 1993).

Extracelulární Hsp70 způsobuje mimo jiné přeměnu tolerogenních nezralých dendritických buněk na imunogenní zralé dendritické buňky, které jsou považovány za nejučinnější buňky prezentující antigen (a zřejmě hrají klíčovou roli v kontrole mateřské imunitní odpovědi na plod), dále pak stimulaci cytolytické aktivity NK buněk a γ/δ T buněk, což může vést až k rejekci plodu mateřským imunitním systémem.

Během fyziologické gravidity dochází tudíž ke snížení extracelulárního Hsp70 pomocí přirozených imunitních mechanismů, přičemž snížená cirkulace Hsp70 pomáhá podporovat udržení imunologické tolerance k plodu. Během normálního těhotenství je aktivován přirozený imunitní systém matky, který zahrnuje zvýšení počtu a aktivaci monocytů a granulocytů, aktivaci komplementu a produkci proteinů akutní fáze (Sacks *et al.*, 1999). Aktivované monocyty a makrofágy obsahují na svém povrchu scavengerové receptory, jako například LOX-1, které váží Hsp70 (Theriault *et al.*, 2005). Další možností, jak snížit hladiny Hsp70, je eliminace pomocí přirozeně se vyskytujících protilátek anti-Hsp70 (Molvarec *et al.*, 2009).

5.2. Hladiny Hsp70 během preeklampsie

Intracelulární exprese Hsp70 může být vyvolána ischemií, reaktivními formami kyslíku, zánětlivými cytokiny nebo hemodynamickým stresem. Přičemž během

preeklampsie dochází jak k placentární ischemii a oxidačnímu stresu, nadměrné systémové zánětlivé odpovědi matky, tak k hemodynamickému stresu. Z těchto důvodů bylo také pozorováno signifikantní zvýšení Hsp70 v placentě u žen s těhotenskými komplikacemi souvisejícími s placentární insuficiencí – preeklampsie a/nebo fetální růstová retardace (Liu *et al.*, 2008). A to jak na základě studia mRNA, tak během studia na proteinové úrovni. Hnat se svým týmem provedl imunohistochemickou analýzu exprese Hsp70, jakožto markeru oxidačního stresu na vzorcích placent normotenzních žen, žen s preeklampií a žen s intrauterinní růstovou retardací. Avšak výsledky neprokázaly signifikantní rozdíl mezi fyziologickými těhotenstvími a těhotenstvími s preeklampií, resp. IUGR (Hnat *et al.*, 2005). Nicméně zvýšené hladiny Hsp70 v placentě během preeklampsie potvrdila i studie z roku 2008, která sledovala expresi jak konstitutivní, tak stresově indukované formy Hsp70 v reakci na oxidační stres (Padmini *et Geetha*, 2008). Jedna z nejnovějších studií, zabývající se expresí Hsp70 během preeklampsie, také poukazuje na signifikantní zvýšení proteinové exprese Hsp70 v placentě během preeklampsie a porodu, přičemž exprese tohoto proteinu se liší v různých oblastech placenty (Abdulsid *et al.*, 2013). Zvýšená genová exprese Hsp70 díky teplotně indukovanému stresu byla pozorována také v lymfocytech periferní krve u lidí s hypertenzí oproti normotenzní skupině (Kunes *et al.*, 1992). Z toho vyplývá, že systémový zánět a oxidativní stres jsou alespoň z části zodpovědné za zvýšené hladiny Hsp70 během preeklampsie. Studie zabývající se cirkulací Hsp70 v krvi nebo séru těhotných žen také ukazují zvýšené hladiny tohoto proteinu během preeklampsie. Jirecek se svým týmem sledoval sérové hladiny Hsp70 u žen se závažnou preeklampií, které si ještě rozdělil podle týdne porodu na časně a pozdní formy preeklampsie. U pacientek s časným nástupem závažné preeklampsie pak pozoroval vyšší hladiny Hsp70 než u zdravých těhotných žen (Jirecek *et al.*, 2002). Fukushima také zaznamenal signifikantně vyšší hladiny sérového Hsp70 u preeklampsie (Fukushima *et al.*, 2005). Zvýšená cirkulace Hsp70 nemusí sloužit pouze jako marker preeklampsie, ale může hrát roli také v její patogenezi. Extracelulární Hsp70 produkované stresovanými a poškozenými buňkami může vyvolat prozánětlivou (Th1) imunitní odpověď. A právě systémová zánětlivá odpověď matky se zdá být zodpovědná za některé příznaky preeklampsie.

6. Kvantifikace hsp genové exprese pomocí RT-PCR v reálném čase

Metoda polymerázové řetězové reakce slouží k amplifikaci specifického úseku DNA. Tento úsek musí být lemován sekvencí, kterou známe, abychom mohli navrhnout vhodnou dvojici primerů, komplementárních k lemující sekvenci. Jedná se o velice citlivou metodu, která umožňuje detekovat a amplifikovat i velmi malé množství DNA. Za objevitele PCR je pokládán americký biochemik Kary Mullis, který tuto metodu publikoval v roce 1986 (Mullis *et al.*, 1986). Od této doby došlo k mnoha zdokonalováním PCR a vynálezu různých modifikací klasické PCR.

PCR v reálném čase je modifikací klasické polymerázové řetězové reakce, která umožňuje monitorování fluorescence emitované během PCR jakožto indikátoru amplifikace požadovaného fragmentu v každém cyklu. V případě RT-PCR v reálném čase se jedná o metodu, která nám v prvním kroku přepíše mRNA do komplementární DNA (cDNA) a ve druhém kroku se tato cDNA amplifikuje pomocí PCR. Výhodou této metody je její rychlost, citlivost a spolehlivost detekce a kvantifikace specifického úseku RNA. Výsledky kvantifikace mohou být vyjádřeny v absolutních hodnotách, kde se determinuje výchozí počet kopií cílových molekul na základě odečtu ze standardních křivek. Další možností je využití relativní kvantifikace, kde se porovnává relativní změna genové exprese testovaného vzorku oproti vzorku referenčnímu.

Enzymy, které přepisují mRNA do cDNA se nazývají reverzní transkriptázy (RT), což jsou RNA dependentní DNA polymerázy. RNA transkripty mohou tvořit významné sekundární struktury, které pak dále ovlivňují funkci reverzních transkriptáz, což by mělo negativní vliv na průběh RT-PCR. Běžně používanými reverzními transkriptázami jsou reverzní transkriptázy z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT) nebo Molonayova myšího leukemického viru (MMLV-RT). AMV-RT je robustnější nežli MMLV-RT a zachovává si výraznou polymerační aktivitu i při vyšší teplotě oproti MMLV-RT, přičemž vyšší teplota je důležitá pro odstranění problémů se sekundární strukturou RNA. Naopak MMLV-RT a její deriváty mají podstatně nižší RNase H aktivitu (Gerard *et al.*, 1997) oproti AMV-RT, která degeneruje RNA templát. V dnešní době jsou komerčně dostupné i mutované verze obou enzymů, které mají vyšší teplotní stabilitu a inhibovanou RNasovou aktivitu. Jako primery během reverzní transkripce se používají: 1) oligo(dT) primery, které se váží na polyA konec mRNA, 2) sekvenčně specifické primery, které se váží pouze k námi zvolené

sekvenci nebo 3) náhodné hexanukleotidové primery, které jsou schopny vázat a zahajovat syntézu cDNA na mnoha místech podél celého RNA templátu.

Druhým krokem reakce je samotná PCR. Vzhledem k tomu, že se jedná o PCR v reálném čase, tak je nezbytnou podmínkou přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na cDNA. Úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Existuje několik možností jak detekovat amplifikovaný produkt. Lze využít DNA vazebné fluorescenční barvy (SYBR Green I), které se navazují na nově syntetizující vlákno DNA, a tím stoupá jejich fluorescenční aktivita. Další možností jsou hybridizační sondy. Při této metodě se využívají 2 oligonukleotidové sekvence značené fluorescenčními barvami. První z nich obsahuje na svém 3' konci fluorescein a druhá obsahuje na svém 5' konci jinou fluorescenční barvu. Během anelační fáze PCR dochází k hybridizaci obou oligonukleotidů k DNA tak, aby obě fluorescenční barvy nasedaly do své těsné blízkosti. Po hybridizaci a excitaci fluoresceinu pomocí světelného zdroje dochází k emisi zeleného fluorescenčního světla. Část excitační energie je převedena na přilehlou fluorescenční barvu, která následně emituje fluorescenční světlo delší vlnové délky. A právě toto světlo je měřeno fotodiodou (Wittwer *et al.*, 1997).

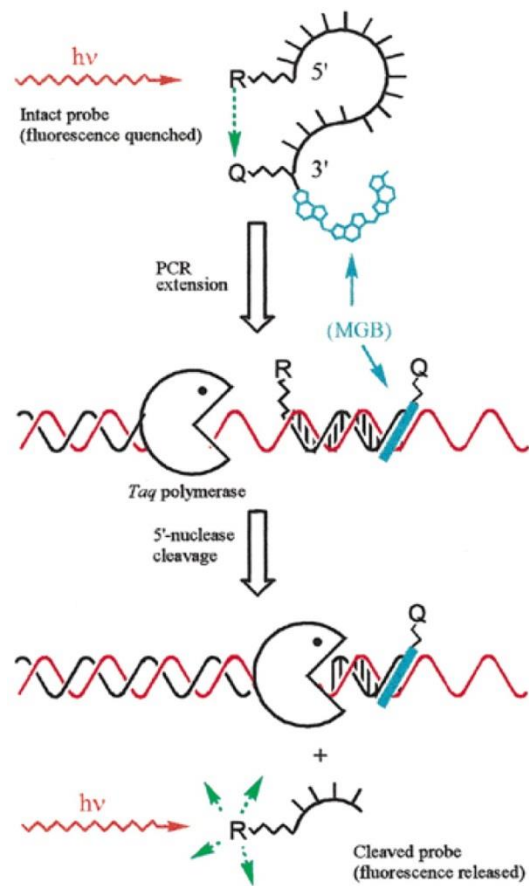
Další detekční metodou pro PCR v reálném čase je využití tzv. molekulárních majáčků (molecular beacon). Molekulární majáček je oligonukleotid, který obsahuje na jednom konci fluorescenční marker a na druhém konci zhášec (quencher). Zhášec je nefluorescenční chromofor, který odvádí energii přijatou od fluoroforu ve formě tepla. V roztoku tvoří molekulární majáčky vlásenkové uspořádání, při kterém se fluorescenční marker i zhášec dostanou do těsné blízkosti a v takovémto uspořádání nedochází k fluorescenci. Nicméně během anelační teploty dojde k hybridizaci ke komplementárnímu úseku DNA, oddálení fluorescenční značky a zhášeče a tím i k obnovení fluorescence (Tyagi *et Kramer*, 1996).

Jinou metodou detekce amplifikovaného produktu během PCR v reálném čase, kterou jsem během své práce používala i já, je využití hydrolyzační TaqMan sondy. Tato metoda je založena na 5' nukleázové aktivitě DNA polymerázy (např. Taq polymeráza), která rozštěpí a nahradí sondu hybridizovanou k cílové sekvenci DNA. Oligonukleotidová sonda, která je obvykle dlouhá 20-30 nukleotidů, obsahuje na svém 5' konci fluorescenční barvu označovanou jako reportér a na 3' konci je fluorescenční barva označovaná jako zhášec. Pokud je sonda vcelku, zhášec redukuje fluorescenční signál reportéru. Pokud

ovšem během anelační fáze PCR dojde k hybridizaci s templátovou DNA, tak v následné elongační fázi reakce, kdy DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec, dojde k rozštěpení sondy polymerázou. Po rozštěpení sondy nedochází k redukci fluorescenčního signálu reportérové barvy, čímž je umožněna fluorescence, která je následně detekována (Heid *et al.*, 1996).

Ve své práci jsem používala 5'FAM/3'TAMRA značené sondy. FAM (6-carboxyfluorescein) slouží jako reportér, který emituje při 520 nm a jedná se o jeden z nejčastěji používaných fluoroforů pro PCR v reálném čase. TAMRA (tetramethylrhodamine) funguje jako účinný zhášec fluorescence FAM. K uvolnění fluorescence dochází prostřednictvím 5' exonukleázové aktivity Taq polymerázy, která odštěpí FAM ze sondy hybridizované k cílové sekvenci DNA. Další reportérovou barvou, kterou jsem během své práce využívala k detekci beta-aktinu, byla VIC (4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein). Poslední typ sond, které jsem používala, byly MGB (*minor groove binder*, elementy vázající se do úzkého žlábků DNA) sondy. Jedná se o sondy, které obsahují na 5' konci reportérovou fluorescenční barvu (např. FAM) a na 3' konci zhášec a MGB skupinu. Zhášec může být jak fluorescenční (Kutyavin *et al.*, 2000), tak nefluorescenční (de Kok *et al.*, 2002). Výhodou nefluorescenčního zhášeče je, že nabízí nižší fluorescenční pozadí, což vede k lepší přesnosti detekce (Obrázek č. 1). MGB skupina stabilizuje hybridizované sondy a účinně zvyšuje teplotu tání, z čehož vyplývá, že MGB sondy mohou být kratší než klasické dvojité značené sondy a jejich délka se pohybuje do 20 nukleotidů.

Obrázek č. 1: Detekce amplifikace cílové sekvence DNA s využitím MGB sondy



Fluorescence neporušené sondy je zhášena pomocí zhášedce na 3' konci sondy. Během posledního kroku PCR cyklu (syntéza DNA), dochází k rozštěpení hybridizované sondy pomocí 5' exonukleázové činnosti Taq polymerázy a uvolnění fluorescenčního signálu, který je monitorován příslušným zařízením. MGB skupina zvyšuje T_m , což umožňuje použití kratší, sekvenčně specifické sondy (Kutyavin *et al.*, 2000).

7. Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit vztah mezi expresí proteinů tepelného šoku a těhotenskými komplikacemi asociovanými s placentární insuficiencí (preeklampsie, intrauterinní růstová retardace). Cíl práce jsem si vytvořila na základě hypotézy, která předpokládá zvýšenou expresi proteinů tepelného šoku u pacientek s těhotenskými komplikacemi souvisejícími s placentární nedostatečností oproti ženám s fyziologickým průběhem těhotenství. Expresi hsp jsem sledovala na vzorcích periferní krve a placentární tkáni. Detekovala jsem 5 hsp systémů – Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1. Výsledky exprese jsem interpretovala pomocí komparativní Ct metody s využitím beta-aktinu (*housekeeping* genu) a referenčního vzorku. Jednotlivé soubory vzorků, rozřazené podle diagnóz, jsem porovnávala pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Sledovala jsem jednak změnu genové exprese jednotlivých hsp systémů u konkrétních diagnóz oproti fyziologické skupině a dále jsem se také zaměřila na sledování změn exprese hsp v závislosti na závažnosti konkrétní patologie. Specificky jsem se zaměřila na závažnost preeklampsie (mírná/závažná), týden porodu (před/po 34. týdnu těhotenství) nebo na přítomnost oligohydramnionu.

K izolaci mRNA z placent a stejně tak ze vzorků periferní krve jsem používala QIAamp RNA Blood Mini Kit. Izolovanou RNA jsem kvantifikovala a detekovala pomocí reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

8. Materiál a metody

8.1. Materiál

Ve své práci jsem pracovala se vzorky placentární tkáně a plné periferní krve matky. Vzorky placentární tkáně byly průběžně získávány z Ústavu pro péči o matku a dítě (ÚPMD) v Praze - Podolí. Jednalo se jak o vzorky placent zdravých kontrol, tak o vzorky od pacientek s placentární insuficiencí (preeklampsie, IUGR) nebo gestační hypertenzí, či SGA. Vzorky byly skladovány v médiu RNAlater při teplotě -20 °C.

Vzorky periferní krve těhotných žen byly získávány z Fakultní nemocnice v Motole (vzorky fyziologických gravidit) a z ÚPMD (vzorky patologických gravidit). Žilní krev, kterou jsem analyzovala ve své diplomové práci, byla nabírána u zdravých žen v 36. týdnu těhotenství a u patologických gravidit v době manifestace klinických příznaků.

Všechny ženy, které se zúčastnily této studie, poskytly písemný informovaný souhlas.

8.1.1. Placentární tkáň

Každý vzorek placentární tkáně byl nejprve zbaven krve promytím v roztoku PBS a v lyzáčním roztoku. Následně byly vzorky uchovány v médiu RNAlater pro další použití.

Do své diplomové práce jsem zahrnula celkem 207 vzorků placent. Z toho 42 vzorků bylo odebráno z placent fyziologických těhotenství a 165 vzorků z placent s těhotenskými komplikacemi. Ženy s fyziologickým těhotenstvím byly definovány jako ty, které neměly žádné zdravotní, těhotenské ani chirurgické komplikace v průběhu gravidity, a které porodily zdravé dítě vážící více než 2500 gramů po ukončeném 37. týdnu gestace. V rámci patologických gravidit se jednalo o pacientky s preeklampií (PE), fetální růstovou retardací (FGR) a hypertenzí, které byly ještě dále členěny podle závažnosti onemocnění a týdne porodu. Ve skupině preeklampií jsem analyzovala celkem 80 vzorků, přičemž u 9 z nich se jednalo o mírnou preeklampií s porodem před 34. týdnem těhotenství, 27 vzorků bylo klasifikováno jako mírná preeklampsie s porodem po 34. týdnu těhotenství, 20 vzorků bylo zařazeno do skupiny závažné preeklampsie s porodem před 34. týdnem těhotenství a u zbylých 24 vzorků se jednalo o závažnou formu preeklampsie s porodem po 34. týdnu těhotenství. Další skupinu tvořily pacientky s preeklampií a zároveň fetální růstovou retardací. V této kategorii bylo celkem 15 pacientek, přičemž 10 z nich rodilo před 34. týdnem těhotenství a zbylých 5 po 34. týdnu těhotenství. Skupina fetální růstové retardace

obsahovala 39 vzorků, přičemž 7 vzorků placent bylo získáno před 34. týdnem těhotenství a 32 vzorků po 34. týdnu těhotenství. U pacientek s hypertenzí se jednalo převážně o hypertenzi gestační, kam bylo zařazeno 23 vzorků, dále v této kategorii bylo 7 vzorků placent od pacientek s esenciální hypertenzí a 1 vzorek od pacientky s hypertenzí sekundární, všechny tyto pacientky rodily po 34. týdnu těhotenství. Pro přehlednost jsou počty jednotlivých vzorků placent uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Počty analyzovaných vzorků placent v jednotlivých skupinách

		porod před 34. tt	porod po 34. tt
Fyziologická těhotenství		0	42
Preeklampsie	mírná	9	27
	závažná	20	24
Preeklampsie + fetální růstová retardace	mírná	3	4
	závažná	7	1
Fetální růstová retardace		7	32
Hypertenze	Gestační hypertenze	0	23
	Esenciální hypertenze	0	7
	Sekundární hypertenze	0	1

8.1.2. Plná periferní krev matky

Do analýzy jsem zahrнула 129 vzorků plných periferních krví matky. 32 z nich bylo odebráno ženám s fyziologickým průběhem těhotenství a 97 vzorků bylo od žen s příslušnou těhotenskou komplikací. Těhotenské komplikace byly rozřazeny do jednotlivých kategorií obdobně jako vzorky placent. Vzorků s preeklampsií jsem zpracovala celkem 47, přičemž u 4 vzorků se jednalo o mírnou preeklampsií s nutností porodu před 34. týdnem, u 15 vzorků se jednalo o mírnou preeklampsií s porodem po 34. týdnu, 13 vzorků bylo od pacientek se závažnou preeklampsií vyžadující porod před 34. týdnem a 15 vzorků obsahovalo závažnou preeklampsií manifestovanou po 34. týdnu.

Sedm pacientek manifestovalo jak preeklampsii, tak růstovou retardací plodu před 34. týdnem těhotenství a po 34. týdnu se preeklampsie spojená s fetální růstovou retardací vyskytovala u dvou případů. Samotná fetální růstová retardace se vyskytovala u 22 případů, u 8 z nich se vyskytovala před 34. týdnem a u zbylých 14 vzorků se jednalo o výskyt po 34. týdnu. V kategorii pacientek s hypertenzí se jednalo převážně o gestační hypertenzi, kam spadalo 17 případů. U dvou pacientek se jednalo o hypertenzi esenciální. Tabulka č. 2 ukazuje počty analyzovaných vzorků plných periferních krví matky v jednotlivých skupinách.

Tabulka č. 2: Počty analyzovaných vzorků periferních krví matky v jednotlivých skupinách

		porod před 34. tt	porod po 34. tt
Fyziologická těhotenství		0	32
Preeklampsie	mírná	4	15
	závažná	13	15
Preeklampsie + fetální růstová retardace	mírná	0	0
	závažná	7	2
Fetální růstová retardace		8	14
Hypertenze	Gestační hypertenze	2	15
	Esenciální hypertenze	0	2

8.2. Metody

8.2.1. Izolace RNA z placenty

RNA z placentární tkáně byla izolována pomocí QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podle protokolu od výrobce. Na jednu izolaci bylo použito 20-30 mg placentární tkáně, která byla homogenizována spolu s 600 µl naředěného pufru RLT (ředění: 990 µl pufru RLT + 10 µl beta-mercaptoetanolu). Vzniklý lyzát byl centrifugován 3 minuty při 14500 rpm a dále byl použit jen čistý supernatant. K supernatantu bylo přidáno 600 µl 70% etanolu a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Následně byl vzorek přepipetován na QIAamp spin kolonku a centrifugován 30 s při 14500 rpm.

K odstranění nečistot byly použity promývací pufry RW1 a RPE. Nejprve byl vzorek promyt 700 µl RW1 pufru a poté dvakrát 500 µl RPE pufru. Po každém přidání pufru byl vzorek centrifugován 30 s při 14500 rpm s výjimkou poslední centrifugace, která byla provedena při 20000 x g, 20 °C a po dobu 4 minut. Pro odstranění zbytkového pufru byl vzorek ještě jednou centrifugován při 20000 x g při 20 °C po dobu 2 minut. RNA byla eluována 50 µl RNase-free vody. Na závěr bylo ke vzorku přidáno 5 µl DNase I (Fermentas International, Ontario, Canada) a 5 µl 10x reaction buffer s MgCl₂ (Fermentas International, Ontario, Canada) a po 30 minutové inkubaci při 37 °C ještě 5 µl 50mM EDTA (Fermentas International, Ontario, Canada). Následovala 10 minutová inkubace při 65 °C. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000; Witec AG, Littau, Switzerland). Izolovaná RNA byla uchovávána při -20 °C.

8.2.2. Izolace RNA z plné periferní krve

RNA z plné periferní krve byla izolována pomocí QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) podle protokolu od výrobce. Na jednu izolaci bylo použito 200 µl periferní krve v chelatačním činidle EDTA. Tento objem byl smíchán s 1000 µl pufru EL. Následně byl vzorek 10 – 15 minut inkubován na ledu. Poté byl vzorek 10 minut centrifugován při 400 x g a teplotě 4 °C. Ke vzniklé peletě bylo přidáno 400 µl pufru EL a opět následovala centrifugace (400 x g, 4 °C, 10 min). K peletě bylo přidáno 350 µl ředěného pufru RLT (ředění: 990 µl pufru RLT + 10 µl beta-mercaptoetanolu). Vzorek byl přepipetován na kolonku QIAshredder spin column a centrifugován při 14500 rpm po dobu 3 minut. K lyzátu bylo přidáno 350 µl 70% etanolu a celý vzorek byl aplikován na QIAamp spin kolonku a centrifugován 30 s při 14500 rpm. K odstranění nečistot byly použity promývací pufry RW1 a RPE. Nejprve byl vzorek promyt 700 µl RW1 pufru a poté dvakrát 500 µl RPE pufru. Po každém přidání pufru byl vzorek centrifugován 30 s při 14500 rpm s výjimkou poslední centrifugace, která byla provedena při 20000 x g, 20 °C a po dobu 4 minut. Pro odstranění zbytkového pufru byl vzorek ještě jednou centrifugován při 20000 x g při 20 °C po dobu 2 minut. RNA byla eluována 50 µl RNase-free vody. Na závěr bylo ke vzorku přidáno 5 µl DNase I (Fermentas International, Ontario, Canada) a 5 µl 10x reaction buffer s MgCl₂ (Fermentas International, Ontario, Canada) a po 30 minutové inkubaci při 37 °C ještě 5 µl 50mM EDTA (Fermentas International, Ontario, Canada). Následovala 10 minutová inkubace při 65 °C. Koncentrace izolované RNA byla

změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop-1000; Witec AG, Littau, Switzerland). Izolovaná RNA byla uchovávána při -20 °C.

8.2.3. RT-PCR v reálném čase

Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase byla stěžejní metodou mé diplomové práce. Využívala jsem ji k detekci mRNA pro hsp a beta-aktin z izolované celkové RNA. Analýza vzorků byla prováděna na 7500 real-time PCR systému (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Ve vzorcích jsem detekovala 5 hsp systémů – Hsp27 (HSPB1, délka amplikonu 67 bp), Hsp60 (HSPD1, délka amplikonu 69 bp), Hsp70 (HSPA1A, délka amplikonu 87 bp), Hsp90 (HSP90AA1, délka amplikonu 85 bp), HspBP1 (HSPBP1, délka amplikonu 66 bp) a beta-aktin (ACTB, *housekeeping* gen, délka amplikonu 70 bp). PCR probíhala v duplexu, přičemž v každé jamce jsem vždy detekovala jak beta-aktin, tak jeden konkrétní hsp. Reakční objem PCR směsi byl 25 μ l, přičemž 20 μ l tvořila reakční směs a 5 μ l tvořil templát. Výjimkou byla analýza vzorků plné periferní krve matky na systémech Hsp60 a HspBP1, kde z důvodu navýšení obsahu templátu bylo k analýze použito 19,625 μ l reakční směsi a 5,375 μ l templátu pro systém Hsp60 a 18 μ l reakční směsi a 7 μ l templátu pro systém HspBP1. Analýza vzorků byla prováděna v osmijamkových stripech. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech, vzorek referenční placenty byl analyzován v triplicátu. Vzorky byly ředěny DEPC – Treated Water (Ambion, Foster City, California, USA) v závislosti na typu analyzovaného vzorku a na systému hsp. Vzorky placentární tkáně byly naředěny na finální koncentraci 2 ng/ μ l pro Hsp27, Hsp70 a Hsp90. Pro systémy Hsp60 a HspBP1 byly vzorky ředěny na 100 - 200 ng/ μ l, v závislosti na počáteční koncentraci RNA v daném vzorku. Vzorky plné periferní krve byly ředěny pro systémy Hsp27, Hsp70 a Hsp90 stejně jako vzorky placent na 2 ng/ μ l. Pro zbylé dva systémy bylo provedeno ředění v poměru 1:1. Reakční směs použitá pro RT-PCR v reálném čase obsahovala TaqMan One-Step PCR Master Mix Reagents ve složení 2x Master Mix a 40x MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (pro hsp a beta-aktin), TaqMan sodu (pro hsp a beta-aktin) a vodu. Všechny primery byly naředěny na koncentraci 10 μ M. Sonden byly naředěny na koncentraci 20 μ M. Reakční směsi pro jednotlivé hsp systémy byly připraveny podle tabulek č. 3 a 4. Podmínky PCR

byly nastaveny podle manuálu výrobce. Prvním krokem byla reverzní transkripce, která probíhala při 48 °C 30 minut. Následovala desetiminutová preinkubace při 95 °C nutná pro aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymerázy. Následně proběhlo 50 cyklů dvoukrokové PCR. V prvním kroku, který probíhal při 95 °C a trval 15 sekund, došlo k denuraci cDNA. Druhý krok, trvající 1 minutu při 60 °C, představoval anelaci primerů a syntézu DNA. Tabulka č. 5 znázorňuje sekvence primerů a sond používaných v analýze.

Tabulka č. 3: Příprava reakční směsi pro detekci jednotlivých hsp systémů v placentě, rozpis na 1 jamku, veškeré objemy jsou uváděny v µl.

	<i>Hsp27</i>	<i>Hsp60</i>	<i>Hsp70</i>	<i>Hsp90</i>	<i>HspBPI</i>
<i>2xMM</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>DEPC voda</i>	0,25	0,375	3,375	3,375	2
<i>40xRT</i>	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
<i>hsp (F+R)</i>	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
<i>hsp sonda</i>	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>beta-aktin (F+R)</i>	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
<i>beta-aktin sonda</i>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125

Tabulka č. 4: Příprava reakční směsi pro detekci jednotlivých hsp systémů ve vzorcích plné periferní krve, rozpis na 1 jamku, veškeré objemy jsou uváděny v μl .

	<i>Hsp27</i>	<i>Hsp60</i>	<i>Hsp70</i>	<i>Hsp90</i>	<i>HspBP1</i>
<i>2xMM</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>DEPC voda</i>	0,25	0	3,375	3,375	0
<i>40xRT</i>	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
<i>hsp (F+R)</i>	2,25 + 2,25	2,25 + 2,25	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	1,75 + 1,75
<i>hsp sonda</i>	0,375	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>beta-aktin (F+R)</i>	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,75 + 0,75	0,5 + 0,5
<i>beta-aktin sonda</i>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125

Tabulka č. 5: Sekvence primerů a sond používaných při analýze

<i>gen</i>	<i>informace o genu – NCBI, Entrez Gene</i>	<i>sekvence přímého (forward) primeru</i>
		<i>sekvence zpětného (reverse) primeru</i>
<i>Hsp27</i>	HSPB1, ID genu 3315	5'- TCC CTG GAT GTC AAC CAC TTC -3'
		5'- TCT CCA CCA CGC CAT CCT -3'
<i>Hsp60</i>	HSPD1, ID genu 3329	5'- GAT GTT GAT GGA GAA GCT CTA AGT ACA -3'
		5'- TGC CAC AAC CTG AAG ACC AA -3'
<i>Hsp70</i>	HSPA1A, ID genu 3303	5'- ACC AAG CAG ACG CAG ATC TTC -3'
		5'- GCC CTC GTA CAC CTG GAT CA -3'
<i>Hsp90</i>	HSP90AA1, ID genu 3320	5'- TGC GGT CAC TTA GCC AAG ATG -3'
		5'- GAA AGG CGA ACG TCT CAA CCT -3'
<i>HspBP1</i>	HSPBP1, ID genu 23640	5'- TGG CCG ACC TGT GTG AGA -3'
		5'- GCA GGT GCA TGC CAG ACA -3'
<i>beta- aktin</i>	ACTB, ID genu 60	5'- CCT GGC ACC CAG CAC AAT -3'
		5'- GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT -3'

<i>gen</i>	<i>sekvence sond</i>
<i>Hsp27</i>	5' - (6FAM) CCC CGG ACG AGC TGA CGG TC (TAMRA) - 3'
<i>Hsp60</i>	5' - (6FAM) TCG TCT TGA ATA GGC TAA AG (MGB) - 3'
<i>Hsp70</i>	5' - (6FAM) CCT ACT CCG ACA ACC AAC CCG GG (TAMRA) - 3'
<i>Hsp90</i>	5' - (6FAM) CCC AGA CCC AAG ACC AAC CGA TGG (TAMRA) - 3'
<i>HspBP1</i>	5' - (6FAM) CAT GGA CAA TGC CG (MGB) - 3'
<i>beta-aktin</i>	5' - (VIC) ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG CGC (TAMRA) - 3'

8.2.4. Komparativní Ct metoda a statistické vyhodnocení výsledků

Pro analýzu relativních změn v genové expresi jsem použila $2^{-\Delta\Delta Ct}$ algoritmus, známý také jako komparativní Ct metoda. Hodnota Ct, neboli cycle threshold (prahová hodnota), udává cyklus, ve kterém amplifikační křivka poprvé překročí daný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce.

Komparativní Ct metoda vyžaduje použití *housekeeping* genu, který je trvale exprimován ve všech studovaných vzorcích stejně tak, jako v referenčním vzorku. Během své práce jsem používala beta-aktin jako *housekeeping* gen. Genovou expresi testovaných vzorků jsem pak srovnávala s genovou expresí vzorku referenčního, tzn. porovnávala jsem relativní změnu genové exprese v testovaném vzorku vůči vzorku referenčnímu.

Pro zjištění změny genové exprese u testovaného vzorku oproti referenčnímu vzorku jsem použila následující rovnici (Livak *et* Schmittgen, 2001):

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

kde

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hsp}} - Ct_{\text{beta-aktin}})_{\text{testovaného vzorku}} - (Ct_{\text{hsp}} - Ct_{\text{beta-aktin}})_{\text{referenčního vzorku}}$$

Rozdíl hodnot Ct_{hsp} a $Ct_{\text{beta-aktin}}$ slouží k eliminaci rušivé variability uvnitř dané reakce, jako je pipetování a různé podmínky analýzy.

K posouzení rozdílu exprese hsp mezi fyziologickými graviditami a graviditami s těhotenskými komplikacemi jsem využila program Statistica 9.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), a analýzy rozptylu (ANOVA). Dále jsem pomocí Spearmanova korelačního koeficientu hodnotila vztah mezi expresí jednotlivých hsp systémů a Dopplerovskými ultrazvukovými parametry. Spearmanův korelační koeficient jsem počítala v programu KyPlot version 2.0 beta 13. Všechny grafy jsem vytvářela v programu Statistica 9.0.

9. Výsledky

Výsledky RT-PCR v reálném čase jsem vyjadřovala na základě relativní kvantifikace. Využila jsem k tomu komparativní Ct metodu, pomocí které jsem porovnávala relativní změnu genové exprese hsp v testovaném vzorku (vzorek placentární tkáně nebo plné periferní krve) vůči vzorku referenčnímu, kterým byl jeden náhodně vybraný vzorek placentární tkáně z fyziologické gravidity. Hodnoty Ct amplifikační křivky pro jednotlivé hsp systémy jsem normalizovala oproti Ct beta-aktinu (*housekeeping* gen). Dosažené výsledky jsem následně statisticky zpracovala.

9.1. Výsledky exprese hsp v placentární tkáni

9.1.1. Exprese hsp v jednotlivých skupinách těhotenských patologií

Pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (One-Way ANOVA) jsem provedla skupinovou analýzu. Všechny patologické vzorky jsem rozdělila podle diagnózy do třech skupin. První skupinu tvořily vzorky od žen s preeklampií a preeklampií asociovanou s fetální růstovou retardací (PE+/-FGR). Do této kategorie spadalo celkem 95 vzorků. Další skupinou byly vzorky od žen trpících hypertenzí. Největší zastoupení zde měla gestační hypertenze, nicméně zde byly zařazeny i ženy s hypertenzí esenciální a sekundární. Do této kategorie spadalo celkem 31 vzorků. Poslední skupinou byly vzorky s růstovou retardací plodu (FGR). Do této skupiny spadaly převážně vzorky s intrauterinní růstovou retardací, ale bylo zde také několik SGA vzorků. Celkově tato skupina obsahovala 39 vzorků. Všechny tři skupiny jsem porovnávala se 42 fyziologickými vzorky. U všech skupin jsem sledovala expresi 5 hsp systémů – Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a HspBP1 a dále pak poměr HspBP1/Hsp70. ANOVA prokázala statisticky signifikantní zvýšení exprese Hsp27 a Hsp90. Pomocí následné post-hoc analýzy s využitím Bonferonniho testu jsem zaznamenala jak u Hsp27, tak u Hsp90 zvýšení exprese hsp ve skupině PE+/-FGR. Sílu testu jsem pro zjednodušení uváděla pouze u statisticky signifikantních výsledků. Výsledky analýzy: **Hsp27** (F= 2,4221, df 3,203, **p= 0,046**; PE+/-FGR: 95% CI: -1,65058 až -0,046021, **p= 0,032**; hypertenze: 95% CI: -1,45147 až 0,588754, p= 1,0; FGR: 95% CI: -1,53717 až 0,378880, p= 0,652) **síla testu byla 65,46%** ($\alpha= 0,05$), Hsp60 (F= 1,0823, df 3,203, p= 0,358; PE+/-FGR: 95% CI: -1,39676 až 0,672008, p= 1,0; hypertenze: 95% CI: -1,85862 až 0,784976, p= 1,0; FGR:

95% CI: -2,05948 až 0,423219, $p=0,484$), Hsp70 ($F=1,5929$, $df\ 3,203$, $p=0,192$; PE+/-FGR: 95% CI: -1,85115 až 0,460570, $p=0,663$; hypertenze: 95% CI: -1,37240 až 1,581647, $p=1,0$; FGR: 95% CI: -2,08926 až 0,684996, $p=1,0$), **Hsp90** ($F=3,2597$, $df\ 3,203$, $p=0,016$; PE+/-FGR: 95% CI: -0,578121 až -0,000635, $p=0,048$; hypertenze: 95% CI: -0,349841 až 0,384442, $p=1,0$; FGR: 95% CI: -0,482930 až 0,206663, $p=1,0$), **síla testu byla 78,04%** ($\alpha=0,05$), HspBP1 ($F=1,3794$, $df\ 3,203$, $p=0,250$; PE+/-FGR: 95% CI: -9,4995 až 8,704952, $p=0,534$; hypertenze: 95% CI: -13,2383 až 6,145842, $p=1,0$; FGR: 95% CI: -12,4501 až 2,719217, $p=1,0$), poměr HspBP1/Hsp70 ($F=1,1959$, $df\ 3,203$, $p=0,312$; PE+/-FGR: 95% CI: -11,9897 až 3,211336, $p=0,753$; hypertenze: 95% CI: -13,1322 až 6,292516, $p=1,0$; FGR: 95% CI: -9,2302 až 9,012283, $p=1,0$). Pro lepší přehlednost jsem uvedla výsledky také do tabulky č. 6, kde tučně označené hodnoty značí signifikantní změnu exprese hsp, šipka pak značí zvýšení nebo snížení exprese. Výsledky jsem také uvedla do grafické podoby (Graf č. 1), kde jednotlivé krabicové grafy (A-F) značí konkrétní hsp systém, přičemž vždy první box značí fyziologická těhotenství, druhý PE+/-FGR, třetí FGR a poslední hypertenzi.

Tabulka č. 6: Skupinová analýza vzorků placentární tkáně (ANOVA)

Hsp27		F= 2,4221	df (3,203)	p= 0,046
		síla testu (95% CI): 65,46%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI (confidence interval, interval spolehlivosti)	
↑	FG x PE+/- FGR	p= 0,032	-1,65058 až -0,046021	
	FG x hypertenze	$p=1,0$	-1,45147 až 0,588754	
	FG x FGR	$p=0,652$	-1,53717 až 0,378880	
Hsp60		F= 1,0823	df (3,203)	p= 0,358
		síla testu (95% CI): 29,02%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	$p=1,0$	-1,39676 až 0,672008	
	FG x hypertenze	$p=1,0$	-1,85862 až 0,784976	
	FG x FGR	$p=0,484$	-2,05948 až 0,423219	

Hsp70		F= 1,5929	df (3,203)	p= 0,192
		síla testu (95% CI): 41,53%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	p= 0,663	-1,85115 až 0,460570	
	FG x hypertenze	p= 1,0	-1,37240 až 1,581647	
	FG x FGR	p= 1,0	-2,08926 až 0,684996	
Hsp90		F= 3,2597	df (3,203)	p= 0,016
		síla testu (95% CI): 78,04%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
↑	FG x PE+/- FGR	p= 0,048	-0,578121 až -0,000635	
	FG x hypertenze	p= 1,0	-0,349841 až 0,384442	
	FG x FGR	p= 1,0	-0,482930 až 0,206663	
HspBP1		F= 1,3794	df (3,203)	p= 0,250
		síla testu (95% CI): 36,35%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	p= 0,534	-9,4995 až 8,704952	
	FG x hypertenze	p= 1,0	-13,2383 až 6,145842	
	FG x FGR	p= 1,0	-12,4501 až 2,719217	
HspBP1/Hsp70		F= 1,1959	df (3,203)	p= 0,312
		síla testu (95% CI): 31,83%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	p= 0,753	-11,9897 až 3,211336	
	FG x hypertenze	p= 1,0	-13,1322 až 6,292516	
	FG x FGR	p= 1,0	-9,2302 až 9,012283	

9.1.2. Vztah mezi expresí hsp v placentární tkáni a závažností preeklampsie

Po zhodnocení exprese hsp v jednotlivých skupinách jsem se detailněji zaměřila na konkrétní patologie. Nejprve jsem podrobně analyzovala kategorii PE+/-FGR. Sledovala jsem, zda se liší exprese proteinů tepelného šoku s ohledem na závažnost preeklampsie podle klinických symptomů, tedy zda existuje rozdíl v expresi hsp mezi mírnou a závažnou

preeklamsií. Dále jsem sledovala, zda se liší exprese jednotlivých hsp v závislosti na závažnosti patologie s ohledem na týden porodu. V tomto případě jsem vzorky rozdělila do dvou kategorií podle nutnosti předčasného ukončení těhotenství – porod před a po 34. týdnu gestace. Vzorků s mírnou preeklamsií jsem měla k dispozici 43 a zbylých 52 žen trpělo preeklamsií vážnou. Porod před 34. týdnem vyžadoval stav u 39 pacientek a 56 žen rodilo po 34. týdnu gestace. Pro statistické zhodnocení výsledků jsem použila dvoufaktorovou analýzu rozptylu (Two-Way ANOVA), kde F1 značí rozdělení preeklamsie na mírnou a závažnou a F2 značí závažnost patologie podle týdne porodu (před vs. po 34. týdnu těhotenství). Výsledky ukázaly, že závažnost preeklamsie ve skupině PE+/-FGR nemá vliv na expresi Hsp27 ($F= 0,95861$, df 1,91, $p= 0,330$; $F1= 1,9702$, df 1,91, $p= 0,16383$; $F2= 2,5680$, df 1,91, $p= 0,113$), Hsp60 ($F= 0,96640$, df 1,91, $p= 0,328$; $F1= 0,03440$, df 1,91, $p= 0,853$; $F2= 2,0236$, df 1,91, $p= 0,158$), Hsp70 ($F= 2,1954$, df 1,91, $p= 0,142$; $F1= 1,4253$, df 1,91, $p= 0,236$; $F2= 0,46193$, df 1,91, $p= 0,498$), Hsp90 ($F= 0,847$, df 1,91, $p= 0,360$; $F1= 3,4008$, df 1,91, $p= 0,068$; $F2= 0,08213$, df 1,91, $p= 0,775$). Ani poměr HspBP1/Hsp70 neukázal žádný signifikantní rozdíl ($F= 0,02738$, df 1,87, $p= 0,869$; $F1= 1,3779$, df 1,87, $p= 0,244$; $F2= 0,70623$, df 1,87, $p= 0,403$). Nicméně v případě **HspBP1** ($F= 0,00023$, df 1,87, $p= 0,988$; $F1= 7,6298$, df 1,87, **$p= 0,007$** ; $F2= 0,02905$, df 1,87, $p= 0,865$) byla zjištěna vyšší exprese u pacientek s mírnou preeklamsií ve srovnání s pacientkami s preeklamsií závažnou. **Síla testu F1 byla 77,98%** ($\alpha= 0,05$). Graf č. 2 ukazuje zvýšenou expresi HspBP1 u mírné preeklamsie ve srovnání s preeklamsií závažnou. Z grafu je dále patrné, že týden porodu nemá vliv na expresi HspBP1.

9.1.3. Exprese hsp v placentární tkáni u PE+/-FGR ve vztahu k výskytu předchozí hypertenze

Dále jsem se zaměřila na sledování exprese proteinů tepelného šoku ve skupině PE+/-FGR ve vztahu k předchozí hypertenzi. Pacientky jsem rozdělila do dvou skupin na základě toho, zda se u nich vyskytovala hypertenze už před těhotenstvím, tzv. preeklamsie nasedající na předchozí hypertenzi nebo zda u nich došlo k náhlému rozvoji preeklamsie až během těhotenství. Z 95 pacientek s preeklamsií, popřípadě preeklamsií asociovanou s fetální růstovou retardací nemělo 70 pacientek předchozí hypertenzi. U zbylých 25 žen se objevila preeklamsie nasedající na předchozí hypertenzi. K analýze

jsem využila jednofaktorovou analýzu rozptylu. Z výsledků vyplynulo, že výskyt předchozí hypertenze ve skupině PE+/-FGR nemá vliv na expresi hsp v placentární tkáni. Hsp27 (F= 0,98597, df 1,93, p= 0,323; 95% CI: -0,463967 až 1,392017), Hsp60 (F= 0,35559, df 1,93, p= 0,552; 95% CI: -0,512265 až 0,951953), Hsp70 (F= 0,27467, df 1,93, p= 0,601; 95% CI: -0,925026 až 1,588350), Hsp90 (F= 1,8893, df 1,93, p= 0,173; 95% CI: -0,101299 až 0,556873), HspBP1 (F= 1,1271, df 1,89, p= 0,291; 95% CI: -0,478569 až 1,576709), poměr HspBP1/Hsp70 (F= 2,8647, df 1,89, p= 0,094; 95% CI: -0,079487 až 0,993290).

9.1.4. Exprese hsp v placentární tkáni ve vztahu k závažnosti růstové retardace plodu

Porovnávala jsem hsp expresi v placentární tkáni mezi těhotenstvím s výskytem oligohydramnionu, popřípadě anhydramnionu a těhotenstvím s normálním množstvím plodové vody. Dále jsem rozdělila pacientky podle týdne porodu. Opět podle toho, zda byl indikován porod před nebo až po 34. týdnu těhotenství. Z celkového počtu 39 pacientek s diagnózou FGR, mělo 14 žen oligohydramnion nebo anhydramnion a 25 žen mělo normální množství plodové vody. Po rozdělení pacientek podle týdne porodu spadalo 7 vzorků do skupiny porodů před 34. týdnem a zbylých 32 žen po 34. týdnu těhotenství. K analýze jsem použila dvoufaktorovou analýzu rozptylu, kde F1 značí rozdělení podle výskytu oligohydramnionu/anhydramnionu a normálního množství plodové vody a F2 značí závažnost patologie podle týdne porodu (před vs. po 34. týdnem gestace). Z výsledků vyplývá, že závažnost fetální růstové retardace nemá vliv na expresi proteinů tepelného šoku v placentární tkáni: Hsp27 (F= 0,92801, df 1,35, p= 0,342; F1= 0,55710, df 1,35, p= 0,460; F2= 0,06144, df 1,35, p= 0,806), Hsp60 (F= 0,10715, df 1,35, p= 0,745; F1= 0,56617, df 1,35, p= 0,457; F2= 0,42806, df 1,35, p= 0,517), Hsp70 (F= 0,21534, df 1,35, p= 0,645; F1= 0,01157, df 1,35, p= 0,915; F2= 0,67405, df 1,35, p= 0,417), Hsp90 (F= 0,32178, df 1,35, p= 0,574; F1= 0,68621, df 1,35, p= 0,413; F2= 0,53675, df 1,35, p= 0,469), HspBP1 (F= 0,50771, df 1,35, p= 0,48085; F1= 0,25765, df 1,35, p= 0,615; F2= 1,4209, df 1,35, p= 0,24127), poměr HspBP1/Hsp70 (F= 0,20273, df 1,35, p= 0,655; F1= 0,23435, df 1,35, p= 0,631; F2= 0,57795, df 1,35, p= 0,452).

9.1.5. Exprese hsp v placentární tkáni ve vztahu k Dopplerovským ultrazvukovým parametrům

Ve své práci jsem se zaměřila také na sledování vztahu mezi expresí proteinů tepelného šoku v placentární tkáni a klinickými daty získanými z Dopplerovského ultrazvukového vyšetření. Jednalo se o hodnoty indexu pulsatility (PI) v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* a dále pak o cerebroplacentární poměr (CPR). Index pulsatility slouží k posuzování toku krve cévou ve smyslu posouzení periferního odporu cévní stěny. Je definován jako rozdíl rychlosti toku krve při systolickém vrcholu a rychlosti toku na konci diastoly děleno střední průtokovou rychlostí za jeden srdeční cyklus. Díky měření indexu pulsatility v *arteria umbilicalis*, jehož hodnoty jsou charakteristické pro dané gestační stáří, můžeme posoudit funkční stav placenty. Při fyziologickém těhotenství dochází k postupnému snižování hodnot PI v *arteria umbilicalis* v závislosti na gestačním stáří plodu. Během rozvoje těhotenské komplikace asociované s placentární insuficiencí ovšem dochází ke zvýšení PI nad 95. percentil pro dané gestační stáří. U *arteria cerebri media*, která nejspolehlivěji odráží úroveň průtokových poměrů v oblasti cerebrálního řečiště, dochází při rozvíjející se hypoxii plodu k vazodilataci, na základě čehož dojde k poklesu hodnot PI. Kritické hodnoty jsou uváděny pod 5. percentilem pro dané gestační stáří (Parra-Cordero *et al.*, 2007). Cerebroplacentární poměr udává podíl indexu pulsatility v *arteria cerebri media* a v *arteria umbilicalis*. Pro zjištění vztahu mezi expresí hsp a hodnotami PI v *arteria umbilicalis*, *arteria cerebri media* a jejich poměrem ve skupině patologických vzorků (PE+/-FGR, FGR) jsem využila jednofaktorovou analýzu rozptylu a Spearmanův korelační koeficient.

Nejprve jsem se zaměřila na posouzení vztahu indexu pulsatility v *arteria umbilicalis* k expresi hsp v placentární tkáni. K dispozici jsem měla celkem 99 patologických vzorků (PE+/-FGR, FGR), u kterých byly zároveň uvedeny hodnoty PI v *arteria umbilicalis*. 71 těchto vzorků vykazovalo normální hodnoty PI a u zbylých 28 se vyskytoval abnormální průtok. Po provedení jednofaktorové analýzy rozptylu jsem nezaznamenala signifikantní rozdíl mezi expresí hsp v placentární tkáni a normálními anebo abnormálními PI v *arteria umbilicalis* ani u jednoho systému: Hsp27 (F= 0,00408, df 1,97, p= 0,949; 95% CI: -0,576590 až 0,614939), Hsp60 (F= 0,48700, df 1,97, p= 0,487; 95% CI: -0,778462 až 1,622759), Hsp70 (F= 1,4307, df 1,97, p= 0,235; 95% CI: -0,437754 až 1,765632), Hsp90 (F= 0,10693, df 1,97, p= 0,744; 95% CI: -0,301756 až

0,216387), HspBP1 (F= 0,240, df 1,97, p= 0,625; 95% CI: -7,85491 až 4,745900), poměr HspBP1/Hsp70 (F= 0,35720, df 1,97, p= 0,551; 95% CI: -8,18771 až 4,397814). Spearmanův korelační koeficient poukazyval na slabou negativní korelaci mezi PI v *arteria umbilicalis* a HspBP1 a také mezi poměrem HspBP1/Hsp70. Výsledky Spearmanova korelačního koeficientu jsou uvedeny v tabulce č. 7, tučně jsou vyznačeny hodnoty vykazující statisticky signifikantní výsledek. Grafy č. 3 a 4 ukazují slabou negativní korelaci mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a expresí HspBP1 (graf č. 3) a poměrem HspBP1/Hsp70 (graf č. 4).

Tabulka č. 7: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a expresí hsp v placentě

Hsp	Spearmanův korelační koeficient		korelace
	ρ	p	
Hsp27	-0,003	0,974	
Hsp60	-0,019	0,848	
Hsp70	-0,078	0,441	
Hsp90	0,068	0,502	
HspBP1	-0,253	0,013	slabá negativní korelace
HspBP1/Hsp70	-0,207	0,042	slabá negativní korelace

Následně jsem posuzovala vztah mezi expresí hsp a PI v *arteria cerebri media*. Celkem jsem měla k dispozici 61 vzorků, opět od žen s preeklampií nebo fetální růstovou retardací. 43 z těchto vzorků mělo normální hodnoty indexu pulsatility a 18 vzorků vykazovalo abnormální hodnoty. Jednofaktorová ANOVA neprokázala vliv patologických či normálních hodnot PI v *arteria cerebri media* na expresi hsp: Hsp27 (F= 0,02071, df 1,59, p= 0,886; 95% CI: -0,829758 až 0,718413), Hsp60 (F= 1,0309, df 1,59, p= 0,314; 95% CI: -0,912027 až 2,791023), Hsp70 (F= 0,838, df 1,59, p= 0,365; 95% CI: -0,603660 až 1,617756), Hsp90 (F= 0,02324, df 1,59, p= 0,879; 95% CI: -0,300781 až 0,350394), HspBP1 (F= 1,0878, df 1,57, p= 0,30136; 95% CI: -0,260679 až 0,827408), HspBP1/Hsp70 (F= 0,87186, df 1,57, p= 0,354; 95% CI: -0,743658 až 0,270680). Ani Spearmanův korelační koeficient neprokázal žádnou závislost mezi uvedenými veličinami (Tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria cerebri media* a expresí hsp v placentě

Hsp	Spearmanův korelační koeficient	
	ρ	P
Hsp27	-0,240	0,063
Hsp60	-0,101	0,435
Hsp70	0,085	0,508
Hsp90	-0,187	0,147
HspBP1	-0,001	0,992
HspBP1/Hsp70	-0,061	0,639

Nakonec jsem opět pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a Spearmanova korelačního koeficientu zkoumala vztah mezi cerebroplacentárním poměrem a expresí proteinů tepelného šoku v placentární tkáni. Do analýzy jsem použila 61 patologických vzorků (PE+/-FGR, FGR), u kterých jsem znala jak hodnotu PI v *arteria cerebri media*, tak PI v *arteria umbilicalis*. Z těchto 61 vzorků mělo 43 normální hodnoty a zbylých 18 vzorků vykazovalo abnormalitu v hodnotě CPR. ANOVA neprokázala žádný statisticky signifikantní rozdíl v expresi hsp mezi skupinami pacientek s normální či abnormální hodnotou CPR: Hsp27 (F= 0,00131, df 1,59, p= 0,971; 95% CI: -0,756627 až 0,729723), Hsp60 (F= 1,6316, df 1,59, p= 0,206; 95% CI: -0,639571 až 2,897375), Hsp70 (F= 2,4102, df 1,59, p= 0,126; 95% CI: -0,235898 až 1,868927), Hsp90 (F= 0,27685, df 1,59, p= 0,601; 95% CI: -0,229866 až 0,393871), HspBP1 (F= 0,15485, df 1,59, p= 0,695; 95% CI: -11,6460 až 7,818203), HspBP1/Hsp70 (F= 0,26167, df 1,59, p= 0,611; 95% CI: -12,2467 až 7,259967). Ani Spearmanův korelační koeficient neprokázal statisticky významnou korelaci mezi hodnotami CPR a expresí hsp v placentární tkáni (Tabulka č. 9). To znamená, že průtoky v *arteria cerebri media*, *arteria umbilicalis* a CPR nemají vliv na hsp expresi v placentě, nicméně byla zjištěna slabá negativní korelace u HspBP1 a PI v *arteria umbilicalis*, se stoupající hodnotou PI v *arteria umbilicalis* klesá exprese HspBP1.

Tabulka č. 9: Vztah mezi hodnotami CPR a expresí hsp v placentě

Hsp	Spearmanův korelační koeficient	
	ρ	p
Hsp27	-0,111	0,391
Hsp60	-0,072	0,576
Hsp70	0,078	0,544
Hsp90	-0,211	0,103
HspBP1	0,077	0,560
HspBP1/Hsp70	0,002	0,988

9.2. Výsledky exprese hsp v plné periferní krvi matky

9.2.1. Exprese hsp v jednotlivých skupinách těhotenských komplikací

Nejprve jsem pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu provedla skupinovou analýzu. Všechny vzorky patologických gravidit jsem rozdělila do třech skupin. První skupina obsahovala vzorky s čistou preeklamsií nebo preeklamsií asociovanou s fetální růstovou retardací (skupina PE+/-FGR), přičemž zde bylo zahrnuto 56 vzorků. Druhá skupina zahrnovala vzorky s hypertenzí, a to jak gestační, tak esenciální hypertenzí. Do této skupiny spadalo 19 vzorků. Poslední skupina obsahovala 22 vzorků s fetální růstovou retardací (FGR). Každou skupinu vzorků jsem porovnávala se skupinou 32 fyziologických (FG) gravidit. U každého vzorku jsem analyzovala stejně jako u placentární tkáně 5 hsp systémů – Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1 a dále pak poměr HspBP1/Hsp70. Sledovala jsem zde, jak se liší exprese jednotlivých hsp u různých skupin patologických vzorků ve srovnání se vzorky fyziologickými. Po provedení analýzy rozptylu jsem dále provedla post-hoc analýzu pomocí Bonferonniho testu. Analýza Hsp27 neprokázala signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami těhotenských komplikací a fyziologickými graviditami ($F= 1,5123$, $df\ 3,125$, $p= 0,215$; PE+/-FGR: 95% CI: -0,0004 až 0,0002, $p= 1,0$; hypertenze: 95% CI: -0,0006 až 0,00014, $p= 0,539$; FGR: 95% CI: -0,0006 až 0,00014, $p= 0,568$). U **Hsp60** jsem získala statisticky signifikantní zvýšení exprese ve skupině PE+/-FGR ve srovnání s FG skupinou, ostatní těhotenské patologie byly ve srovnání s fyziologickou skupinou bez signifikantní změny ($F= 3,6351$, $df\ 3,120$, $p= 0,015$; PE+/-FGR: 95% CI: -0,030684 až 0,002780, $p= 0,010$; hypertenze: 95% CI:

-0,026801 až 0,009168, $p= 1,0$; FGR: 95% CI: -0,031378 až 0,003501, $p= 0,204$), **síla testu byla 78,57%** ($\alpha= 0,05$). U skupiny **Hsp70** došlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení exprese u všech 3 skupin v porovnání s fyziologickými vzorky ($F= 14,568$, df 3,125, $p< 0,001$; **PE+/-FGR**: 95% CI: -0,364653 až 0,144750, $p< 0,001$; **hypertenze**: 95% CI: -0,380729 až -0,093326, $p< 0,001$; **FGR**: 95% CI: -0,382315 až -0,107482, $p< 0,001$), **síla testu v této analýze byla 99,99%** ($\alpha= 0,05$). **Hsp90** vykazoval ve všech skupinách signifikantní snížení exprese oproti FG skupině ($F= 9,6514$, df 3,124, $p< 0,001$; **PE+/-FGR**: 95% CI: 0,038289 až 0,131083, $p< 0,001$; **hypertenze**: 95% CI: 0,035970 až 0,157247, $p< 0,001$; **FGR**: 95% CI: 0,013338 až 0,130936, $p= 0,008$), **síla testu byla 99,71%** ($\alpha= 0,05$). U HspBP1 se neprokázal žádný signifikantní rozdíl ve srovnání s fyziologickými graviditami ($F= 1,1631$, df 3,118, $p= 0,327$; **PE+/-FGR**: 95% CI: -0,106490 až 0,045703, $p= 1,0$; **hypertenze**: 95% CI: -0,163399 až 0,032057, $p= 0,443$; **FGR**: 95% CI: -0,136699 až 0,055667, $p= 1,0$). Poměr **HspBP1/Hsp70** poukázal na signifikantní pokles ve skupině PE+/-FGR, ostatní skupiny nezaznamenaly žádnou změnu oproti fyziologické skupině ($F= 2,6028$, df 3,118, $p= 0,055$; **PE+/-FGR**: 95% CI: 0,02445 až 1,954520, $p= 0,041$; **hypertenze**: 95% CI: -0,44198 až 2,036742, $p= 0,521$; **FGR**: 95% CI: -0,52155 až 1,917980, $p= 0,763$), **síla testu byla 62,62%** ($\alpha= 0,05$). Výsledky jsem uvedla také do tabulky č. 10, kde tučně označené hodnoty značí signifikantní změnu exprese hsp, šipka pak značí zvýšení nebo snížení exprese u dané těhotenské komplikace. Výsledky jsou také zanesené do grafu č. 5. Jednotlivé grafy (A-F) značí konkrétní hsp systémy, přičemž vždy první box značí fyziologická těhotenství, druhý preeklampsie +/- fetální růstové retardace, třetí fetální růstové retardace a poslední hypertenze.

Tabulka č. 10: Skupinová analýza vzorků plné periferní krve matky (ANOVA)

Hsp27		F= 1,5123	df (3,125)	p= 0,215
		síla testu (95% CI): 39,15%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	$p= 1,0$	-0,0004 až 0,0002	
	FG x hypertenze	$p= 0,539$	-0,0006 až 0,00014	
	FG x FGR	$p= 0,568$	-0,0006 až 0,00014	

Hsp60		F= 3,6351	df (3,120)	p= 0,015
		síla testu (95% CI): 78,57%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
↑	FG x PE+/- FGR	p= 0,010	-0,030684 až 0,002780	
	FG x hypertenze	p= 1,0	-0,026801 až 0,009168	
	FG x FGR	p= 0,204	-0,031378 až 0,003501	
Hsp70		F= 14,568	df (3,125)	p< 0,001
		síla testu (95% CI): 99,99%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
↑	FG x PE+/- FGR	p< 0,001	-0,364653 až 0,144750	
↑	FG x hypertenze	p< 0,001	-0,380729 až -0,093326	
↑	FG x FGR	p< 0,001	-0,382315 až -0,107482	
Hsp90		F= 9,6514	df (3,124)	p< 0,001
		síla testu (95% CI): 99,71%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
↓	FG x PE+/- FGR	p< 0,001	0,038289 až 0,131083	
↓	FG x hypertenze	p< 0,001	0,035970 až 0,157247	
↓	FG x FGR	p= 0,008	0,013338 až 0,130936	
HspBP1		F= 1,1631	df (3,118)	p= 0,327
		síla testu (95% CI): 30,62%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
	FG x PE+/- FGR	p= 1,0	-0,106490 až 0,045703	
	FG x hypertenze	p= 0,443	-0,163399 až 0,032057	
	FG x FGR	p= 1,0	-0,136699 až 0,055667	
HspBP1/Hsp70		F= 2,6028	df (3,118)	p= 0,055
		síla testu (95% CI): 62,62%		
post-hoc analýza		Bonferonniho test	CI	
↓	FG x PE+/- FGR	p= 0,041	0,02445 až 1,954520	
	FG x hypertenze	p= 0,521	-0,44198 až 2,036742	
	FG x FGR	p= 0,763	-0,52155 až 1,917980	

9.2.2. Vztah závažnosti preeklampsie a exprese hsp v periferní krvi matky

Dále jsem se zaměřila na skupinu preeklamsií a preeklamsií asociovaných s fetální růstovou retardací. Zde jsem sledovala vztah mezi závažností patologie a expresí hsp v periferní krvi matky jednak podle klinických symptomů (zda se jedná o preeklamsii mírnou nebo závažnou), a dále pak podle týdne porodu (před a po 34. týdnu těhotenství). Dohromady jsem měla skupinu 56 vzorků s preeklamsií. U 19 z nich se jednalo o mírnou preeklamsii a 37 z nich vykazovalo preeklamsii závažnou. Co se týče rozdělení podle týdne porodu, tak 32 žen rodilo po 34. týdnu těhotenství a stav u 24 žen vyžadoval ukončení těhotenství před 34. týdnem gestace. Pro statistickou analýzu výsledků jsem použila dvoufaktorovou analýzu rozptylu, kde F1 značí rozdělení preeklampsie na mírnou a závažnou a F2 značí závažnost patologie podle týdne porodu (před/po 34. týdnu). S výjimkou Hsp90 jsem u žádného dalšího hsp systému nezaznamenala signifikantní rozdíl v expresi proteinů tepelného šoku ve vztahu k závažnosti preeklampsie podle klinických příznaků a týdne porodu. Výsledky u jednotlivých systémů: Hsp27 (F= 0,5648, df 1,52, p= 0,456; F1= 0,0074, df 1,52, p= 0,932; F2= 0,8548, df 1,52, p= 0,359), Hsp60 (F= 0,0102, df 1,48, p= 0,920; F1= 0,01099, df 1,48, p= 0,917; F2= 0,16827, df 1,48, p= 0,683), Hsp70 (F= 0,06847, df 1,52, p= 0,795; F1= 0,14974, df 1,52, p= 0,700; F2= 0,00429, df 1,52, p= 0,948), HspBP1 (F= 0,079, df 1,47, p= 0,779; F1= 0,14204, df 1,47, p= 0,708; F2= 0,40568, df 1,47, p= 0,527), HspBP1/Hsp70 (F= 0,02151, df 1,47, p= 0,884; F1= 0,08136, df 1,47, p= 0,777; F2= 0,00235, df 1,47, p= 0,962). Systém Hsp90 vykazoval statisticky signifikantní interakci mezi dvěma sledovanými faktory (F= 5,2436, df 1,52, **p= 0,026**). Nicméně ani rozdělení preeklampsie na mírnou a závažnou (F1= 0,82122, df 1,52, p= 0,369) ani závažnost patologie podle týdne porodu (F2= 0,06928, df 1,52, p= 0,793) nevykazovaly žádný statisticky signifikantní efekt.

9.2.3. Exprese hsp v plné periferní krvi u PE+/-FGR ve vztahu k výskytu předchozí hypertenze

Dále jsem se zaměřila opět na skupinu PE+/-FGR, kde jsem tentokrát sledovala vliv předchozí hypertenze na expresi hsp v periferní krvi matky. Pacientky jsem rozdělila do dvou skupin podle toho, zda preeklamsie nasedala na předchozí hypertenzi nebo se vyskytla u dříve normotenzní ženy. Z 56 žen s čistou preeklamsií nebo v kombinaci s fetální růstovou retardací, bylo 43 žen bez předchozí hypertenze a u 13 žen se jednalo

preeklampsii nasedající na předchozí hypertenzi. Analýzu jsem prováděla pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu. Výsledky exprese Hsp27 ($F= 0,36739$, $df 1,54$, $p= 0,547$; 95% CI: $-0,000285$ až $0,000153$), Hsp60 ($F= 0,25974$, $df 1,50$, $p= 0,613$; 95% CI: $-0,025651$ až $0,015268$), Hsp90 ($F= 0,77411$, $df 1,54$, $p= 0,383$; 95% CI: $-0,0602$ až $0,023478$), HspBP1 ($F= 0,02682$, $df 1,49$, $p= 0,871$; 95% CI: $-0,086542$ až $0,101898$) a HspBP1/Hsp70 ($F= 1,0894$, $df 1,49$, $p= 0,302$; 95% CI: $-0,421643$ až $0,133377$) neukázaly žádný signifikantní rozdíl mezi ženami, které byly hypertenzní ještě před vznikem preeklampsie a ženami s normálním tlakem před rozvojem klinických příznaků onemocnění. Nicméně u těhotenství s náhlým vznikem preeklampsie v těhotenství byla prokázána vyšší hladina exprese Hsp70 ($F= 3,8329$, $df 1,54$, $p= 0,055$; 95% CI: $-0,002849$ až $0,239735$) ve srovnání s těhotenstvím s preeklampsií nasedající na předchozí hypertenzi, nicméně síla testu byla pouze 48,53% ($\alpha= 0,05$).

9.2.4. Expresse hsp v plné periferní krvi matky a závažnost růstové retardace plodu

Další skupinou, kterou jsem podrobněji zkoumala, byla skupina těhotných žen s prokázanou fetální růstovou retardací. V této kategorii jsem rozdělila pacientky do skupin podle toho, zda se u nich vyskytoval oligohydramnion, popřípadě anhydramnion a nebo měly normální množství plodové vody. Dále jsem pak pacientky rozdělila podle týdne ukončení těhotenství (před 34. týdnem a po 34. týdnu). Celkem jsem měla k dispozici 22 vzorků, přičemž 8 vzorků pocházelo od žen, u kterých se vyskytoval oligohydramnion anebo anhydramnion a 14 vzorků bylo od žen s normálním množstvím plodové vody. Co se týče týdne porodu, tak u 8 žen z této kategorie bylo těhotenství ukončeno před 34. týdnem a 14 žen rodilo po 34. týdnu gestace. K analýze výsledků jsem použila dvoufaktorovou analýzu rozptylu, kde F1 sleduje závažnost patologie podle množství plodové vody (přítomnosti a absence oligohydramnionu, popřípadě anhydramnionu). F2 sleduje závažnost patologie podle týdne porodu (před/po 34. týdnu). Ve skupině těhotenství s FGR nebyl nalezen vztah mezi expresí hsp v periferní krvi matky a závažností této patologie (množství plodové vody, porod před a po 34. týdnu): Hsp27 ($F= 0,16307$, $df 1,18$, $p= 0,691$; $F1= 0,33915$, $df 1,18$, $p= 0,568$; $F2= 0,00521$, $df 1,18$, $p= 0,943$), Hsp70 ($F= 0,92996$, $df 1,18$, $p= 0,348$; $F1= 0,43247$, $df 1,18$, $p= 0,519$; $F2= 0,53715$, $df 1,18$, $p= 0,473$), Hsp90 ($F= 0,45085$, $df 1,17$, $p= 0,511$; $F1= 1,7598$, $df 1,17$, $p= 0,202$; $F2= 0,43903$,

df 1,17, p= 0,517), HspBP1 (F= 2,3676, df 1,16, p= 0,143; F1= 1,3169, df 1,16, p= 0,268; F2= 1,2060, df 1,16, p= 0,288), HspBP1/Hsp70 (F= 1,0681, df 1,16, p= 0,317; F1= 0,04948, df 1,16, p= 0,827; F2= 0,0018, df 1,16, p= 0,967). Výjimku tvořil systém **Hsp60** (F= 0,09212, df 1,17, p= 0,765; F1= 7,7386, df 1,17, **p= 0,013**; F2= 0,38509, df 1,17, p= 0,543), kde došlo ke zvýšení exprese ve skupině FGR s oligohydramnionem/anhydramnionem ve srovnání se skupinou FGR s normálním množstvím plodové vody, **síla testu F1 byla 74,6%** ($\alpha= 0,05$). Graf č. 6 ukazuje zvýšenou expresi Hsp60 u žen s výskytem oligohydramnionu/anhydramnionu ve vztahu k těm, které měly normální množství plodové vody. Z grafu je dále patrné, že týden porodu nemá vliv na expresi Hsp60.

9.2.5. Vliv Dopplerovských ultrazvukových parametrů na expresi hsp v plné periferní krvi matky

Ve své práci jsem dále sledovala vztah mezi expresí proteinů tepelného šoku v periferní krvi matky a indexem pulsatility v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media*, a dále pak vztah mezi expresí hsp a cerebriplacentárním poměrem. Nejprve jsem pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu hledala vztah mezi expresí konkrétních hsp systémů v periferní krvi matky a patologickými nebo naopak fyziologickými hodnotami indexů pulsatility. Následně jsem využila Spearmanova korelačního koeficientu, pomocí kterého jsem sledovala expresi hsp ve vztahu ke konkrétním hodnotám PI v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* a CPR. Vzhledem k tomu, že ne u všech analyzovaných pacientek jsem měla k dispozici klinická data ultrazvukových parametrů, tak jsou počty vzorků v této analýze nižší, než je celkový počet vzorků v dané skupině.

Nejprve jsem se zaměřila na hodnocení vztahu mezi indexem pulsatility v *arteria umbilicalis* a expresí jednotlivých hsp v periferní krvi matky. K dispozici jsem měla 43 vzorků s preeklampsí +/- FGR, přičemž u 31 z nich byl naměřen normální průtok a u 12 z nich byl zjištěn abnormální průtok v *arteria umbilicalis*. Dalších 21 vzorků pocházelo od pacientek s fetální růstovou retardací. 6 z nich mělo průtok krve v *arteria umbilicalis* v normě a u zbylých 15 se jednalo o abnormální průtok. Výsledky jednofaktorové analýzy rozptylu neukázaly žádnou statisticky signifikantní závislost ani u jednoho hsp systému: Hsp27 (F= 0,73459, df 1,62, p= 0,395; 95% CI: -0,000431 až 0,000172), Hsp60 (F= 0,00435, df 1,58, p= 0,948; 95% CI: -0,015469 až 0,014481), Hsp70 (F= 0,63199, df 1,62,

$p= 0,430$; 95% CI: $-0,146882$ až $0,063296$), Hsp90 ($F= 0,00092$, df 1,61, $p= 0,976$; 95% CI: $-0,0340$ až $0,032982$), HspBP1 ($F= 0,004$, df 1,56, $p= 0,950$; 95% CI: $-0,077874$ až $0,073105$), HspBP1/Hsp70 ($F= 0,28526$, df 1,56, $p= 0,595$; 95% CI: $-0,528987$ až $0,306288$). Ani Spearmanův korelační koeficient neprokázal korelaci mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a expresí proteinů tepelného šoku v periferní krvi matky. Výsledky jsem pro přehlednost uvedla do tabulky (Tabulka č. 11).

Tabulka č. 11: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a expresí hsp v periferní krvi matky

Hsp	Spearmanův korelační koeficient	
	ρ	p
Hsp27	0,037	0,768
Hsp60	0,078	0,547
Hsp70	0,116	0,358
Hsp90	-0,140	0,269
HspBP1	-0,019	0,884
HspBP1/Hsp70	-0,072	0,589

Následně jsem sledovala vztah mezi PI v *arteria cerebri media* a expresí hsp v periferní krvi matky. Do analýzy jsem zahrnula 25 vzorků s preeklampsií, popřípadě preeklampsií asociovanou s fetální růstovou retardací. U 17 žen z této skupiny se vyskytovaly normální hodnoty PI a u zbylých 8 vzorků byl naměřen abnormální průtok. Dále jsem do analýzy zahrnula 20 vzorků od žen s fetální růstovou retardací, přičemž 11 pacientek mělo hodnoty PI v *arteria cerebri media* v normě u 9 pacientek byl naměřen abnormální průtok. Jednofaktorová ANOVA opět neprokázala žádnou statisticky signifikantní závislost mezi srovnáním s normálními nebo abnormálními hodnotami PI v *arteria cerebri media*. Hsp27 ($F= 0,00287$, df 1,43, $p= 0,958$; 95% CI: $-0,000396$ až $0,000418$), Hsp60 ($F= 1,3466$, df 1,41, $p= 0,253$; 95% CI: $-0,019925$ až $0,005383$), Hsp70 ($F= 0,05089$, df 1,43, $p= 0,823$; 95% CI: $-0,146888$ až $0,117333$), Hsp90 ($F= 0,00000$, df 1,42, $p= 1,0$; 95% CI: $-0,037823$ až $0,037886$), HspBP1 ($F= 2,3259$, df 1,39, $p= 0,135$; 95% CI: $-0,1459$ až $0,020464$), HspBP1/Hsp70 ($F= 0,00426$, df 1,39, $p= 0,948$; 95% CI: $-0,592651$ až $0,555604$). Nicméně Spearmanův korelační koeficient poukázal na slabou

negativní korelaci mezi expresí proteinů tepelného šoku a hodnotou indexu pulsatility v *arteria cerebri media* u systémů Hsp27, HspBP1 a u poměru HspBP1/Hsp70. Výsledky jsem opět pro přehlednost uvedla do tabulky (Tabulka č. 12). Tučně jsou vyznačeny hodnoty vykazující slabou negativní korelaci. Statisticky signifikantní výsledky jsem uvedla do grafů. Graf č. 7 ukazuje slabou negativní korelaci mezi PI v *arteria cerebri media* a expresí Hsp27. Vliv indexu pulsatility v *arteria cerebri media* na expresi HspBP1 ukazuje graf č. 8. Graf č. 9 pak poukazuje na slabou negativní korelaci mezi PI v *arteria cerebri media* a poměrem HspBP1/Hsp70.

Tabulka č. 12: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria cerebri media* a expresí hsp v periferní krvi matky

Hsp	Spearmanův korelační koeficient		korelace
	ρ	p	
Hsp27	-0,383	0,011	slabá negativní korelace
Hsp60	-0,146	0,343	
Hsp70	-0,077	0,608	
Hsp90	-0,171	0,363	
HspBP1	-0,346	0,029	slabá negativní korelace
HspBP1/Hsp70	-0,322	0,042	slabá negativní korelace

Nakonec jsem sledovala vztah mezi expresí hsp v periferní krvi matky a cerebroplacentárním poměrem. Opět jsem pracovala s 25 vzorky s preeklampsií +/- fetální růstovou retardací, přičemž 18 z nich mělo hodnoty CPR v normě a u 7 se vyskytovaly hodnoty abnormální. Dále zde bylo 20 pacientek s fetální růstovou retardací, kde 11 žen mělo normální hodnoty CPR a 9 žen hodnoty abnormální. Pro vyhodnocení jsem použila jednofaktorovou analýzu rozptylu, která opět neprokázala statisticky signifikantní rozdíl mezi pacientkami s normálními či abnormálními hodnotami cerebroplacentárního poměru: Hsp27 (F= 3,2418, df 1,43, p= 0,079; 95% CI: -0,000043 až 0,000752), Hsp60 (F= 3,7447, df 1,41, p= 0,060; 95% CI: -0,000528 až 0,024729), Hsp70 (F= 0,03632, df 1,43, p= 0,850; 95% CI: -0,146477 až 0,121184), Hsp90 (F= 0,58377, df 1,42, p= 0,44911; 95% CI: -0,023997 až 0,053238), HspBP1 (F= 1,0409, df 1,39, p= 0,314; 95% CI: -0,043083 až 0,130778), HspBP1/Hsp70 (F= 2,1920, df 1,39, p= 0,147; 95% CI: -0,154037 až

0,995365). Ani Spearmanův korelační koeficient neprokázal žádnou statisticky signifikantní korelaci mezi hodnotami CPR a expresí hsp. Výsledky Spearmanova korelačního koeficientu jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Vztah mezi hodnotami CPR a expresí hsp v periferní krvi matky

Hsp	Spearmanův korelační koeficient	
	ρ	p
Hsp27	-0,284	0,060
Hsp60	-0,261	0,091
Hsp70	-0,105	0,485
Hsp90	-0,015	0,920
HspBP1	-0,088	0,577
HspBP1/Hsp70	-0,033	0,833

10. Diskuze

V posledních letech se mnoho vědeckých týmů zabývá hledáním nových markerů vhodných pro diagnostiku a predikci těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí, jako je preeklampsie a intrauterinní růstová retardace (Sekizawa *et al.*, 2010; Thilaganathan *et al.*, 2010; Poon *et al.*, 2009). Včasné určení diagnózy, ještě před manifestací klinických příznaků, by tak mohlo vést k odpovídající léčbě a především k prodloužení trvání gravidity. Většina těchto markerů je založena na neinvazivní prenatalní diagnostice, kde se hladiny jednotlivých markerů sledují z periferní krve matky, respektive z plazmy nebo séra.

Expresí proteinů tepelného šoku může být vyvolána ischemií, reaktivními formami kyslíku, zánětlivými cytokiny nebo hemodynamickým stresem. Přičemž během těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí dochází jak k placentární ischemii a oxidačnímu stresu, nadměrné systémové zánětlivé odpovědi matky, tak k hemodynamickému stresu, z tohoto důvodu předpokládáme zvýšení exprese hsp během manifestace těchto komplikací.

Ve své diplomové práci jsem testovala genovou expresi vybraných proteinů tepelného šoku – Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1 jakožto možných markerů pro diagnostiku těhotenských komplikací asociovaných s placentární insuficiencí. V současné době zatím neexistuje mnoho studií, které by se zabývaly studiem proteinů tepelného šoku právě v souvislosti s placentární nedostatečností. Z tohoto důvodu jsem si zvolila tuto málo probádanou problematiku pro svoji práci.

Pro zjištění vztahu exprese jednotlivých hsp systémů v souvislosti s hypoxií placenty jsem využila vzorky placentární tkáně. Po provedení skupinové analýzy, kde jsem porovnávala genovou expresi hsp u fyziologických vzorků placent se vzorky patologickými (preeklampsie, popřípadě preeklampsie v kombinaci fetální růstovou retardací, hypertenze a fetální růstová retardace), bylo zjištěno statisticky signifikantní zvýšení exprese Hsp27 a Hsp90 ve skupině PE+/-FGR ve srovnání s fyziologickými vzorky. Ostatní hsp systémy byly beze změny hsp exprese oproti fyziologické skupině a ve skupině hypertenzí a fetální růstové retardace také nebyly detekovány statisticky signifikantní změny oproti kontrolní skupině ani u jednoho hsp systému. Tento výsledek je v rozporu se studií z roku 2008, ve které bylo zjištěno signifikantní zvýšení exprese Hsp70 v placentě, a to jak na úrovni mRNA, tak na proteinové úrovni, u pacientek s preeklampií

a/nebo fetální růstovou retardací oproti kontrolní skupině. Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu a bivariační korelace (Liu *et al.*, 2008). Nicméně je třeba podotknout, že do této studie bylo zahrnuto pouze 28 patologických vzorků, přičemž 18 z nich mělo diagnostikovanou preeklampsii, 6 vzorků mělo preeklampsii a zároveň fetální růstovou retardaci a 4 vzorky vykazovaly fetální růstovou retardaci. Navíc všechny tyto vzorky byly hodnoceny v rámci jedné skupiny. Zvýšená hladina Hsp70 v placentě během preeklampsie byla také zjištěna ve studii, kterou provedli Padmini a Geetha v roce 2008. Ti sledovali expresi Hsp70 na proteinové úrovni u 20 preeklamptických pacientek ve srovnání s 20 normotenzními ženami (Padmini *et Geetha*, 2008). Obdobného výsledku dosáhla i studie z roku 2013, ve které byla také zjištěna signifikantně zvýšená proteinová exprese Hsp70 v placentě během preeklampsie (Abdulsid *et al.*, 2013). Na druhou stranu Hnat se svým týmem provedl imunohistochemickou analýzu exprese Hsp70, jakožto markeru oxidačního stresu na vzorcích placent normotenzních žen, žen s preeklampsií a žen s intrauterinní růstovou retardací. Avšak výsledky neprokázaly signifikantní rozdíl mezi fyziologickými těhotenstvími a těhotenstvími s preeklampsií, resp. IUGR (Hnat *et al.*, 2005). Nicméně i do této studie bylo zahrnuto malé množství vzorků – 5 vzorků v každé skupině.

Při sledování exprese hsp v placentě ve vztahu k závažnosti preeklampsie nebyla nalezena žádná asociace mezi expresí Hsp27, Hsp60, Hsp70 a Hsp90 a závažností preeklampsie, a to jak vzhledem ke klinickým příznakům onemocnění (mírná/závažná preeklampsie), tak vzhledem k nutnosti předčasného ukončení těhotenství. Nicméně v případě HspBP1 jsem zaznamenala vyšší expresi ve skupině žen s mírnou preeklampsií ve srovnání s preeklampsií závažnou.

Dále jsem porovnávala, jaký má vliv výskyt předchozí hypertenze u pacientek s preeklampsií na expresi jednotlivých hsp v placentární tkáni. Z výsledků vyplývá, že výskyt chronické hypertenze ve skupině PE+/-FGR nemá vliv na hsp expresi v placentární tkáni.

Ani závažnost fetální růstové retardace s ohledem na množství plodové vody a/nebo týden ukončení těhotenství (před vs. po 34. týdnu), neprokázala vliv na expresi proteinů tepelného šoku v placentě.

Dále jsem hodnotila expresi hsp ve vztahu k průtokům krve v *arteria cerebri media* a *arteria umbilicalis* a k cerebroplacentárnímu poměru (CPR). Průtoky cévami byly

hodnoceny pomocí Dopplerovského ultrazvukového vyšetření. Z výsledků je patrné, že průtoky v *arteria cerebri media*, *arteria umbilicalis* a CPR nemají vliv na hsp expresi v placentě, nicméně jsem prokázala slabou negativní korelaci u systému HspBP1 a indexem pulsatility v *arteria umbilicalis*, kde s rostoucí expresí HspBP1 klesal index pulsatility v *arteria umbilicalis*. Slabou negativní korelaci jsem získala také mezi poměrem HspBP1/Hsp70 a PI v *arteria umbilicalis*.

HspBP1 inhibuje Hsp70 chaperonovou aktivitu změnou konformace ATP vazebné domény Hsp70, čímž ruší vazbu s ATP (Raynes *et* Guerriero, 1998), a tak Hsp70 nemůže uplatňovat svou antiapoptotickou funkci. Zvýšení genové exprese HspBP1 v placentě u skupiny žen s mírnou preeklampsií, ve srovnání s preeklampsií závažnou, je ve shodě se slabou negativní korelací nalezenou mezi tímto systémem a indexem pulsatility v *arteria umbilicalis*. Vzhledem k tomu, že se kritické hodnoty indexu pulsatility v *arteria umbilicalis* nachází nad 95. percentilem a v mém případě docházelo ke zvyšování exprese HspBP1 se snižujícími se hodnotami PI, tak mohu říci, že ke zvýšení exprese HspBP1 dochází při méně závažných stavech, jako je například mírná preeklampsie ve srovnání s preeklampsií závažnou.

V další části mé diplomové práce jsem se zaměřila na sledování exprese jednotlivých hsp v plné periferní krvi matky, kde jsem sledovala systémovou reakci mateřského organismu na změny v placentární tkáni. U systémů Hsp27 a HspBP1 jsem nezaznamenala žádnou signifikantně významnou změnu exprese u patologických vzorků v porovnání s fyziologickou skupinou. U Hsp60 došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese ve skupině PE+/-FGR v porovnání s průběhem fyziologického těhotenství. Dále jsem zaznamenala signifikantní zvýšení exprese Hsp70, a to ve všech skupinách (PE+/-FGR, hypertenze i FGR) v porovnání s normálním těhotenstvím. Většina prací je zaměřena pouze na studium proteinové exprese Hsp70. Jirecek se svým týmem pozoroval vyšší hladiny sérového Hsp70 u pacientek s časným nástupem závažné preeklampsie oproti zdravým těhotným ženám (Jirecek *et al.*, 2002). Fukushima také zaznamenal signifikantně vyšší hladiny sérového Hsp70 u preeklampsie (Fukushima *et al.*, 2005). Zvýšená genová exprese Hsp70 díky teplotně indukovanému stresu byla pozorována také v lymfocytech periferní krve u lidí s hypertenzí oproti normotenzní skupině (Kunes *et al.*, 1992). Nicméně tato studie zahrnovala pouze jedince s hypertenzí a ne těhotné ženy. Poslední testovaný systém na periferní krvi matky, kterým byl Hsp90, vykazoval ve všech studovaných

skupinách signifikantní snížení exprese oproti fyziologické skupině. Hsp90 je molekulární chaperon, který hraje roli při skládání, maturaci a stabilitě konkrétních klientních proteinů, jenž se podílejí například při kontrole buněčného cyklu a přenosu signálu. Vzhledem k tomu, že funguje jako negativní regulátor programované buněčné smrti, tak se jeho zvýšená exprese vyskytuje u různých nádorů (Biaoxueet *et al.*, 2012). Naopak snížená exprese Hsp90 byla pozorována u pacientek s preeklampsií ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve studii z roku 2006 byla sledována exprese Hsp90 β v lidských endotelových buňkách pupečnickové žíly, a to jak na genové, tak na proteinové úrovni. Expres mRNA Hsp90 β byla mírně, ale nesignifikantně snížena, zatímco proteinová exprese byla down-regulována statisticky významně. Studie dále ukázala, že inhibice Hsp90 pomocí geldanamycinu vedla ke zvýšené produkci superoxidu, což naznačuje, že snížená exprese Hsp90 může přispívat k oxidačnímu stresu endotelových buněk (Gu *et al.*, 2006). Poměr HspBP1/Hsp70 poukázal na signifikantní pokles ve skupině PE+/-FGR, což odpovídá zvýšené expresi Hsp70 v periferní krvi matky během preeklampsie.

Při hledání vztahu mezi expresí jednotlivých hsp systémů v periferní krvi matky a závažností preeklampsie nebyla nalezena žádná statisticky signifikantní závislost. Ani při sledování hsp exprese ve vztahu k předchozí hypertenzi ve skupině PE+/-FGR jsem nenašla žádný rozdíl oproti fyziologické skupině.

Při porovnávání exprese hsp ve vztahu k závažnosti fetální růstové retardace, která byla hodnocena na základě množství plodové vody a týdne ukončení těhotenství, jsem zjistila zvýšení exprese Hsp60 ve skupině vzorků s oligohydramnionem/anhydramnionem ve srovnání se vzorky s normálním množstvím plodové vody.

Při porovnání exprese hsp v plné periferní krvi matky s hodnotami získanými Dopplerovským ultrazvukovým vyšetřením jsem zjistila, že průtoky krve v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* a cerebroplacentární poměr nemají vliv na expresi proteinů tepelného šoku. Nicméně jsem objevila slabé negativní korelace mezi expresí a PI *arteria cerebri media* u Hsp27, HspBP1 a poměrem HspBP1/Hsp70.

Z výsledků naší studie je patrné, že mateřská systémová odpověď se projevuje zvýšenou expresí Hsp60 v krvi u žen s preeklampsií a preeklampsií asociovanou s fetální růstovou retardací, dále pak zvýšenou expresí Hsp70 v reakci na jakoukoliv těhotenskou komplikaci související s vysokým krevním tlakem nebo růstovou retardací plodu a sníženou expresí Hsp90 také v souvislosti s těhotenskými komplikacemi souvisejícími

s vysokým krevním tlakem nebo růstovou retardací plodu. Vzhledem k tomu, že v placentě došlo k signifikantnímu zvýšení exprese u Hsp27 a Hsp90 ve skupině PE+/-FGR a v plné krvi matky nebylo zaznamenáno žádné zvýšení exprese ani u jednoho z těchto dvou systémů, lze tyto dva markery použít pro další testování. V plazmách těhotných žen, budeme sledovat přítomnost placentární mRNA těchto hsp, která by mohla odrážet stav v placentě aktuální genovou hsp expresí, přičemž předpokládáme zvýšení hladiny cirkulujících mRNA pro oba systémy. V případě potvrzení této hypotézy by Hsp27 a Hsp90 mRNA mohly představovat nové markery pro neinvazivní sledování stavu placenty u těhotenských komplikací.

11. Závěr

Ve své práci jsem zjišťovala vztah mezi expresí proteinů tepelného šoku a vybranými těhotenskými komplikacemi. Z výsledků získaných na placentární tkáni vyplývá, že těhotenské komplikace související s placentární nedostatečností (konkrétně preeklampsie a preeklampsie asociovaná s fetální růstovou retardací) mají vliv na zvýšení exprese Hsp27 a Hsp90. Vztah mezi expresí jednotlivých hsp v placentě a závažností preeklampsie jsem nepotvrdila. Nicméně v případě HspBP1 jsem zaznamenala vyšší expresi ve skupině mírné preeklampsie oproti preeklampsii závažné. Stejně tak jsem nepotvrdila vztah mezi expresí jednotlivých hsp a výskytem předchozí hypertenze ve skupině PE+/-FGR. Na expresi hsp v placentě také nemá vliv závažnost růstové retardace plodu. Při sledování vztahu mezi expresí hsp a Dopplerovskými ultrazvukovými parametry jsem zaznamenala slabou negativní korelaci mezi HspBP1 a PI v *arteria umbilicalis* a dále také mezi poměrem HspBP1/Hsp70 a indexem pulsatility v *arteria umbilicalis*.

V plné periferní krvi matky jsem zaznamenala statisticky signifikantní zvýšení exprese Hsp60 ve skupině PE+/-FGR a Hsp70 ve všech sledovaných skupinách (PE+/-FGR, hypertenze, FGR), a dále pak snížení exprese Hsp90, opět u všech sledovaných skupin a snížení hodnot poměru HspBP1/Hsp70 ve skupině PE+/-FGR. Tyto změny v genové expresi se vyskytují jako projev mateřské systémové odpovědi na těhotenskou komplikaci související s vysokým krevním tlakem anebo růstovou retardací plodu. Obdobně jako u exprese hsp v placentě, tak ani v periferní krvi jsem nenalezla vztah mezi hsp expresí a závažností preeklampsie ani výskytem předchozí hypertenze ve skupině PE+/-FGR. Při sledování vlivu závažnosti fetální růstové retardace na expresi hsp v periferní krvi jsem objevila pouze zvýšenou expresi Hsp60 ve skupině FGR s oligohydramniionem ve srovnání se skupinou pacientek s růstovou retardací plodu a normálním množstvím plodové vody. Dopplerovské ultrazvukové parametry také nemají vliv na expresi hsp v krvi matky, nicméně jsem objevila slabou negativní korelaci mezi expresí Hsp27, HspBP1 a poměrem HspBP1/Hsp70 a indexem pulsatility v *arteria cerebri media*.

Testování markerů, které mají zvýšenou genovou expresi v placentě a zároveň nevykazují rozdílnou expresi v plné periferní krvi matky (Hsp27) a nebo vykazují sníženou expresi (Hsp90) během preeklampsie, bude předmětem dalšího studia na plazmách těhotných žen, kde předpokládáme zvýšení exprese obou systémů, jakožto odraz stavu hsp

exprese v placentární tkáni. V případě potvrzení této hypotézy by Hsp27 a Hsp90 mRNA mohly sloužit jako nové predikční markery preeklampsie.

12. Seznam použité literatury

Abdulsid, A., Hanretty, K., Lyall, F. (2013) Heat Shock Protein 70 Expression Is Spatially Distributed in Human Placenta and Selectively Upregulated during Labor and Preeclampsia. *PLOS ONE* 8 (1), e54540.

Akolekar, R., Syngelaki, A., Sarquis, R., Zvanca, M., Nicolaides, K. H. (2011) Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Prenatal diagnosis* 31 (1), 66-74.

Akolekar, R., Zaragoza, E., Poon, L. C., Pepes, S., Nicolaides, K. H. (2008) Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 32 (6), 732-739.

Alberry, M. S., Maddocks, D. G., Hadi, M. A., Metawi, H., Hunt, L. P., Abdel-Fattah, S. A., Avent, N. D., Soothill, P. W. (2009) Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200 (1), 98.e1-98.e6.

Arbogast, B. W., Leeper, S. C., Merrick, R. D., Olive, K. E., Taylor, R. N. (1994) Hypothesis: which plasma factors bring about disturbance of endothelial function in pre-eclampsia? *Lancet* 343 (8893), 340-341.

Arkwright, P. D., Rademacher, T. W., Dwek, R. A., Redman, C. W. G. (1993) Preeclampsia is associated with an increase in trophoblast glycogen content and glycogen synthase activity, similar to that found in hydatidiform moles. *The Journal of Clinical Investigation* 91 (6), 2744-2753.

Biaoxue, R., Xiling, J., Shuanying, Y., Wei, Z., Xiguang, C., Jinsui, W., Min, Z. (2012) Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31 (1), 70-84.

- Boreham, D. R., Mitchel, R. E. (1994) Regulation of heat and radiation stress responses in yeast by hsp-104. *Radiation Research* 137 (2), 190-195.
- Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J. F., Horwich, A. L. (1993) A polypeptide bound by the chaperonin groEL is localized within a central cavity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (9), 3978-3982.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E., Macario, A. J. (2008) Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology* 8 (19).
- Bukau, B., Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92 (3), 351-366.
- Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R., Welch, W. J. (1985) The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *The EMBO Journal* 4 (12), 3131-3135.
- de Kok, J. B., Wiegerinck, E. T., Giesendorf, B. A., Swinkels, D. W. (2002) Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Human Mutation* 19 (5), 554-559.
- Donati, Y. R., Slosman, D. O., Polla, B. S. (1990) Oxidative injury and the heat shock response. *Biochemical Pharmacology* 40 (12), 2571-2577.
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., Hartl, F. U. (2006) Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *The EMBO Journal* 25 (11), 2519-2528.
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., Buchner, J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal* 16 (2), 221-229.

Euser, A. G., Cipolla, M. J. (2009) Magnesium sulfate for the treatment of eclampsia a brief review. *Stroke* 40 (4), 1169-1175.

Eustace, B. K., Sakurai, T., Stewart, J. K., Yimlamai, D., Unger, Ch., Zehetmeier, C., Lain, B., Torella, C., Henning, S. W., Beste, G., Scroggins, B. T., Neckers, L., Ilag, L. L., Jay, D. G. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90a in cancer cell invasiveness. *Nature Cell Biology* 6 (6), 507-514.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., Hartl, F. U. (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111-117.

Fukushima, A., Kawahara, H., Isurugi, C., Syoji, T., Oyama, R., Sugiyama, T., Horiuchi, S. (2005) Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 31 (1), 72-77.

Gerard, G. F., Fox, D. K., Nathan, M., D'Alessio, J. M. (1997) Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Molecular Biotechnology* 8 (1), 61-77.

Gifford, R. W., August, P. A., Cunningham, G., Green, L. A., Lindheimer, M. D., McNellis, D. (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183 (1), S1-S22.

Gu, Y., Lewis, D. F., Zhang, Y., Groome, L. J., Wang, Y. (2006) Increased superoxide generation and decreased stress protein Hsp90 expression in human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) from pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 25 (3), 169-182.

- Harkness, U. F., Mari, G. (2004) Diagnosis and management of intrauterine growth restriction. *Clinics in Perinatology* 31 (4), 743-764.
- Hartl, F. U., Martin, J. (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 5 (1), 92-102.
- Hawle, P., Siepmann, M., Harst, A., Siderius, M., Reusch, H. P., Obermann, W. M. (2006) The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Molecular and Cellular Biology* 26 (22), 8385-8395.
- Hayward, C., Livingstone, J., Holloway, S., Liston, W. A., Brock, D. J. H. (1992) An exclusion map for pre-eclampsia: assuming autosomal recessive inheritance. *American Journal of Human Genetics* 50 (4), 749-757.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6 (10), 986-994.
- Heinonen, S., Taipale, P., Saarikoski, S. (2001) Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta* 22 (5), 399-404.
- Hnat, M. D., Meadows, J. W., Brockman, D. E., Pitzer, B., Lyall, F., Myatt, L. (2005) Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193 (3), 836-840.
- Cheetham, M. E. and Caplan, A. J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: Conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress and Chaperones* 3 (1), 28-36.
- Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E., Monteiro, A. (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86 (6), 627-637.

Chesley, L. C., Annitto, J. E., Cosgrove, R. A. (1968) The familial factor in toxemia of pregnancy. *The Journal of Obstetrics and Gynecology* 32 (3), 303-311.

Jirecek, S., Hohlagschwandtner, M., Tempfer, C., Knöfler, M., Husslein, P., Zeisler, H. (2002) Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: a pilot-study. *Wiener klinische Wochenschrift* 114 (15-16), 730-732.

Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D. A., Guerriero, V., Brodsky, J. L. (2002) HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Letters* 531 (2), 339-342.

Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., Hightower, L. E. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 14 (1), 105-111.

Khalil, A., Cowans, N. J., Spencer, K., Goichman, S., Meiri, H., Harrington, K. (2009) First trimester maternal serum placental protein 13 for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk. *Prenatal Diagnosis* 29 (8), 781-789.

Kilpatrick, D. C., Gibson, F., Livingston, J., Liston, W. A. (1990) Preeclampsia is associated with HLA DR4 sharing between mother and fetus. *Tissue Antigens* 35 (4), 178-181.

Knerr, I., Beinder, E., Rasher, W. (2002) Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: Evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 186 (2), 210-213.

Kunes, J., Poirier, M., Tremblay, J., Hamet, P. (1992) Expression of hsp70 gene in lymphocytes from normotensive and hypertensive humans. *Acta Physiologica Scandinavica* 146 (3), 307-311.

Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B., Hedgpeth, J. (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28 (2), 655-661.

Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., Anderson, C. W. (1992) Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (2), 794-803.

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., Hartl, F. U. (1992) Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *The EMBO Journal* 11 (13), 4757-4765.

Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I., Seo, J. S. (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry* 275 (33), 25665-25671.

Liu, Y., Li, N., You, L., Liu, X., Li, H., Wang, X. (2008) HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Molecular Medicine* 14 (9-10), 561-566.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), 402-408.

Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., Wainscoat, J. S. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350 (9076), 485-487.

Lorentzen, B., Endresen, M. J., Clausen, T., Henriksen, T. (1994) Fasting serum free fatty acids and triglycerides are increased before 20 weeks of gestation in women who later develop preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 13 (1), 103-109.

Maynard, S. E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (5), 649-658.

Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., Arrigo, A. P. (1996) Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (28), 16510-16514.

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yahara, I. (1994) The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 14 (2), 1459-1464.

Molvarec, A., Derzsy, Z., Kocsis, J., Bóze, T., Nagy, B., Balogh, K., Makó, V., Cervenak, L., Mézes, M., Karádi, I., Prohászka, Z., Rigó, J. (2009) Circulating anti-heatshock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 14 (5), 491-498.

Molvarec, A., Rigó, J., Nagy, B., Walentin, S., Szalay, J., Füst, G., Karádi, I., Prohászka, Z. (2007) Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* 74 (1), 163-169.

Morales, P., Corell, A., Martinez, L. J., Martin, V. J., Varela, P., Paz, A. E., Allende, L. M. Arnaiz, V. A. (1993) Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics* 38 (5), 323-331.

Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1), 263-273.

Muttukrishna, S., Fowler, P. A., George, L., Groome, N. P., Knight, P. G. (1996) Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (9), 3328-3334.

Muttukrishna, S., George, L., Fowler, P. A., Groome, N., Knight, P. G. 1995 Measurement of serum concentrations of inhibin-A (alpha-beta A dimer) during human pregnancy. *Clinical Endocrinology* 42 (4), 391-397.

Muttukrishna, S., North, R. A., Morris, J., Schellenberg, J. C., Taylor, R. S., Asselin, J., Ledger, W., Groome, N., Redman, C. W. G. (2000) Serum inhibin A and activin A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia. *Human Reproduction* 15 (7), 1640-1645.

Nicolaides, K. H., Bindra, R., Turan, O. M., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H., Tal, J., Cuckle, H. S. (2006) A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 27 (1), 13-17.

Nilson, E., Ros Salonen, H., Chantingius, S., Lichtenstein, P. (2004) The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG* 111 (3), 200-206.

Odegard, R. A., Vatten, L. J., Nilsen, S. T., Salvesen, K. A., Austgulen, R. (2000) Preeclampsia and fetal growth. *Obstetrics and Gynecology* 96 (6), 950-955.

Oh, H. J., Chen, X., Subjeck, J. R. (1997) Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (50), 31636-31640.

Padmini, E., Geetha, B. V. (2008) Placental Heat Shock Protein 70 Overexpression Confers Resistance Against Oxidative Stress in Preeclampsia. *Turkish Journal of Medical Sciences* 38 (1), 27-34.

Parra-Cordero, M., Lees, C., Missfelder-Lobos, H., Seed, P., Harris, C. (2007) Fetal arterial and venous Doppler pulsatility index and time averaged velocity ranges. *Prenatal Diagnosis* 27 (13), 1251-1257.

Peterson, R. D. A., Tuck-Muller, C. M., Spinnato, J. A., Peevy, K., Giattina, K., Hoff, C. (1994) Short communication: an HLA-haplotype associated with preeclampsia and intrauterine growth retardation. *American Journal of Reproductive Immunology* 31 (4), 177-179.

Poon, L. C. Y., Maiz, N., Valencia, C., Plasencia, W., Nicolaidis, K. H. (2009) First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 33 (1), 23-33.

Raynes, D. A., Guerriero, V. (1998) Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 273 (49), 32883-32888.

Resnik, R. (2002) Intrauterine growth restriction. *Obstetrics and Gynecology* 99 (3), 490-496.

Ritossa, F. (1962) New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18 (12), 571-573.

Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M. (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor

necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (27), 18947-18956.

Sacks, G., Sargent, I., Redman, C. (1999) An innate view of human pregnancy. *Immunology Today* 20 (3), 114-118.

Salha, O., Sharma, V., Data, T., Nugent, D., Rutherford, A. J., Tomlinson, A. J., Philips, S., Allgar, V., Walker, J. J. (1999) The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Human Reproduction* 14 (9), 2268-2273.

Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Farina, A., Shimizu, H., Nakamura, M., Wibowo, N., Rizzo, N., Okai, T. (2010) Prediction of pre-eclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15–20 weeks of gestation. *BJOG* 117 (5), 557-564.

Shah, M., Stanek, J., Handwerger, S. (1998) Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochemical Journal* 30 (7), 509-518.

Sheikh-Hamad, D., Garcia-Perez, A., Ferraris, J. D., Peters, E. M., Burg, M. B. (1994) Induction of gene expression by heat shock versus osmotic stress. *American Journal of Physiology* 267 (1), F28-F34.

Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., Garrido, C. (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology* 81 (1), 15-27.

Schroeder, B. M. (2002) Practice guidelines: ACOG practice bulletin on diagnosing and managing preeclampsia and eclampsia. *American Family Physician*, 66 (2), 330-331.

Smarason, A. K., Sargent, I. L., Starkey, P. M., Redman, C. W. G. (1993) The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic

women on the growth of endothelial cells in vivo. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 100 (10), 943-949.

Subbarao Sreedhar, A., Kalmár, É., Csermely, P., Shen, Y. F. (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters* 562 (1), 11-15.

Theriault, J. R., Mambula, S. S., Sawamura, T., Stevenson, M. A., Calderwood, S. K. (2005) Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Letters* 579 (9), 1951-1960.

Thilaganathan, B., Ralph, E., Papageorghiou, A. T., Melchiorre, K., Sheldon, J. (2009) Raised maternal serum cystatin C: an early pregnancy marker for preeclampsia. *Reproductive Sciences* 16 (8), 788-793.

Thilaganathan, B., Wormald, B., Zanardini, C., Sheldon, J., Ralph, E., Papageorghiou, A. T. (2010) Early-pregnancy multiple serum markers and second-trimester uterine artery Doppler in predicting preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 115 (6), 1233-1238.

Tissiéres, A., Mitchell, H. K., Tracey, U. M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84 (3), 389-398.

Trupin, L. S., Simon, L. P., Eskenazi, B. (1996) Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7 (3), 240-244.

Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14 (3), 303-308.

van der Ven, K., Ober, C. (1994) HLA-G polymorphisms in African Americans. *The Journal of Immunology* 153 (12), 5628-5633.

Voss, A. K., Thomas, T., Gruss, P. (2000) Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 127 (1), 1-11.

Ward, K., Hata, A., Jeunemaitre, X., Helin, C., Nelson, L., Namikawa, C., Farrington, P. F., Ogasawara, M., Suzumori, K., Tomoda, S. (1993) A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genetics* 4 (1), 59-61.

Wataba, K., Saito, T., Takeuchi, M., Nakayama, M., Suehara, N., Kudo, R. (2004) Changed expression of heat shock proteins in various pathological findings in placentas with intrauterine fetal growth restriction. *Medical Electron Microscopy* 37 (3), 170-176.

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T. R. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today* 14 (7), 353-356.

WHO (1988) World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 158 (1), 80-83.

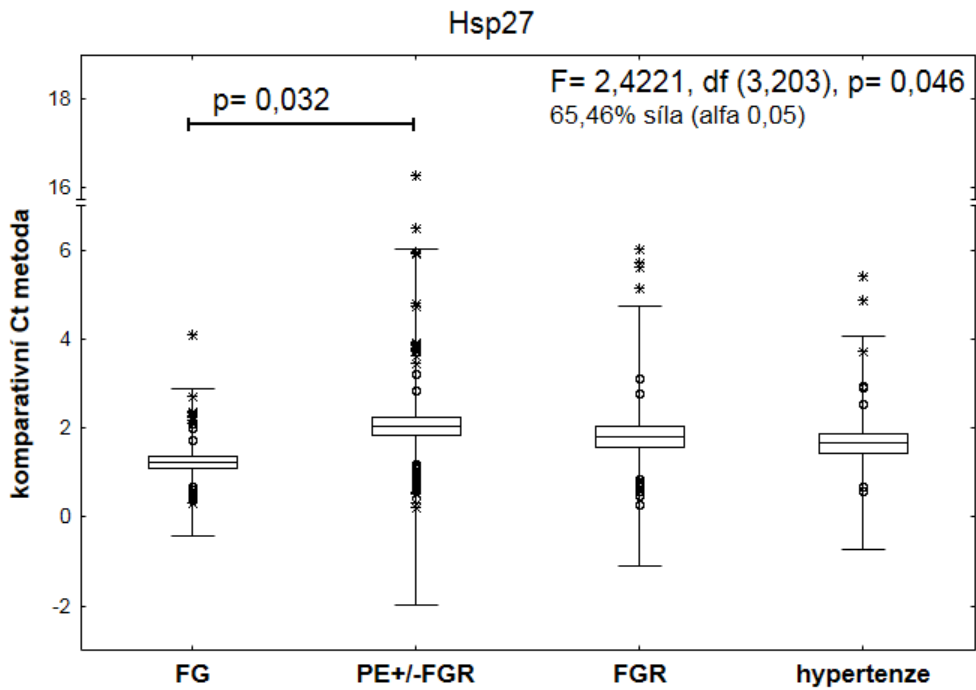
Wilton, A. N., Kaye, J. A., Guo, G., Brennecke, S. P., Cooper, D. W. (1995) Is angiotensinogen a good candidate gene for preeclampsia? *Hypertension in Pregnancy* 14 (2), 251-260.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22 (1), 130-138.

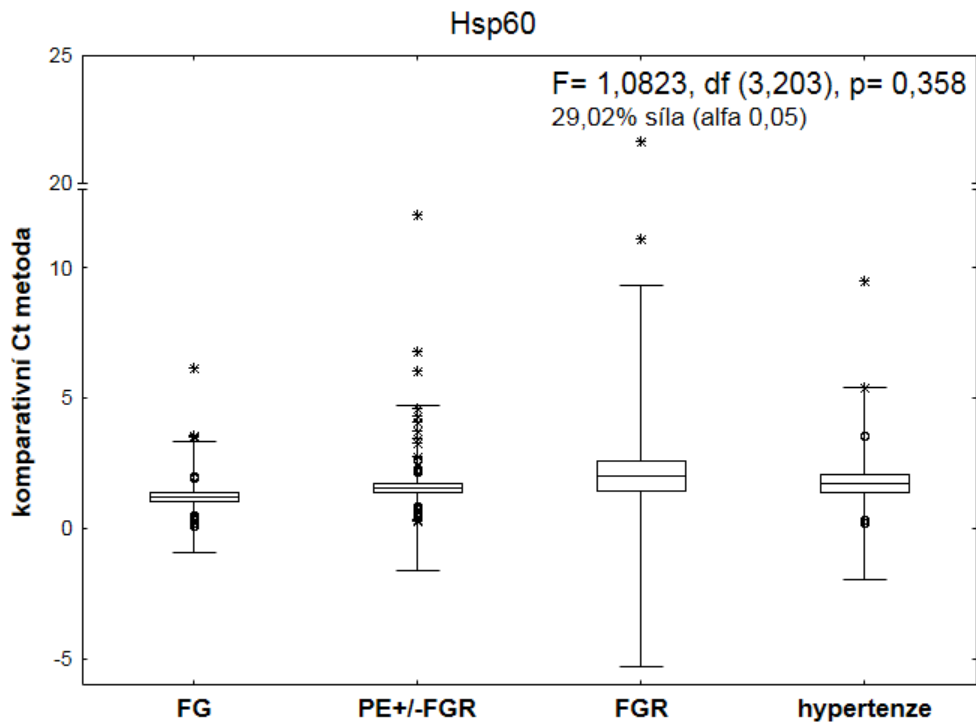
13. Přílohy

Graf č. 1: Expres hsp v placentě u fyziologických a patologických gravidit

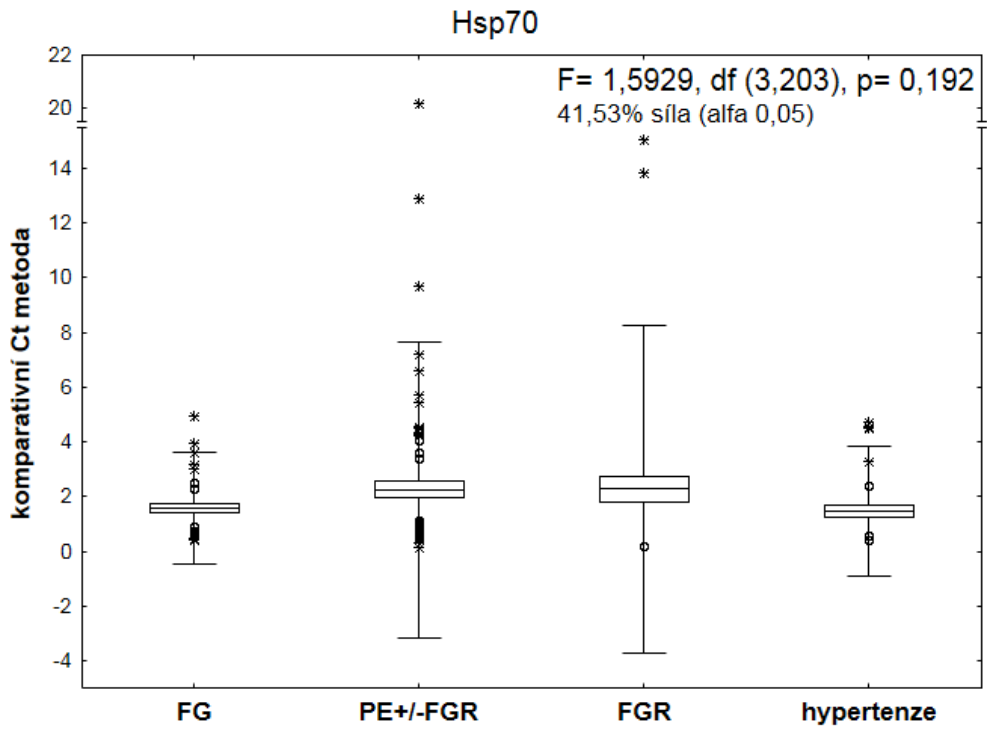
A)



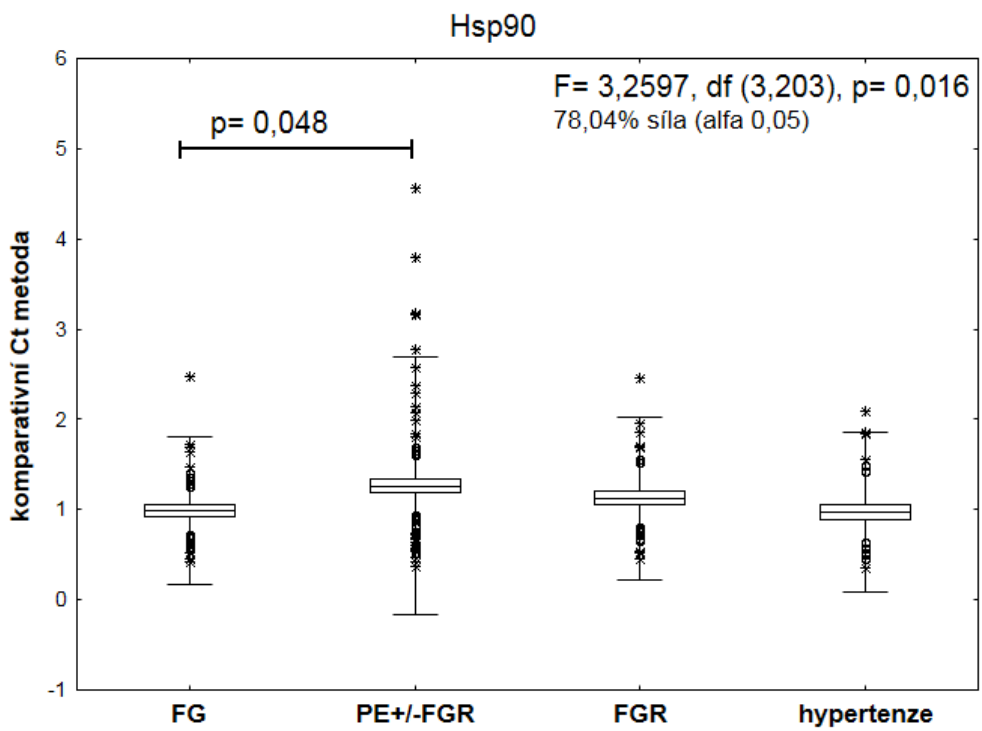
B)



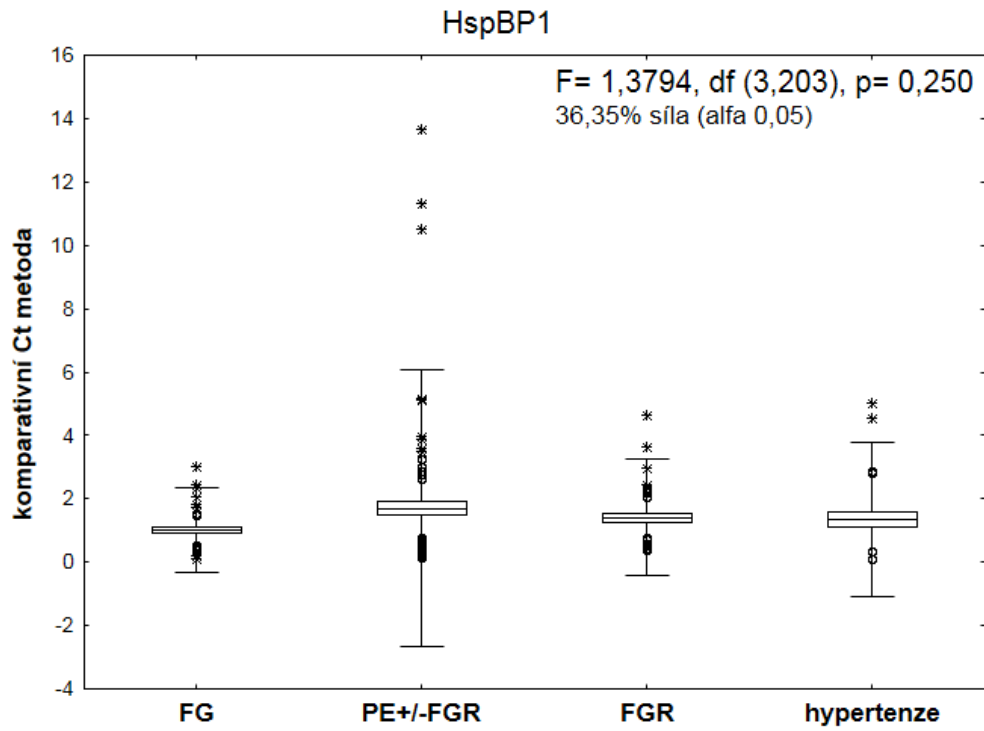
C)



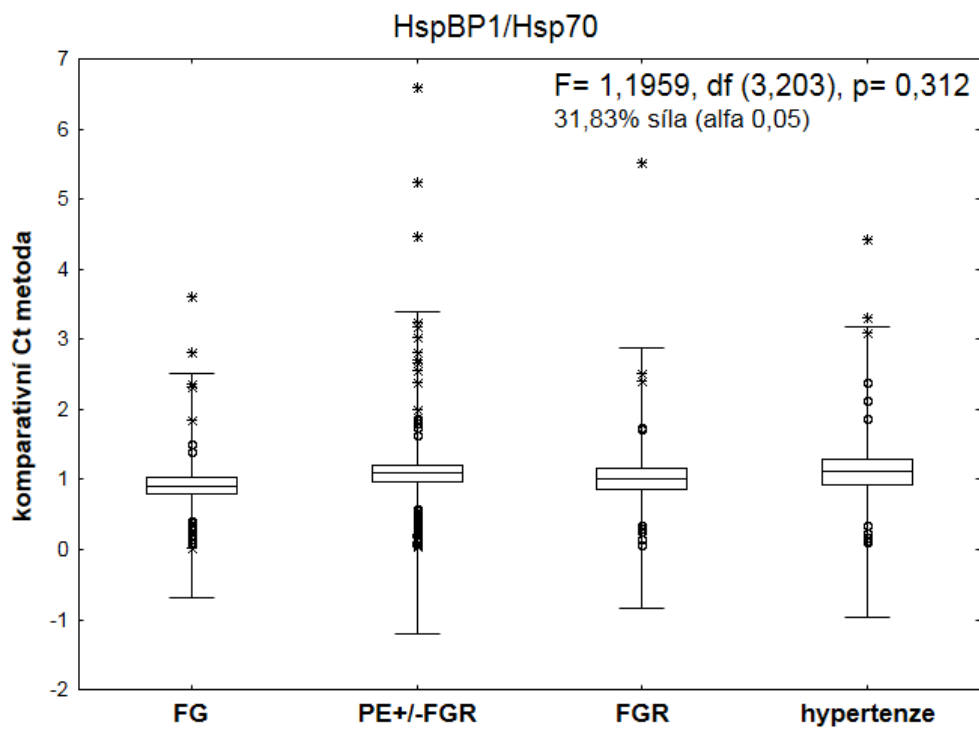
D)



E)

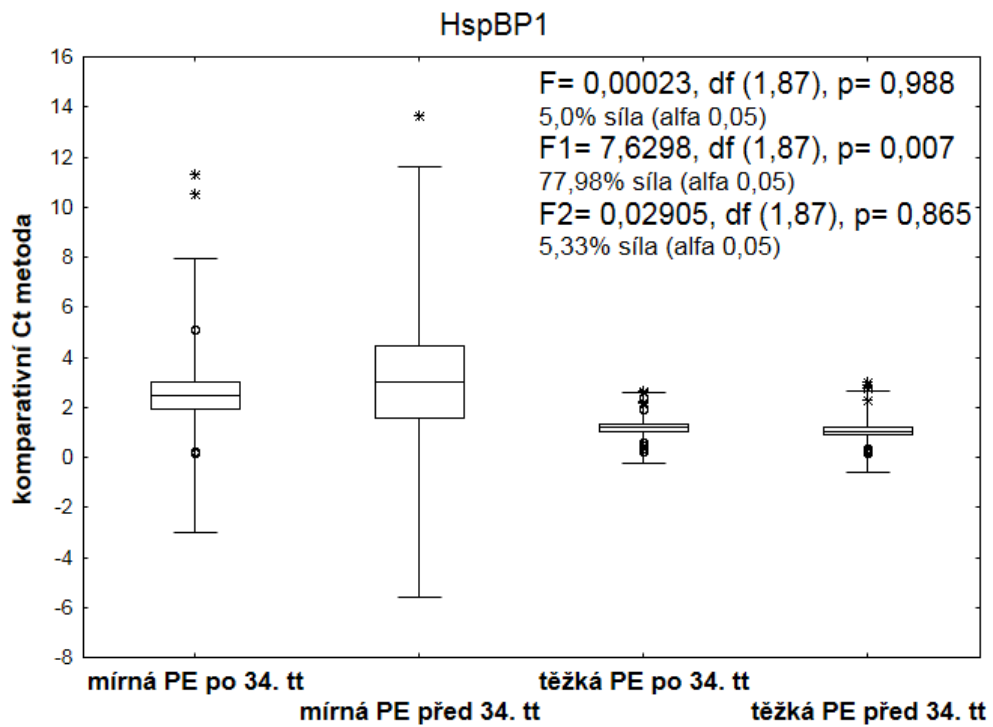


F)



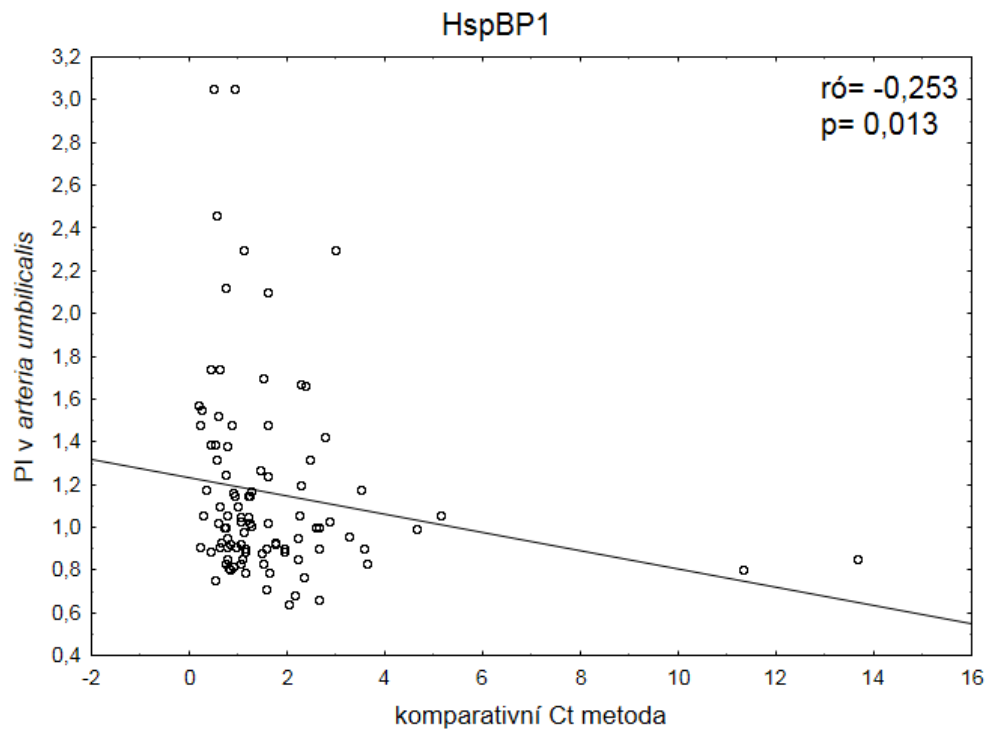
- Průměr
- Průměr +/- směrodatná chyba
- ┆ Průměr +/- 2 směrodatné odchylky
- Odlehlé
- * Extrémy

Graf č. 2: Vztah mezi expresí HspBP1 v placentární tkáni a závažností preeklampsie

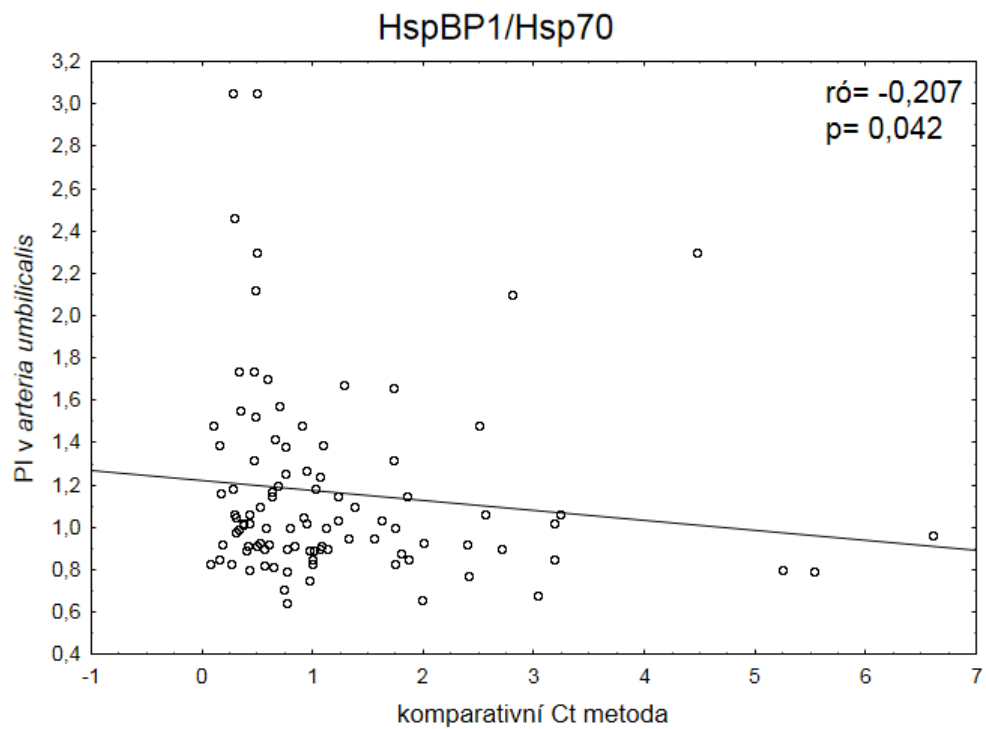


- Průměr
- Průměr +/- směrodatná chyba
- ┆ Průměr +/- 2 směrodatné odchylky
- Odlehlé
- * Extrémy

Graf č. 3: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a expresí HspBP1 v placentární tkáni

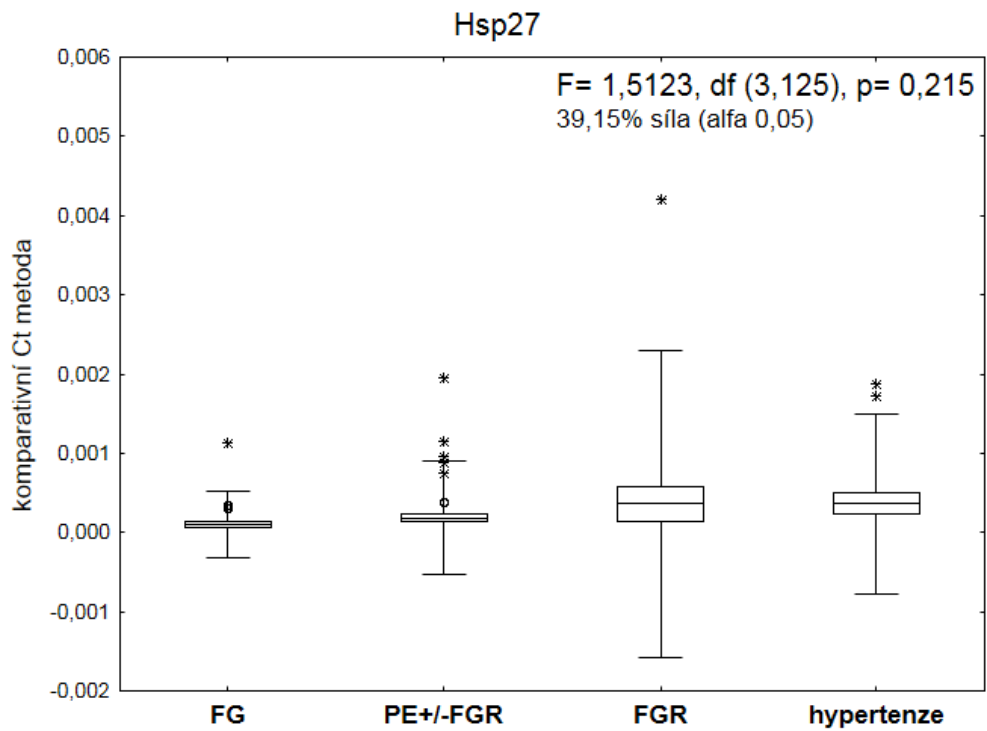


Graf č. 4: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria umbilicalis* a poměrem HspBP1/Hsp70

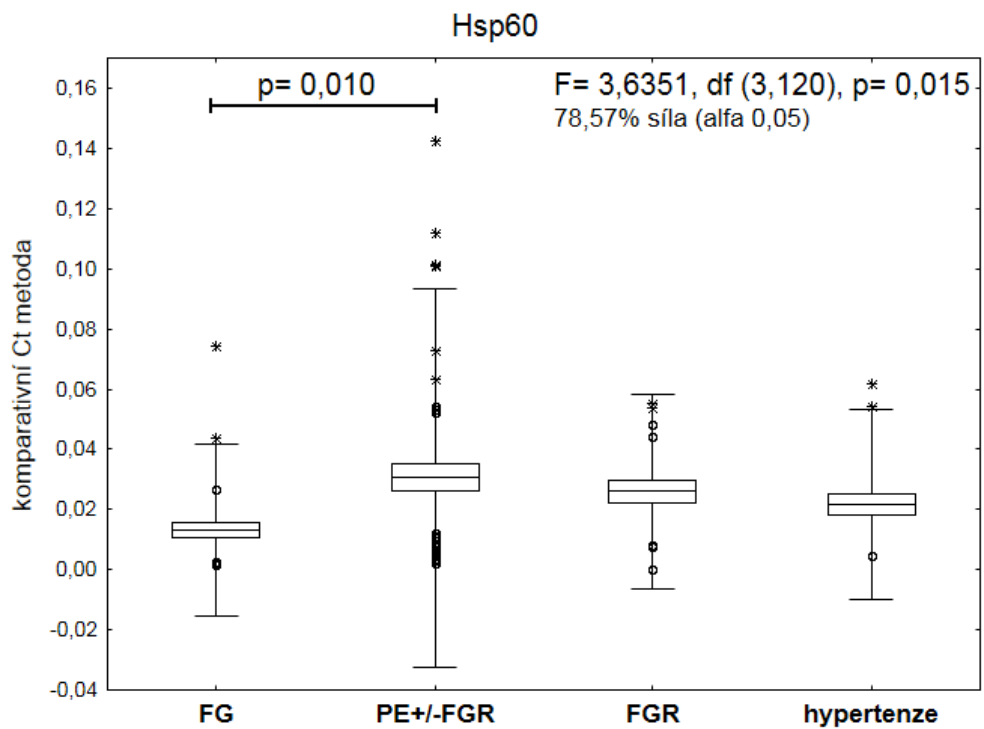


Graf č. 5: Expres hsp v plné periferní krvi matky u fyziologických a patologických gravidit

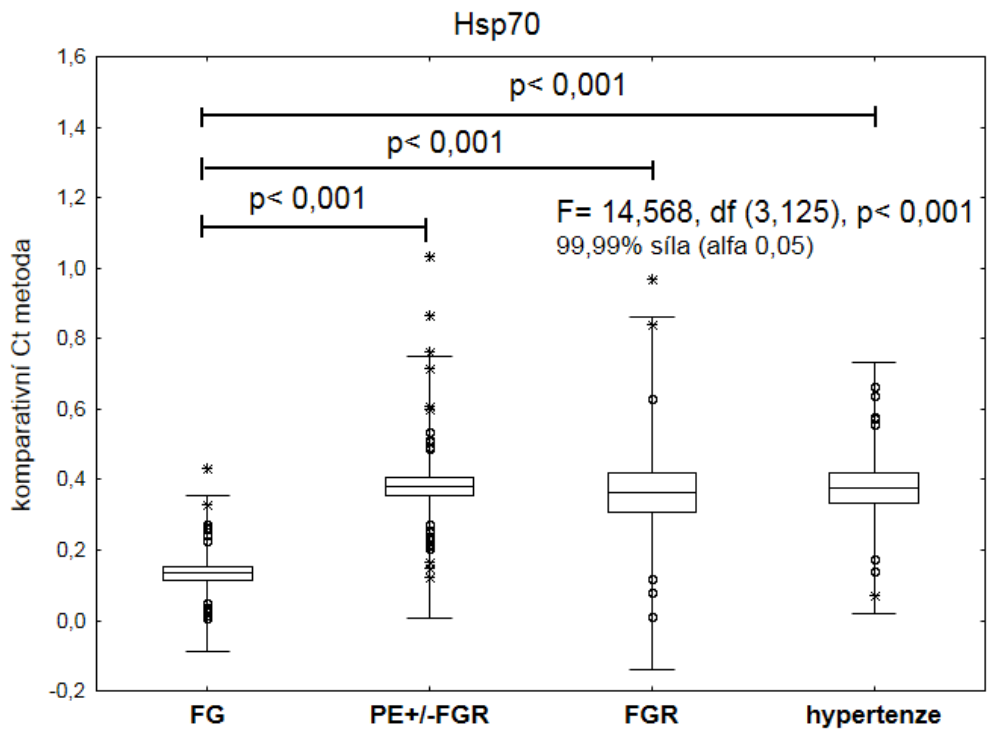
A)



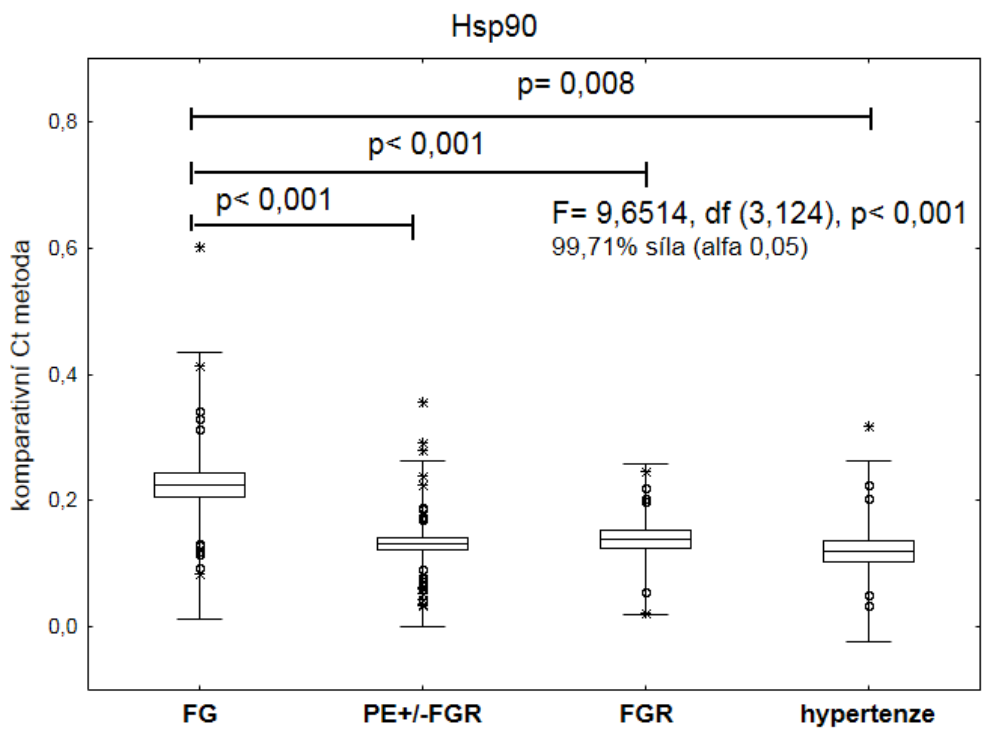
B)



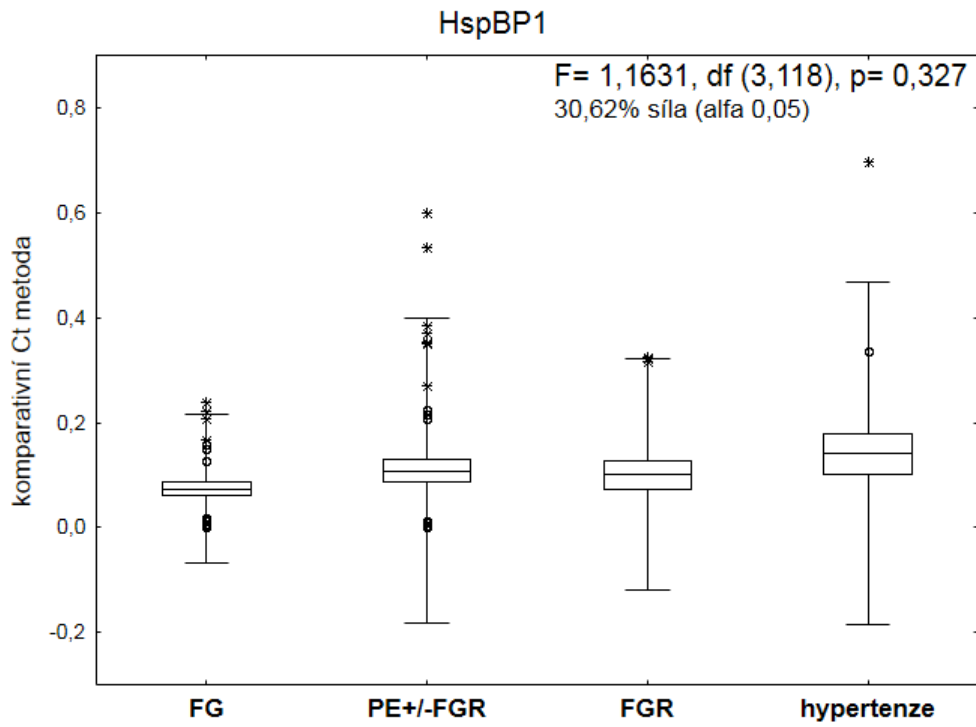
C)



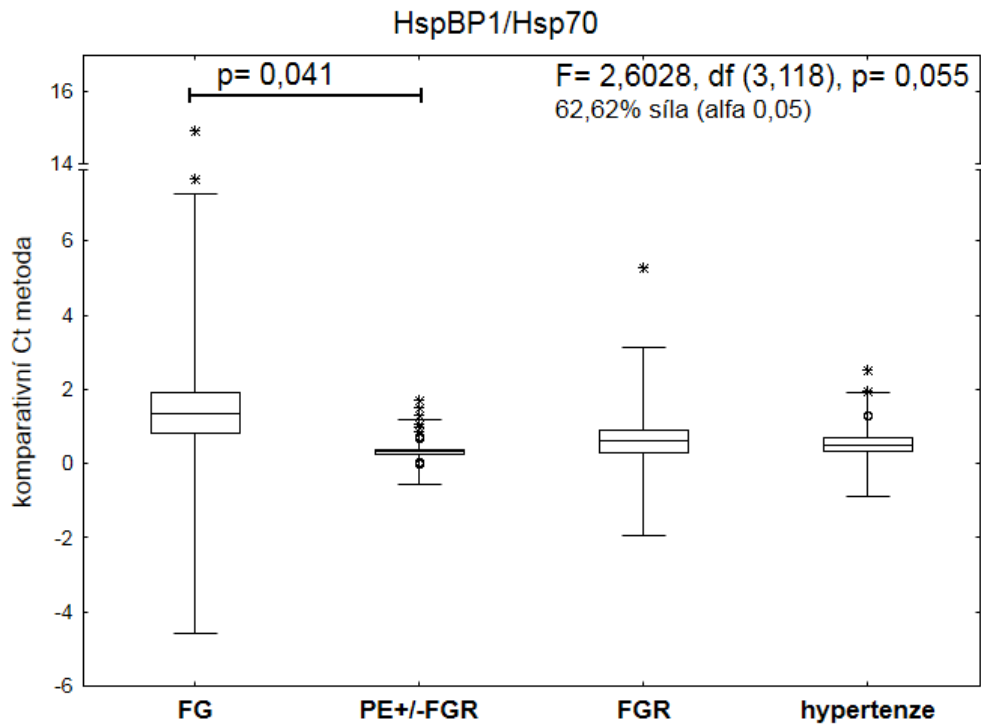
D)



E)

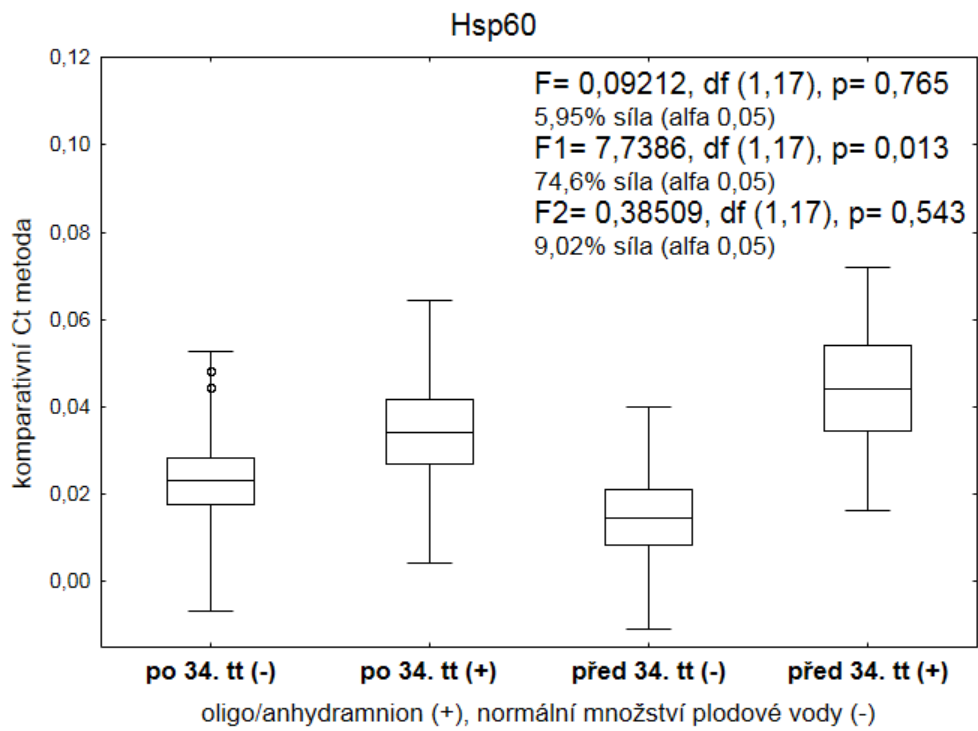


F)



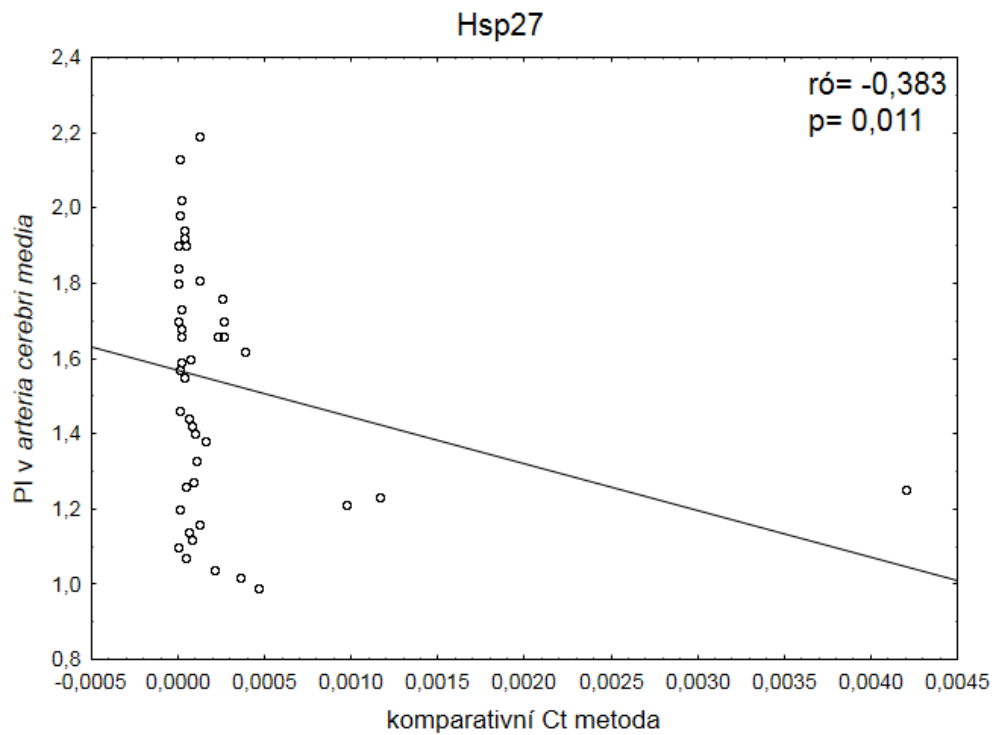
- Průměr
- Průměr +/- směrodatná chyba
- ┆ Průměr +/- 2 směrodatné odchylky
- Odlehlé
- * Extrémy

Graf č. 6: Expresce hsp60 v plné krvi matky ve vztahu k závažnosti FGR

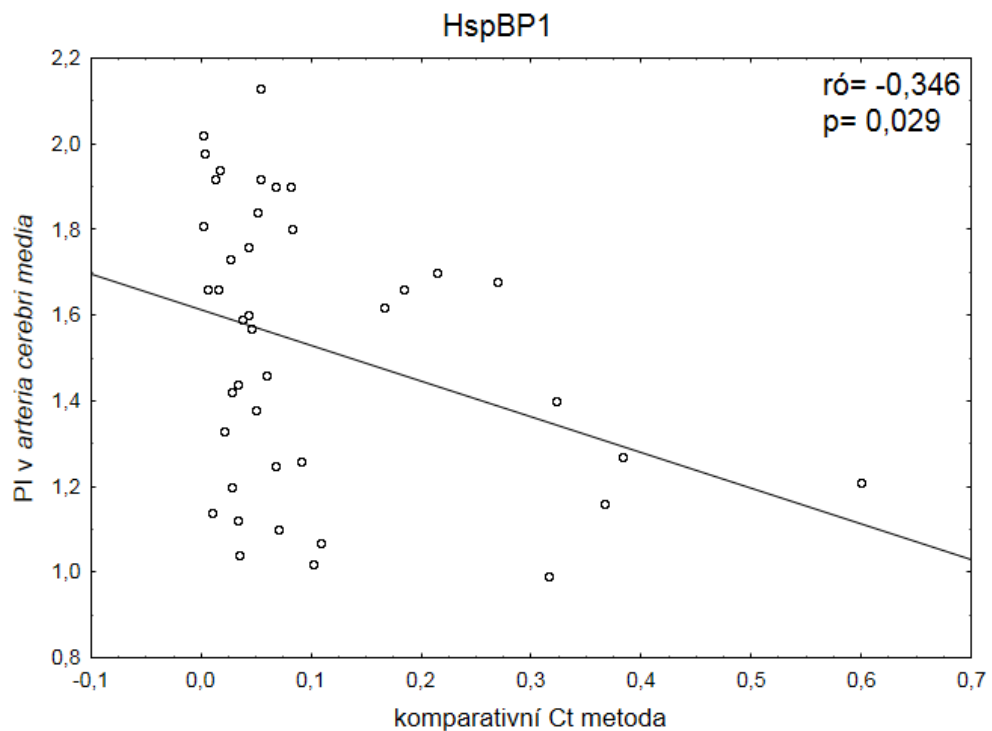


- Průměr
- Průměr +/- směrodatná chyba
- ┆ Průměr +/- 2 směrodatné odchytky
- Odlehlé
- * Extrémy

Graf č. 7: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria cerebri media* a expresí Hsp27 v plné periferní krvi matky



Graf č. 8: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria cerebri media* a expresí HspBP1 v plné periferní krvi matky



Graf č. 9: Vztah mezi hodnotami PI v *arteria cerebri media* a poměrem HspBP1/Hsp70 v plné periferní krvi matky

