Univerzita Karlova v Praze
1.lékařská fakulta
Gynekologicko porodnická klinika 1.LF UK a VFN v Praze

MUDr.Hana Belošovičová
(rodné příjmení Víšková)

Koncentrace plazmatického cysteinu ve fyziologickém těhotenství a těhotenství s následným rozvojem preklampsie

Disertační práce

Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Oborová rada: Experimentální chirurgie

Praha 2008

Obsah

I. Úvod 6

II. Přehled o současném stavu zkoumané problematiky 7

2.1. Cystein a jeho metabolismus 7

2.2. Homocystein – prekursor cysteinu 10

2.2.1. Vztah homocysteinu k patologickým stavům mimo těhotenství 10

2.2.2. Homocystein a těhotenství 15

2.2.2.1. Fyziologické změny v těhotenství 15

2.2.2.2. Homocystein a patologické stavy v těhotenství 17

2.2.2.2.1. Rozštěpové vady neurální trubice 18

2.2.2.2.2. Placentární poruchy 22

2.2.2.2.3. Opakované těhotenské ztráty 22

2.2.2.2.4. Tromboembolie 24

2.2.2.2.5. Další patologie 25

2.3. Cystein 26

2.3.1. Vztah cysteinu k patologickým stavům 26

2.3.1.1. Kardiovaskulární choroby 26

2.3.1.2. Karcinom prsu 27

2.3.2. Cystein a těhotenství 28

2.3.2.1. Fyziologické změny v těhotenství 28

2.3.2.2. Cystein a patologické stavy v těhotenství 30

2.4. Cystein, homocystein a jejich vztah k preeklampsii 31

2.4.1. Preklampsie 31

2.4.2. Homocystein a preeklampsie 34

2.4.3. Cystein a preeklampsie 36
III. Cíle práce 38
IV. Metodika 40
4.1. Design studie 40
4.2. Odběr vzorků a laboratorní analýza 41
4.3. Statistické zpracování 42
V. Výsledky 43
5.1. Porovnání hladin aminothiolů v druhém a třetím trimestru u normotenzních těhotných 43
5.2. Regresní model hladiny cysteinu u normotenzních těhotných a netěhotných žen 44
5.3. Porovnání hladiny cysteinu u těhotných a netěhotných žen 50
5.4. Analýza hladiny cysteinu u preeklampsie 51
VI. Diskuze 53
VII. Závěry 57
VIII. Příloha – publikace 58
IX. Publikační činnost 12
X. Seznam zkratek 12
~~VIII.~~XI. Literatura 12

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svým rodičům. Děkuji jim jednoduše za vše, mimo jiné za veškerou jejich podporu včetně nemalé podpory finanční v prvních letech mého studia po absolutóriu, kdy můj příjem byl méně než minimální. Děkuji svému muži za velké pochopení pro moji práci a podporu v tom, abych tuto práci, které jsem dávala volné večery a víkendy, nevzdala.

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Caldovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a konzultace i za doporučení velmi přínosných letních škol (Erasmus Summer Programe), stáží a kurzů (Research and Development in Fetal medicine, Diploma in Fetal Medicine), kde jsem se mohla naučit orientaci v odborných článcích, setavování metodik vědeckých projektů, zpracování a prezentaci výsledků a v neposlední řadě navázat velmi cenné osobní kontakty se špičkovými lékaři věnujícími se klinickému výzkumu.

Děkuji prof. MUDr. Jaroslavu Živnému, DrSc., přednostovi Gynekologicko porodnické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze v době, kdy jsem s PGS studiem začínala, za inspirující podmínky ke studiu. Děkuji též současnému přednostovi této kliniky prof. MUDr. Aloisi Martanovi, DrSc. za pochopení pro mé studimu a za navýšení mého úvazku na klinice, které výrazně zlepšilo mojí existenční situaci.

Děkuji doc.MUDr. Vikotoru Kožichovi, CSc. za jeho konstruktivní kritiku při psaní článku, MUDr. Kamile Veselé, PhD. za její spolupráci a pomoc při získávání literatury a ing. Bohumile Janošíkové, PhD. za pomoc a podporu při dokončování článku k publikaci.

Tato práce byla podpořena stipendiem Hlávkovy nadace

Děkuji.

Hanka Belošovičová

I. Úvod

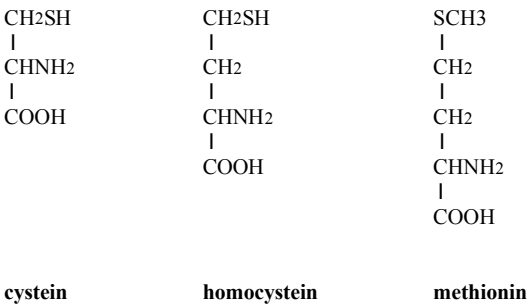
Vztahu aminothiolů a změnám jejich hladin v souvislosti s různými těhotenskými patologiemi jako je preeklampsie, abrupce placenty, vrozené vývojové vady plodu (rozštěpy neurální trubice, srdeční vady, rozštěpy rtu a patra) je v posledních letech věnována velká pozornost. Centru zájmu byl dosud hlavně prekursor cysteinu homocystein, nezávislý rizikový faktor aterosklerózy a rizikový faktor rozvoje tromboembolické nemoci. Jeho role v etiopatogenezi těchto onemocnění není zcela vyjasněna, ale předpokládá se účast homocysteinu v patofyziologických dějích vedoucích k vaskulárnímu poškození, pravděpodobně hlavně formou indukce oxidativního stresu. Proto se v posledních letech zaměřuje pozornost mnoha vědeckých týmů na studium metabolizmu aminothiolů v souvislosti s těmi těhotenskými komplikacemi, v jejichž pravděpodobně multifaktoriální etiopatogenezi se předpokládá podíl vaskulárního poškození. Preeklampsie a abrupce placenty patří mezi závažné těhotenské komplikace ohrožující na zdraví a životě nejen plod, ale i matku, resp. jsou nejčastější příčinou mateřské morbidity a mortality a častou příčinou morbidity a mortality fetální a proto studium jejich etiopatogeneze, terapie, screeningu a časné diagnostiky stojí ve středu zájmu.

Cílem mé práce bylo stanovit hladiny celkového plazmatického cysteinu dalších aminothiolů ve fyziologickém těhotenství a ve vztahu k následnému rozvoji preeklampsie.

II. Přehled o současném stavu zkoumané problematiky

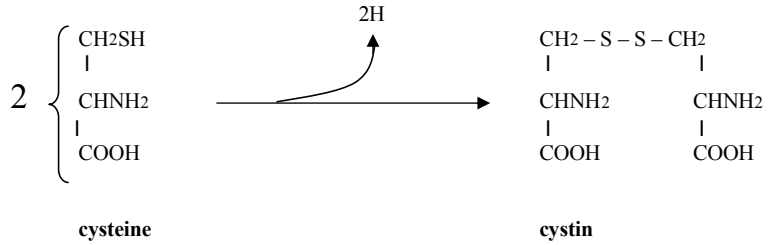
2.1. Cystein a jeho metabolizmus

Cystein je neesenciální aminokyselina s racionálním vzorcem 2-amino,3-sulfopropanová kyselina a sumárním vzorcem $C_3H_7NO_2S$ (obr.1).



Obr.1. Strukturní vzorce cysteinu, homocysteinu a methioninu

Cystein je prekurzorem látek, které mají zásadní roli v regulaci oxidativního stresu a detoxikaci (glutathion, taurin, anorganický sulfát). Též oxidace cysteinu na cystin (obr. 2) probíhá snadno a přeměna dvou skupin –SH na S-S je pravděpodobně důležitým oxidoredukčním systémem v těle [157]. Atom síry s polarizovatelným a elastickým elektronovým obalem je jeden z nejlepších nukleofilů a cystein participuje na řadě biochemických enzymových reakcí [158]. Thiolová skupina je snadno oxidovatelná a umožňuje vytváření příčných disulfidových můstků, čímž se, jako jediná sirná aminokyselina, významně podílí na konformaci a funkci bílkovin a enzymů [10]. Do organizmu se cystein dostává



Obr. 2. Přeměna cysteinu na cystin

v potravě a též je přes homocystein syntetizován z pro savce jediné esenciální sirné aminokyseliny methioninu [3]. Cystein se z největší části odbourává na sulfát vzniklý z merkaptoskupiny, vylučující se ledvinami, a pyruvát. Metabolizmus cysteinu je pravděpodobně nejdůležitějším zdrojem iontů H^+. Strava bohatá na proteiny tak způsobuje zvýšenou kyselost moče [159].

Methioninový cyklus (obr. 3) je ubikviterní biochemická reakce probíhající ve všech buňkách organizmu. Methionin je esenciální aminokyselina nutná pro proliferaci buněk a syntézu DNA a RNA. Nejdůležitější metabolickou rolí methioninu je syntéza S-adenosylmethioninu, který je důležitým donorem methylu v mnoha methylačních reakcích v organizmu (methylace DNA, RNA, syntéza proteinů a lipidů) a dále syntéza homocysteinu. Z methioninu a adenosinu vzniká nejprve za katalýzy methion-S-adenosyltransferázy S-adenosylmethionin (AdoMet). Jeho demethylací vzniká S-adenosylhomocystein (AdoHcy), ze kterého, po hydrolýze katalyzované S-adenosylhomocysteinhydrolázou, vzniká homocystein (Hcy). Homocystein je dále metabolizován dvěma cestami. V první metabolické *cestě remethylační* je homocystein remethylován zpět na methionin. Klasická remethylační cesta je úzce spjata s metabolizmem folátů. Donorem methylu je 5-methyltetrahydrofolát a reakci katalyzuje methionin syntáza (MTR) s methionin syntáza reduktázou (MTRR). Prekurzorem 5-methyltetrahydrofolátu

je kyselina listová, která je spolu s dalšími kofaktory enzymů (vitamín B_6 jako kofaktoru serin hydroxymethyltransferázy a vitamín B_2 jako kofaktor 5,10-methylentetrahydrofolát reduktázy) nutná k správnému průběhu folátového cyklu. V methylentransferázové reakci, která probíhá pouze v jaterní tkáni, je donorem methylu betain a reakce je katalyzována betain-homocysteinmethyltransferázou (BHMT). Druhou cestou metabolizmu homocysteinu je *cesta transsulfurační*. V této cestě je homocystein degradován přes cystathionin na cystein (Cys). Nejprve dochází ke kondenzaci homocysteinu se serinem za katylýzy cystathionin β–syntházy (CBS) a vzniká cystathionin. Cystathionin je následně štěpen cystathionin γ–lyázou (CTH), atom síry z homosysteinu zůstává na serinové kostře a serin je transformován na cystein. Uhlíková kostra cysteinu tedy pochází ze serinu, pouze síra z původního methioninu. Z homocysteinové kostry po ztrátě síry zůstává homoserin, z něhož se vytvoří propionyl-CoA a ten skončí jako sukcinyl-CoA. Metabolizmus cysteinu následně probíhá několika cestami a vede k produkci glutathionu (GSH), anorganického sulfátu a taurinu (Tau) [11]. Část cysteinu se dekarboxyluje za vzniku cysteaminu, biogenního aminu, který se zabudovává do koenzymu A. Téměř tři čtvrtiny produkovaného cysteinu jsou využity k syntéze glutathionu. Syntéza glutathionu probíhá ve dvou krocích. Nejprve je pomocí γ–glutamyl syntázy na cystein navázán glutamát a vzniká γ–glutamylcystein. V druhém kroku je již syntetizován glutathion navázáním γ–glutamylcysteinu na glycin. Tato reakce je katalysována glutathion syntázou [12]. Glutathion má v lidském těle několik zásadních funkcí. Vazbou volných radikálů kyslíku a H_2O_2 se významně podílí na udržování intracelulárního redox potenciálu a udržování bílkovin a thiolů v redukované formě. Nezastupitelnou roli má i v detoxikaci a to vazbou těžkých kovů, léků a dalších toxinů [13]. Konjugace glutathionu a toxické látky je katalyzována glutathion S-transferázou. Konjugát je následně vyloučen a glutathion musí být nově syntetizován. Glutathion slouží též jako zásobárna a transportní forma cysteinu [12]. Další cestou metabolizmu cysteinu je jeho degradace na sulfát a pyruvát. Sulfát je nezbytný v řadě metabolických pochodů

jako je detoxikace, bisyntéza steroidů a posttranslační úpravy glykoproteinů [5]. Konjugací s xenobiotiky snižuje jejich toxicitu, zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě a jejich vylučování. Asi 70% síry obsažené v methioninu je vylučováno ve formě sulfátu, což poukazuje na kvantitativní důležitost této metabolické cesty [83]. Dalším produktem metabolizmu cysteinu je taurin, sirná, semiesenciální aminokyselina, která hraje důležitou roli v mnoha základních biologických procesech jako je vývoj CNS, sítnice, metabolizmus vápníku, stabilizace buněčných membrán, reprodukce a imunita [6,7]. Taurin má protektivní funkce proti oxidativnímu tkáňovému poškození [8] a v játrech slouží ke konjugaci se žlučovými kyselinami. Chloramin taurinu (Tau-Cl), který vzniká reakcí taurinu s kyselinou chlornou je silným regulátorem zánětlivé reakce. Taurin je přirozenou součástí potravy. Aktivita dekarboxylázy kyseliny cysteové, která je nutná pro biosyntézu taurinu z cysteinu, se snižuje v některých zátěžových situacích a proto je taurin přidáván do kojeneckých výživ a parenterálních roztoků, povzbuzujících nápojů, které používají sportovci i běžní lidé pro zvýšení výkonu [8].

Cystein má tedy důležitou roli v buněčném metabolizmu, jako prekursor látek regulujících oxidativní stres. Jako sirná aminokyselina obsahuje ve svém řetězci skupinu –SH a tvorbou disulfidových můstků se též významně podílí na struktuře molekul proteinů. Je jedinou sirnou aminokyselinou podílející se na stavbě proteinů [10]. Cestou remethylační je homocystein metabolizován buňkami všech tkání lidského těla, transsulfurace homocysteinu a produkce cysteinu je však možná pouze v játrech, pankreatu, ledvinách a CNS [3]. Transsulfurační cesta umožňuje syntézu cysteinu z methioninu a proto cystein není u dospělého člověka esenciální aminokyselinou. U novorozence je však aktivita cystathionin γ–lyázy, která štěpí cystathionin na cystein, nedostatečná pro pokrytí fyziologických potřeb a cystein je tak pro novorozence aminokyselinou esenciální [4].

2.2. Homocystein – prekursor cysteinu

O cysteinu je ve vztahu k těhotenství a patologickým stavům v těhotenství i mimo něj známo mnohem méně, než o jeho prekursoru homocysteinu. Jak bylo výše popsáno, je homocystein intermediárním produktem metabolizmu methioninu. Jedná se o neesenciální sirnou aminokyselinu, která na rozdíl od cysteinu není stavební součástí proteinů.

2.2.1. Vztah homocysteinu k patologickým stavům

V roce 1962 McCully popsal homocystinurii u dvou sester. Toto autosomálně recesivní onemocnění je spojeno s vysokou plazmatickou hladinou homocysteinu a jeho nadměrným vylučováním močí [14]. Základními klinickými projevy jsou: mentální retardace, dislokace očních čoček, marfanoidní habitus a další abnormality skeletu a hlavně vysoký sklon k tromboembolii, který je nejčastější příčinou časného úmrtí. Jako původce tohoto onemocnění byl identifikován defekt enyzmu cystathionin β−syntházy s následnou závažnou hyperhomocysteinémií [16]. McCully dále popsal případ dítěte s homocystinurií, cystationinurií a methylmalonicurií způsobenou poruchou metabolizmu kobalaminu s následkem arteriálních lézí, které byly obdobné jako u pacientů s defektem cystathionin β−syntházy. Tato pozorování vedla k formování hypotézy, že významně zvýšená hladina plazmatického homocysteinu u pacientů s hyperhomocysteinémií je v kauzálním vztahu k rozvoji časné arteriální okluzní choroby [15]. V roce 1976 byla publikována první studie prokazující zvýšenou hladinu smíšeného disulfidu cysteinu a homocysteinu (vzorec viz obr. 1) po zátěži methioninem u pacientů s koronární aterosklerózou než u zdravých kontrol [17]. Význam studie byl hlavně v tom, že hladina disulfidu u pacientů s koronární atereskl erózou byla sice signifikantně vyšší než u zdravých kontrol, přesto však

v absolutní hodnotě o jeden řád nižší než u pacientů s defektem metabolizmu kobalaminu nebo s defektem cystathionin β–syntházy. Tento fakt se stal mezníkem, který vyvolal velký zájem o studium homocysteinu s exponencielním nárůstem publikací týkajících se homocysteinu v 90. letech minulého století. Jejich výsledky byly shrnuty v několika metaanalýzách [18, 19]. První metaanalýza zahrnovala více jak 4000 pacientů s aterosklerotickým postižením cév v řečišti koronárním, cerebrálním a periferním a stejné množství kontrol. Analýza prokázala, že homocystein je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy ve všech těchto řečištích s následným rozvojem ischemické choroby srdeční (ICHS), cévních mozkových příhod (CMP) a ischemické choroby dolních končetin (ICHDK). Zvýšení celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) o 5 μmol je spojeno s nárůstem rizika koronární aterosklerózy o 60% u mužů a o 80% u žen [18]. Druhá metaanalýza zahrnovala 42 studií kardiovaskulární mortality v 11 zemích světa. Jen šest studií neprokázalo vztah mezi homocysteinem a kardiovaskulárním rizikem, ostatní vztah mezi homocysteinem a aterosklerózou resp. mortalitou potvrdily [19]. Jedna ze studií potvrdila narůstající riziko kardiovaskulární mortality s narůstající hladinou celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) [20]. Další studie prokázaly asociaci mezi hyperhomocysteinémií a zvýšeným rizikem tromboembolie [22] a Alzheimerovy choroby [23], demence [24] a poruchy kognitivních funkcí [25].

Důležité je mít na paměti, že tyto studie jsou epidemiologické a otázka kauzality dosud není objesněna. Výsledky existující in vitro studie však předpokládanou patogenetickou roli homocysteinu v endoteliální dysfunkci, proliferaci hladké svaloviny a poruch koagulace s následným vaskulárním poškozením potvrzují [35].

Během posledních 30 let intenzivního výzkumu bylo identifikováno bezpočet dietních, metabolických a enviromentálních faktorů ovlivňujících plazmatickou koncentraci homocysteinu. V metabolizmu homocysteinu jsou jako kosubstráty nepostradatelné vitamíny B_6, B_{12} a kyselina listová. Nedostatek těchto

vitamínů zvyšuje hladinu plazmatického homocysteinu [33,34]. Evidence mnoha studií prokazuje, že plazmatickou hladinu homocysteinu při mírné hyperhomocysteinémii je možno snížit podáváním kyseliny listové [124] a to již velmi nízkou dávkou 200μg za den [125]. Další studie prokazují efektivitu snížení hladiny homocysteinu podáváním vitamínů B12 a B6 [124,126,127,128]. Tyto vitamíny též při přidání ke kyselině listové způsobí další pokles hladiny homocysteinu [127,128]. Důležitým etiopatogenetickým faktorem pro mírnou hyperhomocysteinémii jsou vrozené defekty jiných enzymů než cystationin β-syntázy jako u homocystinurie, hlavně mutace methylentetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). Nárůst homocysteinu způsobuje i porucha funkce ledvin, štítné žlázy a kouření. Naopak v těhotenství hladina plazmatického homocysteinu klesá [9,27].

Ke studiu metabolizmu homocysteinu, zvláště transsulfurační cesty, je od 60. let minulého století používána zátěž methioninem. Odpověď na tuto zátěž je modifikována mnoha faktory včetně věku, pohlaví, rasy, přísunu vitamínů a též genotypem methylentetrahydofolát reduktasy (MTHFR). Přestože methioninový test identifikuje jedince se zvýšenou pozátěžovou hladinou homocysteinu, nemá stejnou diagnostickou hodnotu jako např. orální glukózový toleranční test (oGTT) pro diagnostiku diabetu a narůstá skepticizmus ohledně jeho hodnoty pro klinické studie [40].

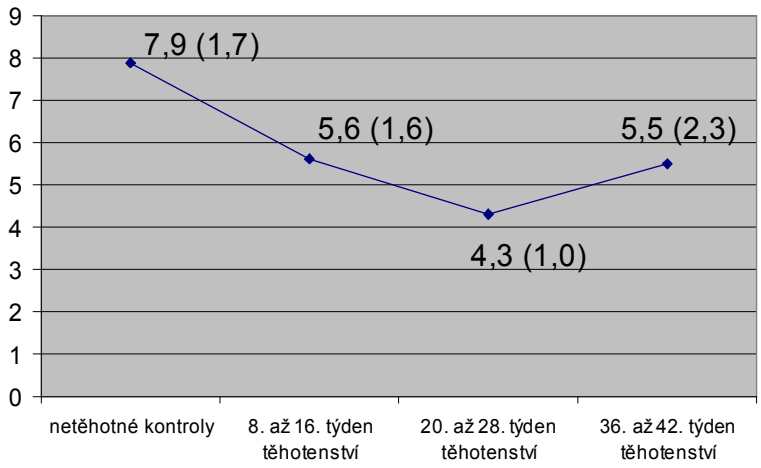
Pro porovnávání jednotlivých studií je problematické i to, že tzv. mírná hyperhomocysteinémie není dosud přesně definována. Obecně se jedná o stav, kdy je koncentrace homocysteinu vyšší než fyziologická, ale nedosahuje hodnot jako při homocystinurii. Nejběžnější definicí hyperhomocysteinémie je hodnota v plazmě nalačno vyšší než 15 μmol/l [44].

2.2.2. Homocystein a těhotenství

2.2.2.1. Fyziologické změny v těhotenství

V těhotenství dochází ke změnám téměř ve všech orgánových systémech, které odrážejí jak adaptaci organizmu ženy na nároky vyvíjejícího se plodu, tak adaptační mechanizmy zabraňující poškození mateřského organizmu. Fyziologické těhotenstké změny zahrnují rychlý nárůst hladiny mnoha hormonů, objemu extracelulární tekutiny (intravaskulární i intersticiální), srdečního výdeje, minutové ventilace plic, glomerulární filtrace, renální clearance a tělesné hmotnosti atd. Aminokyseliny matky jsou snadno transportovány přes placentu k plodu a vzniká hypoaminoacidémie matky. Koncentrace plazmatických proteinů se na konci těhotenství snižuje na 60-65g/l, přičemž průměrná koncentrace proteinů u netěhotných žen je 70 g/l [68].

Celkový plazmatický homocystein (t-Hcy) je u těhotných průměrně o 50-60% nižší než u žen netěhotných [9,27,55,69,70]. Hladina plazmatického homocysteinu klesá již v průběhu prvního trimestru, dosahuje minima v trimestru druhém a opět mírně vzrůstá v trimestru třetím přibližně na stejné hodnoty jako v trimestru prvním [55] (obr. 4). Důvod poklesu homocysteinu v těhotenství není zcela jasný, nabízí se vysvětlení zahrnující hemodiluci, zvýšenou glomerulární filtraci, zvýšenou produkci steroidů a vyšší utilizaci methioninu a homocysteinu plodem. Publikovaná data jsou však poněkud protichůdná. Podle studie Murphyho a kolegů tento pokles není možno minimálně v časném těhotenství vysvětlit hemodilucí nebo poklesem albuminu, neboť pokles homocysteinu byl prokázán již v 7. týdnu těhotenství, kdy fyziologická těhotenská hemodiluce a pokles albuminu dosud nejsou vyjádřeny [1]. Naproti tomu studie Walkera a kolegů prokázala přímou korelaci hladiny homocysteinu a albuminu v pozdějších fázích těhotenství [55]. Nález této korelace označují sami autoři za logický vzhledem k tomu,



Obr. 4. Změny hladiny celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) během těhotenství (průměr a SD) [55].

že 70-80% celkového plazmatického homocysteinu je vázáno na albumin. Na poklesu hladiny homocysteinu se pravděpodobně podílí i další mechanizmy včetně transplacentárního přenosu a utilizaci homocysteinu plodem. Tuto teorii podporuje průkaz gradientu hladiny homocysteinu směrem k plodu mezi plazmou těhotných a pupečníkovou krví získané při porodu [56] a nález nízké koncentrace homocysteinu a vysoké hladiny methioninu v coelomové tekutině [71,72]. Nález nízké hladiny homocysteinu a vysoké hladiny methioninu v coelomové tekutině nastoluje hypotézu, že remetylace homocysteinu na methionin může hrát důležitou roli v růstu a vývoji embrya [86]. Vzhledem k tomu, že folát a kobalamin jsou esenciální pro remetylaci homocysteinu na methionin, nález vysoké hladiny folátu a kobalaminu v coelomové tekutině a plodové vodě tuto teorii podporuje [71,72]. Gradient methioninu mezi mateřskou plazmou a coelomovou tekutinou též poukazuje na pravděpodobný aktivní transport methioninu z intervilózního prostoru do coelomové tekutiny s následným aktivním transportem nebo difúzi do tekutiny amniální. Vliv na pokles celkového plazmatického homocysteinu těhotné

má zřejmě i stimulační efekt estrogenů na remetylaci homocysteinu přes betain-homocysteinmethyltransferázu (BHMT) [67].

2.2.2.2. Homocystein a patologické stavy v těhotenství

Hypotéza o vztahu homocysteinu a některých těhotenských patologií byla nastolena pozorováním vyššího výskytu hypotrofie plodu, rozštěpu neurální trubice a vyšší perinatální úmrtnosti u dětí narozených heterozygotkám pro klasickou homocystinurii. U těchto žen byla též vyšší incidence preeklampsie a eklampsie [64,65]. Následně publikované studie prokazují asociaci mezi mírnou hyperhomocysteinémií a mnoha porodnickými komplikacemi jako jsou preeklampsie [26,27,28,29,30], rozštěpy neurální trubice (NTD) [32,41,42,43,45,46,50], rozštěpy rtu s nebo bez rozštěpu patra [118,119,120], vrozené srdeční vady [120], abrupce placenty [31,90,91,92], opakované těhotenské ztráty [66,88,89], hluboká žilní trombóza [54], růstová retardace plodu (IUGR) a nitroděložní úmrtí plodu [110,111] a další komplikace. Přesné mechanizmy vzniku těchto patologií však nejsou známy. Existuje experimentální evidence prokazující, že homocystein způsobuje endoteliální dysfunkci [57], která je spolu s nedostatečnou trofoblastickou invazí považována za etiopatogenetický faktor rozvoje těhotenstvím indukované hypertenze (PIH), preeklampsie, HELLP syndromu, opakovaných těhotenských ztrát, abrupce placenty, intrauterinní růstové retardace (IUGR) a intrauterinní smrti plodu (IUFD) [36,37]. In vitro studie prokazují, že tato endoteliální dysfunkce je pravděpodobně způsobena produkcí reaktivních kyslíkových radikálů a hlavně peroxidu vodíku [58]. In vivo zvýšená hladina homocysteinu poškozuje proteiny na endoteliálním povrchu účastnící se koagulační kaskády, což vede k hyperkoagulačnímu stavu [59,60,61]. Hyperhomocysteinémie je řazena mezi vrozené trombofilní stavy [44]. Studie aterosklerózy neustavily žádnou „cut off“ hodnotu homocysteinu pro vysoké

riziko aterosklerózy. Poukazují na to, že toto riziko spojitě narůstá se vzrůstající hladinou homocysteinu [62]. To vyvolává předpoklad, že každé snížení hladiny homocysteinu k hodnotám normálním pravděpodobně vede ke snížení rizika patologií potenciálně způsobených hyperhomocysteinémií. Podávání kyseliny listové perikoncepčně a následně v těhotenství tak může být potenciální prevencí výše zmíněných patologických stavů. Potvrzení tohoto předpokladu a eventuelní použití v praxi však vyžaduje randomizované studie účinku podávání vyšších dávek kyseliny listové, než je běžně obsaženo v prenatálních preparátech a zároveň ověření bezpečnosti takové praxe.

2.2.2.2.1. Rozštěpové vady neurální trubice

Pravděpodobně nejlépe doložený vliv metabolizmu homocysteinu na vznik patologie v těhotenství a zároveň nejefektivněji ustavená prevence (perikoncepčním podáváním vitamínů) je u rozštěpových vad neurální trubice (NTD). Ačkoliv hypotéza vztahu hyperhomocysteinémie a rizika NTD byla nastolena teprve v poslední dekádě minulého století, asociace hyperhomocysteinémie a zvýšeného rizika defektů neurální trubice již byla prokázána v mnoha publikovaných stuiích [45,46,32]. V etiopatogenezi rozštěpových vad neurální trubice se pravděpodobně uplatňuje snížená kapacita remetylace homocysteinu na methionin (související s folátovým cyklem) a zvýšený oxidativní stres u těhotných s postiženým plodem [47]. Na závislost rozštěpových vad a nutrice upozornila již holandská epidemiologická studie vztahu rizika NTD a doby početí [48]. Tato studie prokázala signifikantní nárůst rozštěpových vad u novorozenců početých v lednu až březnu 1945, tedy měsících největšího hladomoru za druhé světové války v Holandsku. Následovaly další studie prokazující vztah nutrice, hlavně suplementace vitamíny skupiny B včetně kyseliny listové a rizika rozštěpových vad [32]. Od prvních studií zabívajících se

etiologií NTD se otázka studia přesunula k hodnocení efektivity prevence prekoncepčního podávání vitamínů. Zásadní publikací stimulující tento posun byla práce Smithellse a spolupracovníků, prokazující vztah mezi vitamínovým deficitem a rizikem NTD [50]. Následná case-control studie stejné skupiny již vznesla hypotézu, že vitamínem podávaným ve směsi vitamínů B, který je rozhodující pro prevenci NTD je kyselina listová [49]. První publikovaná prospektivní intervenční klinická studie prokázala 50% redukci v opakování rozštěpové vady neurální trubice u žen s anamnézou plodu s NTD perikoncepčním podáváním kyseliny listové [41]. Následovala studie prevence NTD u žen bez anamnézy tohoto tohoto onemocnění, která prokázala redukci NTD u této nerizikové populace perikoncepční suplementací kyseliny listové a vitamínů [42] a bezpočet studií dalších. Systematický přehledový článek publikovaný v Cochranově databázi potvrzuje efekt perikoncepčního podávání kyseliny listové v prevenci NTD a zároveň neprokazuje vliv na spontánní potrat, mrtvorozenost a mimoděložní těhotenství [43]. Jako ne zcela žádoucí efekt perikoncepčního podávání kyseliny listové byla v této studii popsána vyšší incidence mnohočetného těhotenství.

Steegers et.al prokázali zvýšenou hladinu celkového plazmatického homocysteinu nalačno a po zátěži methioninem u žen, které porodily dítě s NTD v porovnání s ženami bez těhotenské komplikace [51]. Vitaminový status obou skupin se však signifikantně nelišil. Irské populační studie prokázaly vztah defektu remetylace homocysteinu a zvýšeného rizika defektů neurální trubice [52,53]. Tyto studie poukazují na to, že jak porucha v metabolizmu folátu vedoucí k nedostatečné produkci 5-methyltetrahydrofolátu, tak porucha v metabolizmu vitamínu B_{12} s často nedostatečným přísunem folátu a vitamínu B_{12} v potravě jsou velmi pravděpodobně zapojeny v etiopatogenetickém řetězci vzniku NTD. Tyto studie též potvrzují, že plazmatická hladina vitamínu B_{12} a folátu je nezávislým rizikovým faktorem vzniku NTD [52,53].

Mechanizmus, kterým kyselina listová působí protektivně na vznik NTD není zcela jasný. Byla vznesena hypotéza, že zvýšený přísun folátu může normalizovat remetylaci homocysteinu na methionin je-li následkem defektu enzymů účastnících se v remetylaci remetylace nedostatečná. Následné studium variant enzymů folátového cyklu účastnících se v remetylaci homocysteinu zpět na methionin (MTHFR a MTR), ale i v transsulfuraci homocysteinu na cystationin (CBS) ve vztahu k výskytu NTD dosud odhalilo dvě varianty MTHFR u nichž je prokazatelný zárůst rizika. Mutace C677T a A1298C genu pro metylentetrahydrofolatreduktázu (MTHFR) jsou spojeny se zvýšeným rizikem NTD a způsobují elevaci plazmatického homocysteinu. Zvýšená hladina homocysteinu se normalizuje po podávání kyseliny listové. To podporuje teorii protektivního mechanizmu kyseliny listové přes normalizaci remetylace homocysteinu spřažené s folátovým cyklem.

Van der Put et al. nalezli sníženou aktivitu MTHFR způsobenou mutací C677T v rodinách s postižením uzávěru nervové trubice [73]. Tato mutace byla v homozygotní formě přítomna u 16% matek, 10% otců a 13% dětí se spinou bifidou v porovnání s 5% výskytem u kontrol. Výsledky této studie byly potvrzeny i ve sudiích jiných autorů [74,75,76,77]. Meta-analýza studií prevalence C677T MTHFR mutace poskytla odds ratio (OR) 1,7 (95% CI 1,2-2,6) pro pacienty s NTD, 1,8 (95 % CI, 1,1-1,3) pro jejich matky a 1,9 (95% CI 1,3-2,8) pro jejich otce [78]. Žena s mutací C677T v homozygotní formě má 3,7 krát vyšší riziko NTD plodu než žena bez této mutace. Přítomnost této mutace u plodu navyšuje jeho riziko 2,9 krát. Vzhledem k nízké prevalenci NTD je individuální riziko při C677T mutaci v homozygotní formě malé, v populaci však může být tato mutace zodpovědná za významnou proporci NTD. Významný, sedmínásobný nárůst rizika NTD u plodu byl zaznamenán v případě, kdy matka i plod byli homozygoty pro C677T MTHFR mutaci [78]. Zjištění nárůstu rizika při mutaci C677T u plodu poukazuje na možnost, že v etipatogenezi NTD se účastní nejen defekt v metabolizmu matky, ale i plodu. Studie prevalence C677T v rodinách se

sporadickým i familiárním výskytem NTD prokazují navýšení rizika NTD spojené s C677T MTHFR mutací pouze u forem sporadických, nikoliv familiárních [85]. Předpokládá se, že různá prevalence polymorfizmů MTHFR je spolu se značným rozdílem v množství folátu v potravě různých etnik zodpovědná za různou prevalenci NTD v různých populacích [78].

Druhou identifikovanou rizikovou mutací je A1298C MTHFR mutace [79,80]. Tato mutace omezuje aktivitu MTHFR méně než mutace C677T. OR vzniku NTD při přítomnosti obou mutací v heterozygotní formě je 2,04 (95% CI 0,9-4,7) [79].

Otázka kauzality samotné hyperhomocysteinémie v rozvoji NTD však není dosud uspokojivě zodpovězena. S představou přímého toxického působení homocysteinu je souhlasná studie na modelu kuřecího embrya, která prokázala, že vysoká hladina homocysteinu indukuje defekty uzávěru nervové trubice a strukturální vady srdce [21]. Pravděpodobný mechanizmus tohoto přímého toxického efektu tkví v agonistickém působení homocysteinu na N-metyl-D-aspartátový (NMDA) receptor [87].

Další teorie předpokládá pouze nepřímou roli hyperhomocysteinémie a hlavní etiopatogenetický faktor vidí v defektu methionin syntházy (MTR), enzymu remetylační cesty methioninového cyklu (obr . 3) [44]. Funkční porucha tohoto enzymu vede nejen k hyperhomocysteinémii, ale i k poruše myelinizace, která se může podílet i na vzniku NTD. Jiní autoři však vztah defektu v jiných enzymech metabolizmu homocysteinu než MTHFR (methonin syntázy [81] a cystathionin β–syntázy [82]) a rizika NTD neprokázali. Jak MTR, tak nově objevený enzym methionin syntáza reduktáza (MTRR) účastnící se spolu s MTR remetylace homocysteinu na methionin, jsou však i nadále studovány a zůstávají kandidátními enzymy pro vysvětlení účinku prevence NTD kyselinou listovou [84].

2.2.2.2.2. Placentární poruchy

Evidence dalších těhotenských patologií, jejichž riziko je spojováno s hyperhomocysteinémií, není zdaleka tak rozsáhlá a konzistentní jako u NTD. Na vztah hyperhomocysteinémie a zvýšeného rizika abrupce placenty poukázalo několik studií [31,90,91,92,93,94]. V studii prevalence hyperhomocysteinémie u žen s anamnézou abrupce nebo infarktů placenty podstoupilo standardizovaný orální methioninový zátěžový test 84 žen s pozitivní anamnézou a 46 kontrol [31]. Hyperhomocysteinémie byla nalezena u 31% žen s abrupcí nebo infarkty placenty oproti 9% kontrol. Hyperhomocysteinémie byla signifikantně vyšší u žen s placentární komplikací v jejich prvním těhotenství v porovnání s ženami, kde došlo k abrupci v těhotenství jemuž předcházela těhotenství bez takové komplikace[31]. Předpokládaným podkladem abrupce je placentární vaskulopatie indukovaná hyperhomocystémií při deficitu folátu, vitamínu B_{12} nebo defektu MTHFR [92]. Homozygotní konstituce pro C677T mutaci MTHFR genu je spojena s vyšším rizikem placentární vaskulopatie (OR 2,45; 95% CI 1,00-6,02) [93]. Systematická meta-analýza osmi studií hodnotících riziko placentární abrupce v závislosti na hyperhomocysteinémii, deficitu kyseliny listové a vitamínu B_{12} prokázala asociaci placentární abrupce a infarktů placenty s hyperhomocysteinémií (OR 5,3; 95% CI 1,8-15,9) a homozygotní konstitucí pro C677T mutaci MTHFR (OR 2,3; 95% CI 1,1-4,9) [94]. Korelace s folátovým deficitem nebyla statisticky významná (OR 25,9; 95% CI 0,9-736,3) i přesto, že ve čtyřech studích vycházel folátový deficit jako nejsilnější rizikový faktor.

2.2.2.2.3. Opakované těhotenstké ztráty

První práce poukazující na vztah opakovaných těhotenských ztrát a hyperhomocysteinémie byla publikována Woutersem v roce 1993 [106]. Studie

zahrnovala 102 žen referovaných na jejich pracoviště pro 2 a více po sobě jdoucích spontánních potratů nejasné etiologie a 41 kontrol. U všech žen byl proveden zátěžový methioninový test. U 21% žen s opakovanými těhotenskými ztrátami byla prokázána hyperhomocysteinémie, která byla v této studii definována jako 97,5 percentil hodnot homocysteinu u kontrol [106]. Quere et al publikovali kazuistiku ženy, u níž došlo k dvěma interauteriním úmrtím plodů v 28. a 26. týdnu těhotenství a třem potratům v prvním trimestru [107]. Jedinými nalezenými anomáliemi u této ženy byla hyperhomocysteinémie, homozygotní forma C677T mutace v MTHFR genu a folátový deficit. Podáváním kyseliny listové a pyridoxinu došlo k normalizaci hyperhomocysteinémie a z následného těhotenství porodila své první živé dítě. V retrospektivní studii publikované spolu s touto kazuistikou bylo zahrnuto 100 žen s primární infertilitou resp. opakovanými aborty nejasné etiologie. 12 pacientek ze 100 mělo hyperhomocysteinémii, 20 mutaci C677T v homozygotní konstituci a 15 folátový deficit. Nejvyšší hladiny homocysteinu byly nalezeny u pacientek, které měly zároveň mutaci C677T v homozygotní konstituci i folátový deficit [107]. Dle závěru této studie autoři doporučují vyšetřovat hladinu homocysteinu u žen s opakovanými těhotenskými ztrátami nejasné etiologie.

V etiologii pozdních těhotenských ztrát v druhém a třetím trimestru je možno předpokládat jako etiopatogenetický faktor hyperhomocysteinémií indukované vaskulární poškození s následnou trombózou spirálních arterií a intervilózního prostoru. V zhledem k tomu, že se funkční intervilózní prostor utváří teprve kolem 12. týdne těhotenství, předpokládá se v případě časných těhotenských ztrát spíše přímý toxický vliv homocysteinu na embryo. Předpokládá se, že následkem narušeného metabolizmu homocysteinu dochází k nedostatečné produkci metylových skupin nutných k syntéze DNA během vývoje embrya [108]. Steegers-Theunissen et al publikovali studii koncentrace methioninu a homocysteinu v extraembryonální coelomové a amniální tekutině v 8. až 12. týdnu těhotenství [109]. V obou kompartmentech prokázali vysoké koncentrace

methioninu a nízké koncentrace homocysteinu v porovnání s hodnotami v mateřské plazmě.

2.2.2.2.4. Tromboembolie

Hyperhomocysteinémie je řazena mezi vrozené trombofilie (spolu s Leidenskou mutací, MTHFR mutacemi, deficitem antitrombinu III, proteinu C a S a dalšími) [44,121]. Homocystein poškozuje proteiny na endoteliálním povrchu účastnící se koagulační kaskády, což při hyperhomocysteinémii vede k hyperkoagulačnímu stavu [59,60,61]. Zvýšená hladina plazmatického homocysteinu je rizikovým faktorem vzniku hluboké žilní trombózy [122,123,54]. V case-control studii 269 pacientů mělo 10% pacientů s anamnézou jedné epizody hluboké žilní trombózy hladinu homocysteinu nad 95. percentilem hladiny kontrol (odds ratio 2,5; 95% CI 1,2 – 5,2) [54]. Asociace hyperhomocysteinémie a žilní trombózy byla silnější u žen než u mužů a rostla s věkem. Odds ratio venózní trombózy u žen s hyperhomocysteinémií bylo 3,8 (95% CI 1,4-10,2), u mužů 1,8 (95% CI 0,6-5,4). Vyloučení pacientů s jinými známými rizikovými faktory venózní trombózy (deficit proteinu C, proteinu S nebo antitrombinu, Leidenská mutace, těhotenství nedávný porod, hormonální kontracepce) odhady odds ratia spojeného s hyperhomocysteinémií významně nezměnilo [54]. Tato studie též upozornila na signifikantní rozdíl průměrné hladiny homocysteinu a tedy i nutně jiné „cut off“ hladiny pro mírnou hyperhomocysteinémii u žen a mužů (95. percentil u kontrol ženského pohlaví byl 17,1 μmo/l oproti 20,0 μmo/l u mužů). Zajímavé je, že ačkoliv mají ženy nižší průměrnou hladinu plazmatického homocysteinu než muži a tedy i absolutní hodnota „cut off“ hyperhomocysteinémie definované jako 95 percentil hodnot kontrol ženského pohlaví je nižší než u mužů, je u nich hyperhomocysteinémie asociována s vyšším rizikem žilní trombózy. Těhotenství je samo o sobě rizikovým faktorem pro vznik

tromboembolie vzhledem k protorombotickým změnám hladin koagulačních faktorů. I přes tento hyperkoagulační stav je incidence tromboembolie v těhotenství relativně nízká. Přítomnost hyperhomocysteinémie v těhotenství může být významným rizikovým faktorem trombózy. Otázka, zda má být u žen s prokázanou mírnou hyperhomocysteinémií v rámci prevence trombózy v těhotenství podávána kyselina listová případně antikoagulancia není jednoznačně zodpovězena [44].

2.2.2.2.5. Další patologie

Z dalších vrozených vývojových vad plodu jsou do souvislosti s hyperhomocysteinémií a nedostatečným příjmem kyseliny listové a dalších vitamínů skupiny B dávány nesyndromologické rozštěpy rtu a patra a vrozené vady srdce. Zatímco evidence souvislosti orofaciálních rozštěpů a hyperhomocysteinémie je kontroverzní, meta-analýza [120] prokazuje vztah hyperhomocysteinémie a vrozených vad srdce. Odds ratio (OR) pro vrozenou vadu srdce u plodu při hyperhomocysteinémii matky je 4,4 (95% CI 2,6-7,3) [120].

Výsledky studií zaměřených na další těhotenské patologie zmiňované v literatuře v souvislosti s poruchou metabolizmu homocysteinu, IUGR a nitroděložní smrt plodu [110,111], jsou zatím protichůdné a považovat jejich vztah s hyperhomocysteinémií za prokázaný by bylo předčasné.

Rozsáhlá evidence poukazuje na vztah hypehomocysteinémie a preeklampsie (viz kapitola Cystein, homocystein a preeklampsie).

2.3. Cystein

2.3.1. Vztah cysteinu k patologickým stavům

2.3.1.1. Kardiovaskulární choroby

Cysteinu a jeho vztahu ke kardiovaskulárním chorobám dosud věnovalo pozornost podstatně méně studií než homocysteinu [95,96,97,98]. Tyto studie nacházejí signifikantně vyšší koncentraci cysteinu u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním než u kontrol. Sledovaná kardiovaskulární onemocnění byla infarkty a krvácení v cerebrovaskulárním řečišti [95], arterioskleróza periferních cév [96] a infarkt myokardu [97]. Studie Brandhofa a kolegů nálezy těchto studií potvrzuje [99]. Analýzou potenciálních konfounderů však dochází k závěru, že cystein není, na rozdíl od homocysteinu, nezávislý rizikový faktor aterosklerózy (OR pro koronární aterosklerózu při elevaci celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) o 1 SD bylo 1,0 (95% CI 0,8-1,3) oproti OR pro elevaci celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) o 1 SD 1,4 (95% CI 1,1-1,8) [99]. Hladina celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) positivně korelovala s věkem (r=0,35, p=0,0001), BMI (r=0,21, p=0,003), diastolickým tlakem (r=0,30, p=0,01), systolickým tlakem (r=0,16, p=0,03) a koncentrací folátu v erytrocytech (r= 0,19, p=0,01). Pacienti s hypercholesterolémií měli hladinu celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) nižší (r= -0,20, p=0,003). Další zkoumané charakteristiky (pohlaví, HDL cholesterol, kouření, počet let kouření jedné krabičky za den, vitamim B_{12}, pyridoxalal-5-fosfát, konsumace alkoholu a kreatinin) s hladinou celkového plazmatického cysteinu nekorelovaly [99]. Rozsáhlá Hordalandská epidemiologická studie rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění prokázala silnou závislost hladiny celkového plazmatického cysteinu na pohlaví ve věkové skupině 40-42 let (hladina u mužů byla signifikantně vyšší než u žen) [105]. Ve věkové skupině 65-67 let se hladina t-Cys signifikantně nelišila. Rozdíl

v plazmatické hladině t-Cys mezi muži a ženami v mladší věkové skupině je pravděpodobně dán hormonálním efektem, který s věkem mizí. Jedním z cílů Hordalandské studie bylo posoudit závislost hladiny celkového plazmatického cysteinu na faktorech ovlivňujících hladinu celkového plazmatického homocysteinu. Tato studie prokázala pozitivní závislost plazmatického t-Cys na věku, celkovém cholesterolu, diastolickém tlaku a konzumaci kávy. Prokázala též silnou determinaci plazmatického t-Cys body mass indexem (BMI), na němž je hladina plazmatického t-Hcy nezávislá. Naopak mnohé faktory, jejichž asociace s hladinou homocysteinu je známá, jako kouření, užívání kyseliny listové a dalších vitamínů, srdeční frekvence a fyzická aktivita, s hladinou cysteinu korelovaly jen velmi slabě, nebo vůbec [105]. Vzhledem k tomu, že plazmatický t-Cys silně koreluje se známými rizikovými faktory aterosklerózy, vidí autoři této analýzy smysl v dalším studiu cysteinu a jeho eventuelní etiopatogenetické role v rozvoji aterosklerózy.

2.3.1.2. Karcinom prsu

Dalším patologickým stavem v jehož souvislosti je studován metabolizmus cysteinu je karcinom prsu. Cystein je v buňce metabolizován na glutathion (tripeptid cysteinu, glutamátu a glycinu), který je nejdůležitějším intracelulárním antioxidantem. Chrání buňky od oxidativního poškození DNA vychytáváním kyslíkových radikálů a má též důležitou roli v detoxikaci nejen těžkých kovů, metabolitů léků a chemických látek poškozujících DNA, ale i karcinogenů [112,113]. Také další metabolický produkt cysteinu, N-acetylcystein, má v experimentálním modelu prokázanou antigenotoxickou a antikancerogenní aktivitu, kterou působí v různých stádiích kancerogeneze [114]. V prospektivní studii závislosti rizika karcinomu prsu na hladině celkového plazmatického cysteinu bylo 32 826 zdravým ženám odebrán vzorek krve. Do 6 let byl u 712

z nich diagnostikován karcinom prsu [115]. Hladina celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) těchto žen s následným karcinomem prsu byla porovnána s plazmatickým t-Cys u žen bez projevu karcinomu. Vyšší hladina celkového plazmatického cysteinu byla signifikantně asociována s nižším rizikem karcinomu prsu. Ženy v horním kvartilu hodnot hladiny celkového plazmatického cysteinu měli oproti ženám v dolním kvartilu relativní riziko rozvoje carcinomu prsu 0,44 (95% CI 0,26-0,74). Asociace byla ještě mírně silnější u žen s premenopausálním karcinomem (RR 0,23; 95% CI 0,07-0,84) oproti ženám s karcinomem v postmenopauze (RR 0,52; 95% CI 0,28-0,96). Negativní závislost hladiny celkového plazmatického cysteinu a rizika karcinomu prsu byla ze sledovaných známých rizikových faktorů karcinomu prsu ovlivněna pouze BMI v době náběru krve ($p = 0,04$). Závislost celkového plazmatického cysteinu a BMI v době odběru krve ale byla slabá ($r = 0,10$, $p = 0,007$). Hladina celkového plazmatického cysteinu korelovala s hladinou celkového plazmatického homocysteinu. Na koncentraci folátu, vitaminu B6 a B 12 byla hladina cysteinu nezávislá. Ačkoliv relativní riziko karcinomu prsu u žen v dolním a horním kvartilu hodnot hladiny celkového plazmatického cysteinu vypadá slibně, na možnost případného klinického využití ve screeningu vrhá stín to, že průměrná hodnota celkového plazmatického cysteinu u žen s karcinomem (301 +/- 58 nmol/ml) se signifikantně nelišila od hodnoty kontrol (305 +/- 59 nmol/ml) ($p = 0,10$). Mediány celkového plazmatického cysteinu, se kterými jsme pracovali my v naší studii, v tomto článku bohužel nejsou uvedeny.

2.3.2. Cystein a těhotenství

2.3.2.1. Fyziologické změny v těhotenství

Přehled fyziologických změn organizmu těhotné ženy, které mají potenciální vliv i na metabolizmus aminokyselin viz. kapitola 2.2 Homocystein a těhotenství, 2.2.1.Fyziologické změny v těhotenství.

Pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu během fyziologického těhotenství v porovnání s hladinou u netěhotných žen je dokumentován pouze v jedné studii [27]. Tato studie porovnávala hladinu aminothiolů (cysteinu, γ-glutamylcysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu a glutathionu) u těhotných s rozvinutou preeklampsií s fyziologickými těhotnými a netěhotnými. Medián celkového plazmatického cysteinu byl u fyziologických těhotných signifikantně nižší než u netěhotných (190 μmol/l (138-232) vs. 253 μmol/l (205-270), $p < 0,01$). Fyziologické těhotné byly v rozpětí gestačního stáří 29+1 až 38+1. Do studie bylo zařazeno 20 těhotných s preeklampsií, 10 fyziologických těhotných a 10 netěhotných žen. Tento soubor je tedy relativně malý.

Studie hladiny aminokyselin ve venózní a arteriální krvi pupečníku získané těsně po porodu prokazuje pokles hladin aminokyselin v arteriální pupečníkové krvi [132]. Tento pokles je vysvětlován transportem aminokyselin do fetální krve a tkání, kde jsou pak využity pro biosyntézu bílkovin a jako zdroj energie. Studie plazmatických hladin celkového cysteinu, homocysteinu a cysteinylglycinu v arteriální a venózní pupečníkové krvi získané těsně po porodu donošených novorozenců bez známek růstové retardace a peripartální asfyxie narozených normotenzním matkám prokázala signifikantně nižší hladinu celkového plazmatického cysteinu a homocysteinu v arteriální krvi oproti krvi venózní (tab.1) [130]. Autoři studie z toho vyvozují, že cystein se dostává do fetální cirkulace a je následně využit plodem k bisyntéze glutathionu a proteinů.

Koncentrace celkového plazmatického cysteinylglycinu byla signifikantně vyšší v arteriální krvi oproti krvi venózní.

	venózní	arteriální	p
cystein	207 (146-299)	203 (134-303)	0,0002
homocystein	9,6 (4,8-17,4)	8,8 (4,9-20,4)	0,009
cysteinylglycin	33 (20-50)	35 (20-51)	0,005

Tab. 1. Koncentrace aminothiolů v pupečníkové krvi (n=195). Hodnoty jsou v mediánech (centrální 0,95 interval) v μmol/l [130].

2.3.2.2. Cystein a patologické stavy v těhotenství

Zvýšná hladina celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) je asociována s mnoha porodnickými komplikacemi jako jsou preeklampsie [26,27,28,29,30], rozštěpy neurální trubice (NTD) [32,41,42,43,45,46,50], rozštěpy rtu s nebo bez rozštěpu patra [118,119,120], vrozené srdečních vady [120], abrupce placenty [31,90,91,92], opakované těhotenské ztráty [66,88,89], hluboká žilní trombóza [54], růstová retardace plodu (IUGR) a nitroděložní úmrtí plodu [110,111] a další. Asociace hladiny celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) s některými z těchto kompliakcí byla dosud sledována pouze v jedné větší publikované studii [135]. Do této retrospektivní studie bylo zařazeno 5883 žen ve věku 40-42 let. U těchto žen byla stanovena jejich aktuální hladina celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) a zkoumána její asociace s výsledky jejich 14 492 předchozích těhotenství získané ze státního registru. Sledované těhotenské komplikace byly: preeklampsie, abrupce placenty, předčasný porod, nízká porodní hmotnost, mrtvorozenost, novorozenecká úmrtnost a vrozené vývojové vady.
Po adjustaci dle parity, věku v době porodu, t-Hcy, celkového cholesterolu, body mass indexu, kouření a konzumaci kávy, byla vyšší hladina celkového

plazmatického cysteinu (koncentrace nad 95.percentilem) asociována se signifikantně vyšším rizikem preeklampsie (n = 342; odds rario: 1,6; 95% CI 1,1-2,4; p=0,03), předčasného porodu (n = 774; odds rario: 1,8; 95% CI 1,3-2,5; p=0,01) a velmi nízké porodní hmotnosti (VLBW) (n = 175; odds rario: 2; 95% CI 1,1-3,9; p=0,03). Slabou asociaci s vyšší hladinou t-Cys vykazovaly i vrozené vývojové vady a mrtvorozenost po 1500g. Vyšší hladina t-Cys nebyla asociována s vyšším rizikem abrupce placenty. Asociace s vrozenými vývojovými vadami byla též slabá (n = 191; odds rario: 1,7; 95% CI 1,0-2,8; p=0,06). Žádná asociace mezi hladinou t-Cys a specifickou vrozenou vývojovou vadou nebyla signifikantní. Asociace vyšší hladiny celkového plazmatického cysteinu a rizika preeklampsie, předčasného porodu a velmi nízké porodní hmotnosti byla nezávislá na hladině homocysteinu.

2.4. Cystein, homocytein a jejich vztah k preeklampsii

2.4.1. Preklampsie

Preeklampsie je podle standardu International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy definována jako hypertenze rozvíjející se po 20. týdnu těhotenství s diastolickým tlakem nad 90 při minimálně dvouch měřeních s odstupem minimálně 4 hodin spolu s proteinurií nad 300 mg/24 hodin [140]. Její etiologie není dosud uspokojivě objasněna. K jejímu rozvoji dochází pravděpodobně následkem nedostateční trofoblastické invaze do spirálních arterií v prvním a druhém trimestru těhotenství. Stěny spirálních arterií pak nejsou schopny potřebné dilatace nutné k dostatečnému průtoku v mateřské části placentárního řečiště [139]. Předpokládá se, že rostoucí krevní tlak těhotné je kompenzačním mechanizmem udržujícím tento průtok v mezích potřebných pro rostoucí plod. Za důležitý etiopatogenetický faktor, který se podílí na rozvoji

preeklampsie je v současnosti považován oxidativní stres spolu s endoteliální dysfunkcí [136,137]. Incidence preeklampsie je 5-7%. Rizikovými faktory jsou: věk pod 20 a nad 35 let, zatížená rodinná anamnéza (preeklampsie u příbuzného prvního stupně), první těhotenství (s novým partnerem), vícečetná gravidita, mola hydatidosa, obezita (BMI > 32), hydrops plodu nebo placenty, diabetes melitus vzniklý před těhotenstvím, primární hypertenze, renální onemocnění, u vícerodiček preeklampsie v předchozím těhotenství, která se projevila před 36. týdnem těhotenství [139]. Komplikace preeklampsie jsou závažné. Jedná se o možný rozvoj intrakraniálního krvácení, abrupce placenty, diseminované intravakulární koagulace (DIC), renálního selhání, ruptury jater a plicního edému. Nejtěžším stupněm preeklampsie je eklamptický záchvat. Jeho incidence je 0,05-0,1%. Riziko úmrtí těhotné následkem eklamptického záchvatu je asi 4%. Rizika pro plod související s preklamspií spočívají hlavně v iatrogenní prematuritě, dále v růstové retardaci a intrauterinní smrti (při eklamptickém záchvatu je riziko smrti plodu 13-30%) [140]. Preeklampsii může provázet pokles hladiny trombocytů a elevace jaterních testů. Tuto formu pak nazýváme HELLP syndrom (hypertension, elevated liver enzymes, low platelets), projevuje se většinou v nižším gestačním stáří a rozvoj laboratorních a klinických, zvláště krvácivých projevů, bývá perakutní.

Preeklampsie je tedy závažvá těhotenská komplikace s rizikem související morbidity a mortality matky i plodu. Etiologie multiorgánového preeklampsie zůstává nejasná. Po mnoho let je výzkum zaměřen i na screening těhotných rizikových z rozvoje preeklampsie. Studovány byly faktory anamnestické, klinické, biochemické, genetické a další. Jen u mála z nich byl prokázán potenciál alespoň určité predikce preeklampsie. Nejsilnějším sceeningovým faktorem zůstává anamnéza jejíž senzitivita je 45% při 25% falešné pozitivitě [154]. Druhým nejsilnějším je pak ultrazvukové hodnocení průtoku v uterinních arteriích v druhém trimestru [141], které má v kombinaci s anamnézou senzitivitu 63% při falešné pozitivitě 25% [154]. S nastolením hypotézy etiologického podkladu

preeklampsie v nedostatečné trofoblastické invazi a snahou o nalezení farmakologických postupů ovlivnění této invaze nebo časného ovlivnění jejích následků se výzkum hodnocení průtoku uterinními arteriemi přesuje do prvního trimestru.

Z dosud zkoumaných biochemických markerů mají nejlepší výsledky ve screeningu aktivin A a inhibin A [142], ale hledání lepších biochemických markerů pokračuje. Existuje evidence, že kombinace ultrazvukového zhodnocení průtoku v uterinních arteriích v druhém trimestru spolu s biochemickými markery zvyšuje senzitivitu predikce preeklampsie [143].

Během posledních 20 let bylo publikováno bezpočet randomizovaných klinických studií metod prevence nebo snížení incidence a závažnosti preeklampsie. Tyto studie se zaměřily na zhodnocení významu korekce některých biochemických dysbalancí, patofyziologických mechanizmů a dietních deficitů. Randomizované studie podávání různých farmak (kyseliny acetylsalicilové, antihypertenziv včetně diuretik, magnezia, zinku, kalcia) neprokázaly snížení rizika preeklampsie u zdravých nulipar. Předpokládá se, že dokud nebude dobře definovaná etiopatogeneza preeklampsie, nebudeme pravděpodobně schopni ustavit funkční screening a prevenci této závažné těhotenské patologie. Též naše terapeutické možnosti jsou omezeny. Jedinou kauzální terapií je v současnosti porod. Snahou symptomatické léčby preeklampsie antihypertenzivy je oddálit nutnost porodu v případě nezralosti plodu, předcházet komplikacím matky souvisejícím s hypertenzí a v případě těžké preeklampsie nebo eklamptického záchvatu spolu s antikonvulzivy stabilizovat těhotnou pro možnost ukončení těhotenství.

2.4.2. Homocystein a preeklampsie

Hladina homocysteinu v těhotenství fyziologicky klesá oproti stavu mimo těhotenství (viz. kapitola 2.2.1. Fyziologické změny v těhotenství). Nejčastější příčinou mírné hyperhomocysteinémie v populaci je folátová deplece a zvýšené hladiny homocysteinu jsou tak užitečnou známkou nedostatečného přísunu kyseliny listové potravou [146,147]. Dalším etiopatogenetickým faktorem hyperhomocysteinémie jsou mutace genů pro enzymy folátového cyklu, nejčastěji mutace pro methylentetrahydrofolát reduktázu (MTHFR). Za klinicky relevantní jsou v současnosti považovány mutace MTHFR C667T a A1298C.

Hyperhomocysteinémie těhotné ženy je asociována s různými těhotenskými komplikacemi etiologicky souvisejícími s placentou včetně preeklamspie [148] (další patologie viz. 2.2.2. Homocystein a patologické stavy v těhotenství). U hyperhomocysteinémie spojené s MTHFR mutací je důležité si uvědomit, že vyšší riziko preeklampsie je spojeno s fenotypem projevu hyperhomocysteinémie a nikoliv s genotypem resp. určitou mutací př. MTHFR, která způsobuje hyperhomocysteinémii [108].

Většina dosud publikovaných studií dokládá asociaci hyperhomocysteinémie s již rozvinutou preeklampsií [27,30,149,150,151]. Studie hladiny aminothiolů u těhotných s rozvinutou preeklampsií prokázala, že medián celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) u těhotných s preeklampsií je signifikantně vyšší než u fyziologických těhotných (13,3 versus 8,4 μmol/l, $p<0,02$) [27]. Hordalandská retrospektivní studie celkového plazmatického homocysteinu u 5883 žen ve věku 40-42 let prokázala asociaci stávající hyperhomocysteinémie a vyššího rizika komplikací těhotenství u těchto žen v minulosti [155]. Sledovanými komplikacemi asociovanými s hyperhomocysteinémií byly kromě preeklampsie i předčasný porod, mrtvorozenost a velmi nízká porodní hmotnost.

Jen málo studií bylo věnováno prospektivnímu sledování hladiny homocysteinu a jeho vztahu k následnému rozvoji preeklampsie [29,138,152,153]. Výsledky těchto studií jsou ve svých závěrech vztahu hyperhomocysteinémie a následného rozvoje preeklampsie konfliktní. První studie hladiny homocysteinu v séru těhotných v 16. týdnu těhotenství a rizika následného rozvoje preeklampsie měla nested case-control design [152]. Z 3042 těhotných zařazených do studie se preeklampsie rozvilnula u 52. Elevace homocysteinu byla definována jako hodnota vyšší než 5,5 μmol/l (90. percentyl hodnot normotenzních těhotných). Po adjustaci dat podle věku těhotných, parity a body mass indexu (BMI) byla elevace homocysteinu asociována s 3,2 krát vyšším rizikem preeklampsie (OR 3,2; 95% CI 1,1-1,9; p=0,003) [152]. U prvorodiček byla elevace homocysteinu asociována s 9,7 krát vyšším rizikem preeklampsie než u vícerodiček bez elevace homocysteinu (95% CI 2,1-14,1; p=0,003). Hladina homocysteinu byla signifikantně asociována s BMI a paritou. Druhá publikovaná studie asociace hladiny homocysteinu v 16. týdnu těhotenství a následného rozvoje preeklampsie však signifikantní rozdíl průměrné hladiny homocysteinu u žen, které následně rozvinuly preeklampsii a těch, které zůstaly normotenzní neprokázala [29]. Průměrná hodnota celkového plazmatického homocysteinu u těhotných s následnou preeklampsií byla 6,99 μmol/l (95% CI 6,42-7,55), u normotenzních těhotných 6,91 (95% CI 6,45-7,34) [29]. Tato studie počítala s průměrnými hodnotami hladiny homocysteinu na rozdíl od ostatních publikovaných studií [152, 153, 156], které počítaly s mediánem hodnot. S výsledky první studie jsou konzistentní výsledky dalších dvou studií závislosti hladiny homocysteinu v časném těhotenství a následného rozvoje závažné nebo mírné preeklampsie [153, 156]. V obouch těchto studiích stejného vědeckého týmu byla nabrána krev těhotných v průměrném gestačním stáří 16-ti týdnů. U 56 těhotných s následnou těžkou preeklampsií byla hladina celkového plazmatického homocyteinu signifikantně vyšší než u těhotných normotenzních v celém průběhu těhotenství (9,8 μmol/l versus 8,4 μmol/l, p<0,001) [153]. Zvýšená hladina homocysteinu

byla asociována s trojnásobným rizikem rozvoje těžké preeklampsie. I u 71 těhotných s následnou mírnou preeklampsií byla hladina celkového plazmatického homocyteinu signifikantně vyšší než u těhotných normotenzních v celém průběhu těhotenství (8,4 μmol/l versus 7,07 μmol/l, p<0,001) [156]. Zvýšená hladina homocysteinu byla asociována s čtyřnásobným rizikem rozvoje mírné preeklampsie. Do prospektivní studie hladiny homocysteinu v 22-24. týdnu těhotenství a jeho vztahu k riziku pozdějšího rozvoje preeklampsie bylo zařazeno celkem 683 těhotných [138]. Tyto těhotné přicházely k ultrazvukovému screeningovému vyšetření plodu, během něhož byly zároveň zhodnoceny průtoky uterinními arteriemi. Koncentrace celkového homocysteinu v plazmě těhotných, které později rozvinuly preeklampsii (n=80, 12%) se signifikantně nelišila od koncentrace u žen s nekomplikovaným těhotenstvím (n=536, 78%) (median 5,1 μmol/l vs. 5,5 μmol/l, p=0,44). Signifikantní rozdíl nebyl ani v hladině t-Hcy u těhotných s patologickým průtokem v uterinních arteriích (n=275), který byl definován jako pulsatilní index (PI) nad 95.percentylem a těhotnými s průtokem normálním (n=408) (medián 5,6 vs. 5,4, p=0,13) [138].

2.4.3. Cystein a preeklampsie

O vztahu cysteinu a preeklampsie je dosud publikováno podstatně méně studií něž o homocysteinu. Studie hladiny aminothiolů u těhotných s rozvinutou preeklampsií prokázala, že medián celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) u těhotných s preeklampsií je signifikantně vyšší než u fyziologických těhotných (245 versus 190 μmol/l, p<0,01) [27]. U těhotných s preeklampsií byly hodnoty celkového plazmatického homocysteinu srovnatelné s hodnotami u netěhotných, tey nedošlo k poklesu ke kterému dochází u fyziologických těhotných. Hladiny glutathionu u těhotných s preeklampsií byly nižší než u těhotenství normotenzních. Autoři této studie tedy předpokládají, že dochází buď vyšší

spotřebě glutathionu nebo je porušena jeho syntéza z cysteinu a tak cystein a glutation mohou mít vliv na rozvoj preeklampsie [27].

Autoři subanalýzy dat Hordalandské studie se zaměřili na vztah hladiny celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) u žen ve věku 40-42 let a komplikací v jejich těhotenství v minulosti [135]. Do studie bylo zařazeno 14492 žen z nichž 342 mělo v minulosti těhotenství komplikované preeklampsií. Po adjustaci dat podle parity, věku v době těhotenství, t-Hcy, BMI, celkového cholesterolu, kouření a konzumace kávy byla hladina celkového plazmatického cysteinu nad 95. percentylem asociována s vyšším rizikem preeklampsie (OR 1,6; 95% CI 1,1-2,4; p=0.03), předčasného porodu (OR 1,8; 95% CI 1,3-2,5; p=0.001) a velmi nízké porodní hmotnosti (OR 2,0; 95% CI 1,1-3,9; p=0.03) [135].

Zajímavá je analýza odds ratia pro preeklampsii u subpopulací s různými kombinacemi nálezu vysokého nebo nízkého t-Cys s vysokým nebo nízkým t-Hcy. Asociace vyšší hladiny plazmatického t-Cys a rizika preeklampsie byla nezávislá na hladině homocysteinu (viz porovnání skupiny vyšší t-Cys/nižší t-Hcy a vyšší t-Cys/vyšší t-Hcy v tabulce 2). U subpopulace s vysokým t-Hcy ale zároveň nízkým t-Cys bylo riziko preeklampsie malé resp. OR bylo 0,8 (viz Tab 2). [135].

	OR preklampsie
nízký t-Cys/nízký t-Hcy (n=2577)	1 [172]
vysoký t-Cys/nízký t-Hcy (n=243)	1,7 (1,0-2,7) [164]
nízký t-Cys/vysoký t-Hcy (n=257)	0,8 (0,4-1,8) [16]
vysoký t-Cys/vysoký t-Hcy (n=108)	1,5 (0,7-0,3) [18]

Tab. 2. Odds raria (OR) pro preeklampsii pro různé kombinace hladiny celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) a celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy). Nízký t-Cys byl definován jako < 250 μmol/l, vysoký jako > 300 μmol/l, nízký t-Hcy jako < 12 μmol/l, vysoký jako >/= 12 μmol/l. Hodnoty OR jsou dány jako (95% CI) a [počet případů preklampsie v danné skupině]. [135]

III. Cíle práce

Cílem mé práce bylo stanovit hladiny celkového plazmatického cysteinu dalších aminothiolů ve fyziologickém těhotenství a ve vztahu k následnému rozvoji preeklampsie.

Fyziologická těhotenství

Cílem bylo zjistit normální hladiny celkového plazmatického cysteinu u normotenzních těhotných v průběhu těhotenství.

Nulová hypotéza č.1:

Hladina cysteinu a dalších sledovaných aminothiolů je ve fyziologickém těhotenství ve 19.-21. týdnu a v 30.-32.týdnu stejná.

Těhotné versus netěhotné

Cílem bylo porovnat hladiny celkového plazmatického cysteinu u normotenzních těhotných a netěhotných žen.

Nulová hypotéza č.2:

Hladina cysteinu je ve fyziologickém těhotenství stejná jako u netěhotných.

Preeklampsie

Cílem bylo porovnat hladiny celkového plazmatického cysteinu u normotenzních těhotných a těhotných s následným rozvojem preeklampsie.

Nulová hypotéza č. 3:

Hladina celkového plazmatického cysteinu v 19.- 21. týdnu těhotenství a 30.-32. týdnu těhotenství je ve fyziologickém těhotenství stejná jako v těhotenství s následným rozvojem preeklampsie.

IV. Metodika

4.1. Design studie

Studie hladiny cysteinu v krvi fyziologických těhotných byla prospektivní a observační. Do studie byly zařazovány těhotné v 19.-21. týdnu těhotenství přicházející na Gynekologicko-porodnickou kliniku 1.LF UK a VFN v Praze k ultrazvukovému screeningu v druhém trimestru. S každou těhotnou jsem nejprve sepsala anamnézu a vyplnila strukturovaný dotazník (rodinnou anamnézu, užívání vitaminu, kyseliny listové, kouření atd. viz příloha). Do studie byly zařazeny pouze zdravé primigravidy s jednočetným těhotenstvím. Ze studie byly vyřazeny těhotné s primární nebo sekundární hypertenzí, která se projevila již před těhotenstvím, těhotné s hypertenzí indukovanou těhotenstvím, diabetičky včetně gestačních, těhotné s poruchou ledvinných funkcí a těhotné s abnormálním ultrazvukovým nálezem (vrozenou vadou plodu, diskrepancí růstu atd.). Při standardní venostáze jsme odebrali první vzorek venózní krve v 19.-21. týdnu těhotenství a druhý u stejné těhotné v 30.-32.týdnu těhotenství, tedy v době ultrazvukových screeningových vyšetření. Náběr nebyl prováděn nalačno. Informace o průběhu těhotenství po 32. týdnu těhotenství do porodu, resp. 4. dne po porodu, byla u těhotných, které porodily v na Gynekologicko porodnické klinice 1.LF UK a VFN v Praze získána z dokumentace. Ostatní ženy byly obeslány dotazníkem případně informace získány telefonickým kontaktem rodiček.

K porovnání hladin celkového plazmatického cysteinu u těhotných žen a žen netěhotných a pro sestavení modelu závislosti hladiny plazmatického t-Cys na dalších sledovaných parametrech pro netěhotné jsme použili data z jiné předchozí studie aminothiolů u netěhotných žen. Ženy byly do této předchozí studie zařazeny po odebrání anamnézy dle stejného strukturovaného dotazníku jaký byl použit v naší prospektivní studii těhotných žen. Inkluzní a exkluzní zdravotní kritéria

byla stejná jako u žen těhotných (pochopitelně s vyjímkou vlastního těhotenství). Studie zahrnovala data celkem 63 netěhotných, zdravých, normotenzních žen. Do studie nebyly zařazeny ženy s diabetem a s poruchou ledvinných funkcí. Metodika odběru vzorků, separace plazmy, skladování a anylýza byly totožné s metodikou v naší studii těhotných žen (viz dále).

Preeklampsie byla definována podle standardu International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy jako hypertenze rozvíjející se po 20. týdnu těhotenství s diastolickým tlakem nad 90 mm Hg v minimálně dvouch měřeních s odstupem více jak 4 hodiny, provázaná proteinurií.

Studie byla schválena Etickou komisí 1.Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Všechny těhotné podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie.

4.2. Odběr vzorků a laboratorní analýza

Při stanovování homocysteinu je důležité striktní dodržování postupu včetně rychlé separace plazmy od krevních buněk jako prevenci uvolňování homocysteinu z buněk následkem v nich dále probíhajícího metabolizmu. Odběr krve do chlazených zkumavek pomáhá tento proces omezit. Naměřená hladina homocysteinu je ovlivněna i typem antikoagulačního agens [38]. Pravděpodobně nejcitlivějším krokem samotné analýzy, který výrazně ovlivňuje kvalitu výsledků, je redukce disulfidových vazeb mezi aminothioly vzájemně a mezi aminothioly a plazmatickými proteiny. V této studii použitá TCEP metoda je dobře reprodukovatelná a robustní metoda pro stanovování nejen homocysteinu, ale i ostatních celkových aminothiolů [63]. V mnoha studiích jsou za účelem určité standardizace vzorky odebírány nalačno. V poslední době publikované práce však poukazují na to, že toto pravděpodobně není nutné [39].

V naší studii byly vzorky krve získány standardní venepunkcí do zkumavek s EDTA, které byly ihned zchlazeny vložením do vodní lázně s ledem. Plazma byla separována do 15 minut po odběru centrifugací při 2000 G po dobu 15 minut při 4°C. Všechny vzorky plazmy byly ihned po separaci zamraženy a až do analýzy skladovány při -80°C. Koncentrace celkového plazmatického cysteinu (t-Cys), homocysteinu (t-Hcy), cysteinylglycinu (t-Cys-Gly) a glutathionu (GSH) byly stanoveny analytickou separační metodou HPLC (high performance liquid chromatography) a to konkrétně s využitím tri(2-karboxy-ethyl)fosfinu (TCEP) k redukci disufidových můstků. Jako fluorescenční derivační agens byl použit 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát [63]. Celkem bylo analyzováno 65 párových vzorků tj. 65 vzorků separované plazmy těhotných žen ve druhém trimestru a 65 vzorků separované plazmy stejných těhotných v trimestru třetím.

Laboratorní analýza byla prováděna ve spolupráci s Ústavem dědičných metabolických poruch 1.LF UK a VFN v Praze.

4.3. Statistické zpracování

Data byla analyzována pomocí statistického software STATISTICA (Release 7) a STATA 8. Analýza hladin aminothyolů (cysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu a glutathionu) v krvi těhotných žen v 19.-21.týdnu těhotenství a v 30.-32.týdnu těhotenství byla provedena pomocí párového *t*-testu s odhadem rozptylu. Porovnání hladin celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotných žen a žen netěhotných bylo provedeno pomocí nepárového *t*-testu s odhadem rozptylu. Hlubší studium dat, zejména vyšetření vztahu cysteinu a některých dalších stanovovaných aminothiolů a sledovaných parametrů pacientek, bylo realizováno pomocí (robustní) regresní analýzy [157, 158]. K zhodnocení dat těhotných s následným rozvojem preeklamspie bylo použito kvartylového grafu. Podrobnější popis statistického zpracování zvláště rozbor výsledků párového t-testu a postup sestavování lineárních regresních modelů závislosti hladiny celkového plazmatického cysteinu na dalších sledovaných parametrech (potenciálních vysvětlujících veličinách) u těhotných a netěhotných žen viz. příloha.

V. Výsledky

Od ledna 2002 do září 2003 jsme oba vzorky krve (v 19.-21. a 30.-32. týdnu těhotenství) získali u 65 těhotných. Z nich u 62 proběhlo těhotenství fyziologicky a u 3 těhotných se rozvinula preeklampsie. Klinické charakteristiky 62 fyziologických těhotných ukazuje tabulka 3.

Věk (v letech)	27 (17, 35)
BMI prekoncepčně (kg/m2)	22,35 (18,1, 32,9)
Hematokrit v19-21 týdnu	0,348 (0,287, 0,475)
Hematokrit v 30-32 týdnu	0,342 (0,296, 0,465)
Užívání folátu (%)	80
Normotenze (%)	100

Tab. 3. Klinické charakteristiky 62 fyziologických těhotných. Hodnoty jsou mediány (minimum, maximum).

5.1. Porovnání hladin aminothiolů v druhém a třetím trimestru u normotenzních těhotných

Stanovili jsme mediány hodnot celkového plazmatického cysteinu (t-Cys), homocysteinu (t-Hcy), cysteinylglycinu (t-Cys-Gly) a glutathionu (GSH) v druhém trimestru těhotenství (v 19.-21.týdnu těhotenství) a třetím trimestru těhotenství (v 30.-32.týdnu těhotenství) (tab. 4). Medián hodnot hladiny celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) byl ve třetím trimestru nižší (medián 176,1 μmol/l, první kvartil 163,0 μmol/l, třetí kvartil 189,4 μmol/l) než medián plazmatického t-Cys v trimestru druhém (medián 187,4 μmol/l, první kvartil 178,7 μmol/l, třetí

kvartil 205,2 μmol/l). Byl proveden klasický párový t-test, který ukázal signifikantní rozdíl hladiny plazmatického t-Cys v druhém a třetím trimestru ($p<0,001$). Koncentrace celkového plazmatického homocysteinu, cysteinylglycinu a glutathionu v druhém a třetím trimestru se nelišily (tabulky párového t testu viz příloha).

	19-21 týden	30-32 týden
cystein	187.4 (178.7, 205.2)	176.1 (163.0, 189.4)
homocystein	4.9 (4.1, 5.7)	4.6 (3.9, 5.6)
cysteinylglycin	30.2 (27.4, 33.7)	31.6 (28.1, 34.8)
glutathion	8.1 (7.5, 9.2)	7.9 (6.9, 8.7)

Tab. 4. Hodnoty celkového plazmatického cysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu a glutathionu u 62 prospektivně sledovaných fyziologických těhotenství. Hodnoty uvedené v tabulce jsou mediány (první a třetí kvartil) a v jednotkách μmol/l.

Testovali jsme hypotézy možných vysvětlení poklesu celkového plazmatického cysteinu. V literatuře je v těhotenství popsána korelace homocysteinu a hematokritu [3]. Proto jsme testovali, zda existuje obdobná korelace cysteinu a hematokritu a zda by pokles cysteinu ve třetím trimestru mohl být vysvětlen poklesem hematokritu. Hladina celkového plazmatického cysteinu však nekorelovala s hematokritem ani v druhém, ani v třetím trimestru. Ani rozdíl hladiny plazmatického t-Cys v druhém a třetím trimestru nekoreloval s rozdílem hematokritu ve druhém a třetím trimestru. Hypotéza, že hladina celkového plazmatického cysteinu je zavislá na hematokritu tedy byla na našem souboru zamítnuta.

5.2. Regresní model hladiny cysteinu u normotenzních těhotných a netěhotných žen

Testovali jsme, zda hladina ostatních aminothiolů a parametry sledované u těhotných (hematokrit a úzus vitamínů s obsahem kyseliny listové) mohou vysvětlovat hladinu celkového plazmatického cysteinu ve druhém a třetím trimestru resp. pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu mezi druhým a třetím trimestrem. Pokusili jsme se sestavit lineární regresní model závislosti cysteinu na ostatních měřených aminothiolech a sledovaných parametrech nejprve ve druhém trimestru, dále ve třetím a nakonec u kontrolního souboru netěhotných žen.

1) model pro těhotné ve druhém trimestru

Nejprve jsme vytvořili model obsahující jako vysvětlující veličiny všechny měřené a sledované parametry (viz. tab. 5) a postupně jsme vylučovali ty, které měly nejnižší signifikanci (viz. hodnota v sloupci P>t).

Cys	Coef.	Std. Err.	t	P>t	[95% Conf. interval]	
HMT 20.týden	-316.797	480.6968	-0.66	0.513	-1284.39	650.7952
Cys – Gly	-0.00132	0.007449	-0.18	0.86	-0.01632	0.013671
Hcy	-45.8606	138.7754	-0.33	0.743	-325.201	233.4798
Hcy^2	11.44479	22.76583	0.5	0.618	-34.3804	57.27001
Hcy^3	-0.94465	1.360034	-0.69	0.491	-3.68226	1.792957
GSH	1.693365	1.637994	1.03	0.307	-1.60375	4.990477
vit nyní	-13.7421	11.391	-1.21	0.234	-36.671	9.186772
vit dríve	21.08008	13.31843	1.58	0.12	-5.72853	47.8887

*HMT * Hcy*	42.89174	99.14527	0.43	0.667	-156.677	242.4608
β_0	272.0786	304.6175	0.89	0.376	-341.085	885.2418

Tab. 5. Lineární regresní model závislosti t-Cys na sledovaných vysvětlujících veličinách u těhotných v druhém trimestru. Koeficient determinace R= 0,3294. Cys – celkový plazmatický cysten, HMT 20.týden – hematokrit v 20.týdnu těhotenství, Cys-Gly – cysteinylglycin, Hcy – celkový plazmatický homocystein, GSH – glutathion, vit nyní – v době náběru užívané vitamíny, vit dříve – vitamíny užívané prekoncepčně nebo v časném těhotenství, HMT*Hcy -„křížový člen" násobek dvou vysvětlujících veličin hematokritu a celkového plazmatického homocysteinu, β_0 – absolutní člen regresního modelu.

Jako první byl tedy vyřazen cysteinylglycin (byl nejméně signifikantní), dále homocystein, křížový člen HMT*Hcy (násobek hematokritu a homocysteinu), vit nyní (aktuální úzus vitamínů), vit dříve (úzus vitamínů kdykoliv během těhotenství), HMT 20.týden (hematokrit v 19.-21.týdnu těhotenství) a nakonec GSH (glutathion). Po vyloučení těchto veličin jsme dostali model, který má všechny vysvětlující veličiny signifikantní (viz. tabulka 6). Koeficient determinace tohoto modelu je však velmi nízký (0,2287).

Cys	Coef.	Std. Err.	t	P>t	[95% Conf.interval]	
Hcy^2	5.242693	1.517994	3.45	0.001	2.197983	8.287402
Hcy^3	-0.54721	0.172787	-3.17	0.003	-0.89378	-0.20065
β_0	133.4052	15.47	8.62	0	102.3763	164.4341

Tab. 6. Lineární regresní model závislosti t-Cys na sledovaných signifikantních vysvětlujících veličinách u těhotných v druhém trimestru. Koeficient determinace R=0,2287.

Tabulka 6 reprezentuje model

$$Cys = 133.4 + 5.24 * Hcy^2 - 0.55 * Hcy^3 + \varepsilon.$$

2) model pro těhotné ve třetím trimestru

Data z třetího trimestu jsme zpracovali stejným postupem jako data z trimestru druhého, tedy postupným vylučováním těch vysvětlujících veličin, které měly nejnižší signifikanci.

Cys	Coef.	Std. Err.	t	P>t	[95% Conf.interval]	
HMT 30.týden	143.4569	445.5804	0.32	0.749	-753.45	1040.364
Cys – Gly	1.050095	0.54009	1.94	0.058	-0.03705	2.13724
Hcy	43.67807	86.89956	0.5	0.618	-131.242	218.5978
Hcy^2	-4.43356	15.62205	-0.28	0.778	-35.8791	27.01199
Hcy^3	0.154405	0.95585	0.16	0.872	-1.76962	2.078432
GSH	-1.1238	1.571745	-0.71	0.478	-4.28756	2.039961
vit nyní	6.193382	12.08042	0.51	0.611	-18.1232	30.51
vit dríve	-6.86645	14.16958	-0.48	0.63	-35.3883	21.65543
*HMT * Hcy*	-19.6279	86.6661	-0.23	0.822	-194.078	154.8219
β_0	14.12472	206.0812	0.07	0.946	-400.695	428.9446

Tab. 7. Lineární regresní model závislosti t-Cys na sledovaných vysvětlujících veličinách u těhotných v druhém trimestru. Koeficient determinace R= 0,1368.

Pro hladinu celkového plazmatického cysteinu ve třetím trimestru nebylo možno sestavit žádný model, neboť po postupném vylučování nejvíce nesignifikantních veličin, v modelu nezbyla žádná vysvětlující veličina. Jinými slovy, všechny vysvětlující veličiny, které jsme sledovali, byly nesignifikantní.

3) model pro netěhotné

Nakonec jsme se pokusili sestavit stejným postupem regresní model hladiny celkového plazmatického cysteinu u netěhotných kontrol. Pro sestavení modelu pro netěhotné jsme použili data z jiné studie aminothiolů u netěhotných žen. Ženy byly do této předchozí studie zařazeny po odebrání anamnézy dle stejného strukturovaného dotazníku jaký byl použit v naší prospektivní studii těhotných žen. Studie zahrnovala data celkem 63 netěhotných, zdravých, normotenzních žen. Do studie nebyly zařazeny ženy s diabetem a s poruchou ledvinných funkcí. Klinické charakteristiky netěhotných žen z tohoto kontrolního souboru viz. tabulka 8.

Věk (v letech)	33,5 (24, 48)
BMI (kg/m2)	22,6 (16,4, 30,5)
Hematokrit	0,392 (0,324, 0,467)
Užívání folátu (%)	27
Normotenze (%)	100

Tab. 8. Klinické charakteristiky 63 netěhotných žen sloužících jako kontrolní soubor pro regresní model závislosti hladiny cysteinu na vysvětlujících veličinách. Hodnoty jsou mediány (minimum, maximum).

Vytvořili jsme regresní lineární model závislosti hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi netěhotných žen na sledovaných potenciálních vysvětlujících veličinách.

Cys	Coef.	Std. Err.	t	P>t	[95% Conf.interval]	
HMT	288.9446	115.939	2.49	0.016	56.69089	521.1984
Cys – Gly	1.082685	0.4471887	2.42	0.019	0.1868581	1.978511
Hcy	18.64783	2.769036	6.73	0	13.10079	24.19488
Hcy^2	-0.41361	0.0726932	-5.69	0	-0.5592346	-0.26799
vit nyní	16.94784	8.381089	2.02	0.048	0.1585052	33.73718
β_0	-32.7238	53.97931	-0.61	0.547	-140.8574	75.40972

Tab. 9. Lineární regresní model závislosti t-Cys na sledovaných vysvětlujících veličinách u netěhotných žen. Koeficient determinace R= 0,5487.

Model, který je zachycen v tabulce 9, sice obsahuje samé signifikantní veličiny, ale neprošel dalšími testy, tj. testem na homoskedasticitu, testem specificity a testem na normalitu reziduí (viz Příloha - výpočty). Po dalším experimentování s různými typy modelů obsahujících různé transformace vysvětlujících veličin jsme nalezli model, který je zachycen v tabulce 10, tj.

$$Cys = 146{,}5 - 0{,}009 * Hcy^3 + 34{,}16 * HMT * Hcy + \varepsilon. \qquad (1)$$

Cys	Coef.	Std. Err.	t	P>t	[95% Conf.interval]	
Hcy^3	-0.00876	0.0016031	-5.47	0	-0.0119703	-0.00555
*HMT * Hcy*	34.16296	5.358059	6.38	0	23.44151	44.88442
β_0	146.5039	15.77686	9.29	0	114.9344	178.0733

Tab. 10. Lineární regresní model závislosti t-Cys na sledovaných vysvětlujících veličinách u netěhotných žen. Koeficient determinace R= 0,5487.

Vzhledem k tomu, že vysvětlujícími veličinami v tomto modelu je třetí mocnina hladiny celkového plazmatického homocysteinu a křížový člen násobku hematokritu a homocysteinu, tedy členy poněkud zvláštní, mohlo by vzniknout podežření, že se jedná o regresi tzv. zdánlivou. Pro ověření reálnosti této regrese jsme postupně vylučovali jednotlivé pacientky z dat, a to tak, aby došlo k nejvyššímu poklesu reziduálního součtu čtverců (tj. vylučování outlierů, leverage pointů či atypických pozorování) a sledovali, zda v každém dalším kroku budou opět vyloučeny pacientky z kroku předchozího. Test prokázal nejen to, že regrese je reálná (viz. tabulka 11), ale ukázalo se, že po vyloučení prvních třech pacientek vzrostl koeficient determinace nad 0,6.

n	62	61	60	59	58
Hcy^3	-0.0088	-0.0098	-0.0092	-0.0095	-0.0091
$HMT * Hcy$	34.1625	37.8162	35.9254	36.9286	35.2968
β_0	146.505	136.1396	140.8211	138.7047	142.9822
SumOfSquares	4.68E+04	3.98E+04	3.37E+04	2.99E+04	2.75E+04
CoeffDeter	0.4831	0.5555	0.5703	0.6088	0.6035
Excluded		34	35	36	38
			34	35	36
				34	35
					34

57	56	55	54	53
-0.009	-0.0092	-0.009	-0.0091	-0.0092
35.1428	35.7344	35.0958	35.495	35.9677
142.5742	141.5834	142.7542	140.6828	138.3511
2.52E+04	2.30E+04	2.12E+04	1.94E+04	1.77E+04
0.6235	0.6492	0.6611	0.6843	0.7092
4	5	52	48	32
38	4	5	52	48
36	38	4	5	5
35	36	38	4	52
34	35	36	38	4
	34	35	36	38
		34	34	36
			35	34
				35

Tab. 11. Tabulka zachycující postupné vylučování jednotlivých pacientek z dat (viz výklad níže). n – počet pozorování, SumOfSquares – součet čtverců, Excluded – pořadové číslo vyloučených pacientek, CoeffDeter – koeficient determinace.

Tabulka 11 naznačuje, že v prvním kroku byla z dat vyloučena pacientka s pořadovým číslem 34. Tato pacientka byla nalezena tak, že byly vzaty v úvahu

všechny podsoubory pacientek (původního 62 členého souboru) obsahující 61 pacientek a byl zvolen ten, pro nějž reziduální součet čtverců příslušného regresního modelu (3.98E+04) vykazoval největší pokles oproti součtu čtverců modelu pro všech 62 pacientek (4.68E+04).

Postup byl následovně opakován tak, že ze všech 62 pacientek byly vyloučeny dvě pacientky tak, aby model získaný metodou nejmenších čtverců pro zbývajících 60 pacientek měl opět nejmenší možný součet čtverců reziduí mezi modely pro všechny možné 60ti člené podsoubory pacientek. Byly vyloučeny pacientky s pořadovými čísly 34 a 35 (viz 3. sloupec tabulky).

Další sloupce tabulky byly získány opakováním popsaného postupu pro rozsahy podsouborů 59, 58 atd. až 53. Vzhledem k tomu, že vyloučené skupiny pacientek v každém kroku vždy obsahují pacientky vyloučené v předchozím kroku plus jednu navíc (v anglosaské literatuře se mluví o „nested" souborech), je tímto postupem potvrzena reálná regresní závislost vyjádřená modelem (1). Tento postup je vlastně aplikací metody odhadu regresních koeficientů, která je označována jako *nejmenší usekané čtverce (the least trimmed squares)* [157, 158].

5.3. Porovnání hladiny cysteinu u těhotných a netěhotných žen

Provedli jsme porovnání hladiny celkového plazmatického cysteinu v souboru našich těhotných v druhém a třetím trimestru s hladinou u žen netěhotných. Jako kontrolní soubor netěhotných žen jsme použili stejná data jako ve výše popsaném regresním modelu. Klinické charakteristiky tohoto kontrolního souboru netěhotných žen viz tabulka 8.

Průměrná hladina celkového plazmatického cysteinu u netěhotných žen (260,7 μmol/l) byla signifikantně vyšší než hladina celkového plazmatického cysteinu u těhotných v 19.-21. týdnu těhotenství (192,0 μmol/l) ($p<0,001$), resp.

vyšší něž hladina celkového plazmatického cysteinu u těhotných v 30.-32. týdnu těhotenství (177,0 μmol/l) ($p<0,001$).

5.4. Analýza hladiny cysteinu u těhotných s následným rozvojem preeklampsie

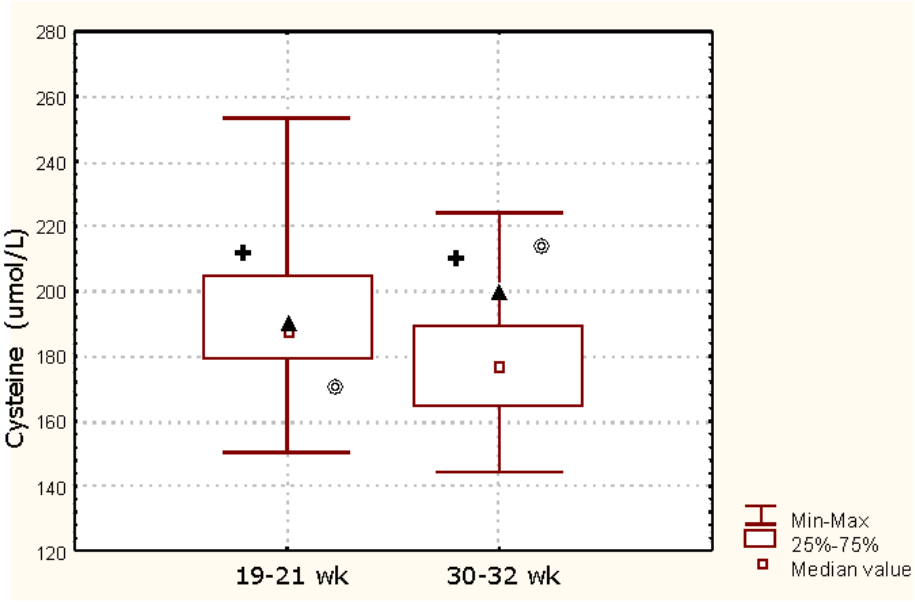
U třech z 65 těhotných došlo k rozvoji preeklampsie. Klinický obraz preeklampsie se u všech těchto těhotných se rozvinul po 38. týdnu těhotenství. Všechny tři plody byly zdravé, eutrofické, bez projevu růstové retardace plodu (IUGR). Ani u zěhotných nedošlo k žádným klinickým projevům komplikací preeklampsie. Vzhledem k hodnotám krevního tlaku a klinickým projevům bychom tedy tyto tři případy hodnotili jako projev mírné preeklampsie.
Tabulka 3. ukazuje hodnoty celkového plazmatického cysteinu u těchto těhotných s preeklampsií.

pacient	**19-21 týden**	**30-32 týden**
1	212.1	209.1
2	190.5	198.8
3	172.8	213.5

Tab. 3. Hodnoty celkového plazmatického cysteinu u 3 těhotných s následným rozvojem preeklampsie (μmol/l).

Hodnoty plazmatického t-Cys u těchto třech těhotných s preeklampsií jsme interpolovali na kvartilový graf plazmatického t-Cys u fyziologických těhotensví (obr. 5). V druhém trimestru byly hodnoty žen s následnou preeklampsií rozloženy v celém intervalu resp. napříč všemi kvartily. Ve třetím trimestru však hodnoty

všech těchto těhotných s preeklampsií spadaly do horního kvartilu hodnot fyziologických těhotných.



Obr. 5. Hodnoty celkového plazmatického cysteinu 3 těhotných s následnou preeklampsií interpolované na kvartilový graf koncentrace celkového plazmatického cysteinu u fyziologických těhotných**.**

VI. Diskuze

V naší prospektivní observační studii 65 těhotných žen jsme prokázali statisticky signifikantní pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotných žen mezi druhým a třetím trimestrem těhotenství. Důvod tohoto poklesu není zcela jasný. Možná vysvětlení poklesu celkového plazmatického cysteinu ve fyziologickém těhotenství jsou: konzumpce cysteinu plodem, hemodiluce a zvýšené renální vylučování cysteinu, popsán je též vliv steroidních hormonů [131].

Hypotézu konzumpce cysteinu plodem podporuje nález rozdílné koncentrace cysteinu v arteriální a venózní pupečníkové krvi. Koncentrace celkového plazmatického cysteinu (t-Cys) a celkového plazmatického homocysteinu (t-Hcy) jsou nižší v arteriální pupečníkové krvi v porovnání s pupečníkovou krví venózní [130]. Z toho lze usuzovat, že se tyto aminothyoly dostávají do fetální cirkulace a jsou následně využity plodem k biosyntéze glutathionu a proteinů. Zatímco homocystein přestupuje přes fetomaternální bariéru po směru koncentračního spádu, cystein je transportován proti koncentračnímu gradientu a tudíž pravděpodobně aktivním transportem [130]. U dospělého člověka vzniká cystein z methioninu přes homocystein v transsulfurační cestě jeho metabolizmu. U novorozence, a to i donošeného, je však aktivita cystathionin γ–lyázy, která štěpí cystathion na cystein, nedostatečná pro pokrytí fyziologických potřeb [4]. Tato nedostatečná aktivita je ještě výraznější u novorozenců nedonošených [133]. Cystein je tak považován za pro novorozence aminokyselinu podmíněně esenciální (tj. esenciální za určitých podmínek) [134]. Ve fetální tkáni mozku a jater nebyla nalezena aktivita cystathionin γ–lyasy potřebné k štěpení cystationinu na cystein [4]. Bez zajímavosti není ani to, že v placentární tkáni nebyla nalezena aktivita ani cystathionin γ–lyasy ani cystationin β–synthasy nutné k syntéze cystationinu z homocysteinu. Z toho lze usuzovat, že krytí spotřeby cysteinu fetálními tkáněmi k syntéze glutationu a

proteinů může být zcela závislé na dodávce cysteinu z mateřské cirkulace a cystein tak může být pro plod aminokyselinou zcela esenciální. To koresponduje s výsledky zpracování našich dat. Sestavili jsme regresní model závislosti celkového plazmatického cysteinu na dalších sledovaných faktorech tzv. vysvětlujících veličinách u netěhotných žen. U netěhotných žen se nám podařilo sestavit dobrý model s vysokým koeficientem determinace. Naproti tomu pro těhotné v druhém trimestru je model podstatně méně kvalitní, má velmi nízký koeficient determinace. U těhotných ve třetím trimestru již nebylo možno model sestavit vůbec. Předpokládáme tedy, že spotřeba cysteinu plodem je chybějící vysvětlující veličinou. Tuto hypotézu podporuje i to, že s rostoucím plodem a tedy pravděpodobně rostoucí spotřebou cysteinu, a tedy rostoucím vlivem spotřeby cysteinu plodem na hladinu celkového plazmatického cysteinu u těhotné, se zhoršuje kvalita modelu sestaveného ze sledovaných vysvětlujících veličin.

V literatuře je v těhotenství popsána korelace homocysteinu a hematokritu [3]. Metaanalýza studií hodnotících změny plazmatického volumu a hematokritu v těhotenství prokázala asi 40% nárůst plazmatického volumu během těhotenství [159]. Tento nárůst resp. hemodiluce může mít vliv na pokles aminothiolů v plazmě. Anderson a kolektiv prokázali vliv těhotenské hemodiluce na hladinu homocysteinu [160]. Testovali jsme tedy, zda pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu mezi druhým a třetím trimestrem není závislý na hematokritu. Nejprve jsme testovali prostou závislost hladiny celkového plazmatického cysteinu na hematokritu. Hladina celkového plazmatického cysteinu nekorelovala s hematokritem ani v druhém, ani v třetím trimestru. Dále jsme testovali, zda rozdíl hladin celkového plazmatického cysteinu mezi druhým a třetím trimestrem není závislý na změně hematokritu mezi těmito trimestry. Ani rozdíl hladiny plazmatického t-Cys v druhém a třetím trimestru však nekoreloval s rozdílem hematokritu ve druhém a třetím trimestru. Vliv hemodiluce na pokles cysteinu mezi druhým a třetím trimestrem jsme tedy neprokázali.

Powers et al. prokázali vyšší renální exkreci homocysteinu v těhotenství v porovnání s exkrecí mimo těhotenství a signifikantní inverzní korelaci mezi hladinou celkového plazmatického homocysteinu a renálním vylučováním homocysteinu [161]. Změna v renální exkreci cysteinu může být obdobná jako u homocysteinu, neboť cystein je stejně jako homocystein filtrován do primární moči a reabsorbován v proximálním tubulu stejným transportérem jako homocystein. Pro testování hypotézy, že pokles cysteinu v těhotenství může být dán jeho zvýšeným renálním vylučováním jsme provedli samostatnou studii. Analizovali jsme 60 vzorků moči a plazmy: 20 vzorků těhotných žen v 19.-21. týdnu těhotenství, 20 vzorků těhotných žen v 30.-32. týdnu těhotenství a 20 vzorků žen netěhotných. Inkluzní a exkluzní kritéria byla stejná jako v prospektivní studii těhotných žen. Rozdíl celkového cysteinu v moči přepočítaný na clearance creatininu byl porovnán nepárovým t testem. Neprokázali jsme signifikantní rozdíl mezi renální exkrecí cysteinu ve druhém trimestru v porovnání s trimestrem třetím ($p=0,35$). Data z naší studie tedy nepodporují hypotézu, že by pokles hladiny cysteinu v krvi těhotných v třetím trimestru oproti trimestru druhému byl způsoben vyšší renální exkrecí cysteinu ve třetím trimestru oproti trimestru druhému. Dále jsme nepárovým t testem porovnali rozdíl celkového cysteinu v moči přepočítaný na clearance creatininu u těhotných versus netěhotných žen. Renální exkrece cysteinu u těhotných byla signifikantně vyšší než u netěhotných ($p<0,05$). Naše data tedy podporují hypotézu, že na poklesu celkového plazmatického cysteinu v těhotenství má podíl vyšší renální exkrece cysteinu v těhotenství než mimo něj.

Porovnáním dat z naší prospektivní studie těhotných a dat z jiné předchozí studie netěhotných žen jsme prokázali pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu u těhotných žen v porovnání s ženami netěhotnými. Pokles hladiny cysteinu v těhotenství oproti stavu mimo těhotenství byl již v literatuře publikován Raijmarkersem a kolektivem [27]. Hladiny všech sledovaných aminothiolů byly signifikantně nižší u normotenzních těhotných v porovnání s netěhotnými ženami.

Hladina celkového plazmatického cysteinu těhotných žen byla 75% hodnoty u netěhotných, celkového plazmatického homocysteinu 61%, cysteinylglycinu 77% a glutationu 54% [27]. Tato studie však byla provedena na velmi malém souboru 10 netěhotných žen a 10 těhotných kontrol. Těhotné ženy byly ve velmi různém stáří těhotenství (29. až 38. týden těhotenství). V naší studii bylo zařazeno 62 normotanzních těhotných a 63 žen netěhotných. Na našich datech jsme tedy s větší silou než v již publikovaných datech potvrdili signifikantní pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu u těhotných žen oproti ženám netěhotným.

Homocystein je nezávislým rizikovým faktorem rozvoje aterosklerózy [19]. Otázka kauzalizy a eventuelního mechanizmu zapojení homocysteinu v patogenezi vaskulárního poškození však není uspokojivě zodpovězena. Experimentální studie poukazují na roli thiolových skupin v oxidačně redukční homeostáze buněk [100,101]. Pokud by role thiolových skupin byla patognomická, pak by obdobným mechanizmem mohly působit i jiné látky nesoucí tyto thiolové skupiny. Cystein je stejně jako homocystein aminothiol a jeho koncentrace v plasmě je asi 20 krát vyšší než homocysteinu (kolem 250μmol/l) [102]. Ačkoliv existují studie prokazující vyšší hladinu cysteinu u pacientů s atrosklerotickým postižením cév mozku, sdrce i periferie [98,95], cystein pravděpodobně není nezávislý rizikový faktor aterosklerózy [99]. Na druhé straně ve studiích vztahu homocysteinu s patologickými stavy je trvalá i transientní hyperhomocysteinémie asociována s komplexními změnami v hladině celkového plazmatického cysteinu i ostatních aminothiolů [98,103,104]. Proto by hyperhomocysteinémie neměla být nahlížena izolovaně, ale spíše jako součást iteraktivního redox-thiolového systému [102], jehož narušení může vést k vaskulárnímu poškození.

Celkový plazmatický homocystein (t-Hcy) je v těhotenství signifikantně nižší něž mimo něj [9]. Vyšší koncentrace homocysteinu jsou asiciovány se závažnými těhotenskými komplikacemi jako jsou preeklampsie [26,27,28,29,30], rozštěpy neurální trubice (NTD) [32,41,42,43,45,46,50], rozštěpy rtu s nebo bez rozštěpu patra [118,119,120], vrozené srdeční vady [120], abrupce placenty

[31,90,91,92], opakované těhotenské ztráty [66,88,89], hluboká žilní trombóza [54], růstová retardace plodu (IUGR) a nitroděložní úmrtí plodu [110,111] a další komplikace. Cystein má podobnou strukturu a chemické vlastnosti jako homocystein, ale vztahu cysteinu a těhotenských komplikací se dosud věnovala pouze mála pozornost. Závislost hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotných a těhotenských komplikací byla dosud studován pouze v cross-sectional nebo retrospektivních studiiích [27,30,129]. V těchto studiích byla prokázána vyšší hladiny plazmatického t-Cys u žen s rozvinutou preeklampsií oproti těhotným bez preeklampsie [27]. V Hordalandské homocysteinové studii byly hladiny celkového plazmatického cysteinu u téměř čtyřech tisíc žen ve věku 40-42 let porovnány s výsledky jejich těhotenství resp. s komplikacemi jejich těhotenství v minulosti. Asociace mezi hladinou celkového plazmatického cysteinu a těhotenskými komplikacemi (preeklampsií, předčasným porodem, velmi nízkou porodní hmotností) byla mnohem slabší než u homocysteinu. Při analýze kombinace cysteinu a homocysteinu a jejich vztahu k těhotenským komplikacím se však ukázalo, že zvýšená hladina celkového plazmatického homocysteinu je rizikovým faktorem pro rozvoj preeklampsie, předčasného porodu a růstové retardace plodu pouze tehdy, je-li zároveň zvýšen i celkový plazmatický cystein [129]. Není tedy vyloučeno, že v etiopatogenezi těchto těhotenských komplikací hraje roli homocystein zároveň s cysteinem.

Cystein je intermediálním produktem ireversibilní transsulfurační cesty degradace homocysteinu. Cystein má schopnost autooxidace, tedy produkce peroxidu a volných radikálů, čímž může hrát roli ve vzniku oxidativního stresu, který je v současnosti považován za důležitý patofyziologický princip podílející se na rozvoji preeklampsie [136,137]. V našem souboru 65 prospektivně sledovaných žen se vyskytly 3 ženy, které následně rozvinuly preeklampsii. Klinický obraz preeklampsie se u všech třech těchto žen rozvinul po 38. týdnu těhotenství. Nutná indukce porodu tak neměla za následek iatrogenní prematuritu. Všechny tři plody byly eutrofické, bez projevu růstové retardace plodu (IUGR). U těhotných nedošlo

k žádným klinickým projevům komplikací preeklampsie. Vzhledem k hodnotám krevního tlaku a klinickým projevům bychom tedy tyto tři případy hodnotili jako projev mírné preeklampsie. Počet případů preeklampsie v naší studii byl příliš malý na statistické zhodnocení, přesto jsme se pokusili o analýzu jejich dat. Hodnoty plazmatického t-Cys u třech těhotných s preeklampsií jsme interpolovali na kvartilový graf plazmatického t-Cys u fyziologických těhotných (obr. 5). V druhém trimestru byly hodnoty žen s následnou preeklampsií rozloženy v celém intervalu resp. napříč všemi kvartily. Ve třetím trimestru však hodnoty všech těchto těhotných s preeklampsií posunuly do horního kvartilu hodnot fyziologických těhotných. Na podkladě toho jsme vyslovili hypotézu, že nárůst nebo nedostatečný pokles cysteinu v průběhu těhotenství může být rizikovým faktorem následného rozvoje preeklampsie.

Cystein vzniká z homocysteinu za účasti enzymu cystationin β–syntházy, která homocystein konvertuje na serin a cystationin, který je dále metabolizován na cystein. Druhou cestou metabolizmu homocysteinu je transsulfurace zpět na methionin. Rajkovic publikoval hypotézu, že elevace homocysteinu při preeklampsii je dána poruchou funkce cystationin β–syntházy a tedy poruchou konverze homocysteinu na cystein [151]. To však příliš neodpovídá datům publikovaným Raijmakersem, který prokázal statisticky signifikantní korelaci hladiny celkového plazmatického cysteinu a homocysteinu nejen v normotenzním těhotenství, ale i v těhotenství komplikovaném preeklampsií [27]. V úvahu tedy připadá porucha v remetilaci homocysteinu na methionin. Tato metabolická cesta je závislá na dostatečném přísunu vitamínu B_{12} a kyseliny listové. Jejich nedostatečný přísun by tedy mohl mít za následek zvýšení hladiny homocysteinu při preeklampsii. Tuto hypotézu však nepodporují data publikovaná v původní Rajkovicově studii, ve které nebyl prokázán signifikantní rozdíl hladiny vitamínu B12 a kyseliny listové u normotenzních těhotných versus těhotných s preeklampsií [151]. Další publikovanou teorií nárůstu hladiny homocysteinu u těhotných žen s preeklampsií je redukce plazmatického volumu, která může v závažných

případech dosahovat až 40% [159]. Redukce plazmatického volumu na hodnoty odpovídající stavu mimo těhotenství by odpovídala nárůstu hladiny homocysteinu na hodnoty mimo těhotenství [27]. U těhotných s následným rozvojem preeklampsie v naší studii došlo ve třetím trimestru k vzestupu nebo menšímu poklesu celkového plazmatického cysteinu než u normotenzních žen. I přesto průměrná hodnota plazmatického t-Cys ve třetím trimestru u těhotných s následným rozvojem preeklampsie v našem souboru (207,1 μmol/l) nedosahovala hodnot netěhotných v našem kontrolním souboru (260,7 μmol/l), ani hodnot publikovaných [27] u preeklamptiček (254 μmol/l).

V naší studii jsme prokázali pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu těhotných žen oproti ženám netěhotným. Dále jsme prokázali signifikantní pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu mezi druhým a třetím trimestrem. Vytvořili jsme regresní model závislosti celkového plazmatického cysteinu na sledovaných potenciálně vysvětlujících veličinách u netěhotných žen. Při aplikaci tohoto modelu u těhotných jsme zjistili, že kvalita tohoto modelu s progresí stáří těhotenství klesá. Dle statistického zpracování se ukázalo, že v modelu těhotných žen chybí vysvětlující veličina, jejíž důležitost v modelu narůstá s progresí stáří těhotenství. Vyslovili jsme hypotézu, že touto vysvětlující veličinou je plod pro nějž je pravděpodobně cystein aminokyselinou podmíněně esenciální nebo zcela esenciální a s růstem plodu narůstá jeho spotřeba cysteinu a tudíž se zvyšuje vliv této vysvětlující veličiny v modelu resp. se toto projeví narůstajícím poklesem hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotné ženy. U třech z 65 sledovaných žen došlo k rozvoji mírné preeklampsie. U dvou z těchto žen došlo mezi druhým a třetím trimestrem k nárůstu hladiny celkového plazmatického cysteinu, u třetí těhotné byl, oproti těhotným bez preeklampsie, pokles hladiny celkového plazmatického cysteinu pouze minimální. Vyslovili jsme hypotézu, že že nárůst hladiny celkového plazmatického cysteinu resp. jeho nedostatečný pokles v průběhu těhotenství může předcházet klinické známky preeklampsie a hrát roli v etipatogenezi této závažné těhotenské

komplikace. Pro potvrzení této hypotézy a případného zhodnocení efektivity stanovování celkového plazmatického cysteinu jako časného laboratorního markeru preeklampsie je však třeba dalších studií.

VII. Závěry

Fyziologická těhotenství

1. Stanovili jsme hodnoty celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotných v 19.-21. týdnu těhotenství a v 30.-31. týdnu těhotenství.

2. Prokázali pokles celkového plazmatického cysteinu v krvi normotenzních těhotných ve třetím trimestru oproti trimestru druhému.

3. Sestavili jsme lineární regresní model hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi těhotných žen. Vyslovili jsme předpoklad, že konzumpce cysteinu plodem může být chybějící vysvětlující veličinou v námi sestavovaném lineárním regresním modelu hladiny celkového plazmatického cysteinu a cystein může být pro plod esenciální aminokyselinou.

Těhotné versus netěhotné

~~1.~~1. Ověřili jsme, že hladina celkového plazmatického cysteinu u těhotných je signifikantně nižší než u netěhotných.

Naformátováno: Odrážky a číslování

Preeklampsie

~~3.~~1. Porovnali jsme hladiny celkového plazmatického cysteinu v krvi normotenzních těhotných a těhotných s následným rozvojem preeklampsie. Vyslovili jsme hypotézu asociace nárůstu nebo nedostatečného poklesu hladiny celkového plazmatického cysteinu v průběhu těhotenství s rizikem následného rozvoje preeklampsie.

Naformátováno: Odrážky a číslování

VIII. Příloha

Párové t testy porovnání hladin aminothiolů ve druhém a třetím trimestru. (příloha ke kapitole 5.1.)

1) pro cystein

Ho: mean(cyctein20 - cystein30) = mean(diff) = 0

	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	95%Conf.	Interval
Cys 20	192,0797	2,741745	21,05974	186,5915	197,5679
Cys 30	176,9356	2,484591	19,0845	171,9621	181,909
diff	15,14407	3,325784	25,54583	8,486787	21,80135
t-value	4,5535				

Pravděpodobnost toho, že studentovo t nabude hodnoty 4.5535 nebo vyšší, pokud platí hypotéza Ho (mean =0), je 0.000 tj. nulová hypotéza, že rozdíl hladiny cysteinu v druhém a třetím trimestru je roven nule byla zamítnuta.

2) pro cysteinylglycin

Ho: mean(cystglycin20 - cystglycin30) = mean(diff) = 0

	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	95%Conf.	Interval
Cys-Gly 20	31,20915	0,725222	5,570536	29,75746	32,66084
Cys-Gly 30	31,99492	0,696411	5,349232	30,6009	33,38893
diff	-0,78576	0,95433	7,330345	-2,69606	1,124536
t-value	-0,8234				

Pravděpodobnost toho, že studentovo t nabude absolutní hodnoty 0.8234 nebo vyšší, pokud platí hypotéza Ho (mean =0), je 0.4137, tj. nelze zamítnout nulovou hypotézu, tj. cysteinylglycin může být ve druhém trimestru stejný jako v trimestru třetím.

3) pro homocystein

Ho: mean(homocystein20 - homocystein30) = mean(diff) = 0

	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	95%Conf.	Interval
Hcy 20	4,969492	0,149072	1,145042	4,671092	5,267891
Hcy 30	4,769492	0,149971	1,151948	4,469292	5,069691
diff	0,2	0,174114	1,337393	-0,14853	0,548527
t-value	1,1487				

Pravděpodobnost toho, že studentovo t nabude absolutní hodnoty 1.1487 nebo vyšší, pokud platí hypotéza Ho (mean =0), je 0.2554, tj. nelze zamítnout nulovou hypotézu, tj. homocystein může být ve druhém trimestru stejný jako v trimestru třetím.

.

4) pro glutathion

Ho: mean(glutathion20 - glutathion30) = mean(diff) = 0

	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	95%Conf.	Interval
GSH 20	8,281356	0,204986	1,574525	7,871032	8,691679
GSH 30	8,028814	0,238555	1,832377	7,551294	8,506333
diff	0,252542	0,275381	2,115245	-0,29869	0,803778
t-value	0,9171				

Pravděpodobnost toho, že studentovo t nabude absolutní hodnoty 0.9171 nebo vyšší, pokud platí hypotéza Ho (mean =0), je 0.3629, tj. nelze zamítnout nulovou hypotézu, tj. homocystein může být ve druhém trimestru stejný jako v trimestru třetím.

IX. Publikační činnost

MUDr. Hana Belošovičová (rozená Víšková)

VÍŠKOVÁ H, VESELÁ K, JANOŠÍKOVÁ B, KRIJT J, VÍŠEK JA, CALDA P. Plasma cysteine concentrations in uncomplicated pregnancies. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2007, vol.22, no. 4, s. 254-258.
IF=0,761

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Ultrazvukové vyšetření v termínu porodu. In CALDA P. *Ultrazvuková diagnostika v těhotenství*. Praha: Aprofema s.r.o., 2007. 90-95 s.

VÍŠKOVÁ H, CALDA P, ŽIŽKA Z, VANĚČKOVÁ M, HOZA D, ZUNTOVÁ A. Prenatal Diagnosis of Occipital Dermal Sinus Associated with Hemangioma Using Ulttrasound and MRI. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2006, vol. 21, s. 232-234.
IF=0,761

ŽIŽKA Z, CALDA P, FAIT T, HAAKOVÁ L, KVASNIČKA J, VÍŠKOVÁ H. Prenatally diagnosable differences in the cellular immunity of fetuses with Down's and Edwards' syndrome. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2006, vol. 21, s. 510-514.
IF=0,761

CALDA P, VÍŠKOVÁ H, BEZDÍČKOVÁ D, ZIMA T. Prenatální diagnostika v prvním trimestru gravidity v klinické praxi. *Časopis Lékařů českých*, 2006, roč. 145, č. 7, s. 575-577.

CALDA P, VÍŠKOVÁ H. Screening vrozených vývojových vad a Downova syndromu v prvním trimestru těhotenství. *Nemocnice*, 2006, č. 5, s. 10-12.

CALDA P, VÍŠKOVÁ H. Ultrazvuk v diagnostice hypoxie plodu. *Moderní Gynekologie a Porodnictví*, 2005, roč. 14, č. 3, s. 383-392.

CALDA P, VÍŠKOVÁ H, DRAHORÁDOVÁ P, ŽIŽKA Z. Outcome of gestation after selective feticide of one malformed fetus in the second trimester of pregnancy. In Book of abstracts, Atheny, 2005, s. 23-23.

CALDA P, VÍŠKOVÁ H. Příliš mnoho možností jak screenovat populaci na výskyt Downova syndromu - aneb jak invazivní diagnostika ovlivňuje výsledky prenatální péče (Kontroverze v gynekologii a porodnictví.). *Moderní Gynekologie a Porodnictví*, 2004, roč. 13, č. 1, s. 118-120.

VÍŠKOVÁ H, VACKOVÁ J, VRÁNOVÁ V, CALDA P. Jsou informace, které poskytujeme těhotným ženám před invazivním prenatálním vyšetřením, dostatečné? *Česká gynekologie*, 2004, roč. 69, č. 1, s. 33-36.

VÍŠKOVÁ H, CALDA P, ŽIŽKA Z, JIRÁSEK JE, KOFER J, GERYCH P. Trombocytopenia with absent radius (TAR) syndrome – four consecutive pregnancies in one family. *Clin. Pract. Rev.*, 2004, vol. 5, s.254-257.

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Indikace a výkony prenatální diagnostiky v osmi centrech v České republice v letech 2002-2003. *Česká Gynekologie*, 2004, roč. 69, č. 5, s. 352-357.

CALDA P, VÍŠKOVÁ H. Monitoring of amniocentesis use in the czech population. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2003, roč. 18, . Suppl. 1, s. 39-40. (abstrakt)

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Prenatální screening a diagnostika nejčastějších patologií plodu. *Moderní Gynekologie a Porodnictví*, Roč. 12, č. 2 (2003), s. 239-248.

KOUCKÝ M, CALDA P, ŽIŽKA Z, VÍŠKOVÁ H. Nosní kost ve screeningu Downova syndromu (Konference gynekologů zabývajících se ultrazvukovou diagnostikou. Olomouc, 26.-27.9.2003. *Gynekolog*, 2003, roč. 12, č. 4 s. 180-180. (abstrakt)

VÍŠKOVÁ H, CALDA P, ŽIŽKA Z, JIRÁSEK JE, KOFER J, GERYCH P. TAR syndrom - čtyři po sobě jdoucí těhotenství v jedné rodině (Konference gynekologů zabývajících se ultrazvukovou diagnostikou. Olomouc, 26.-27.9.2003. *Gynekolog*, 2003, roč. 12, č. 4, s. 185-185. (abstrakt)

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Prenatální screening vrozených vývojových vad plodu. *Moderní Gynekologie a Porodnictví*, 2002, roč. 11, č. 2, s. 166-173.

CALDA P, ŽIŽKA Z, VÍŠKOVÁ H. Ultrazvuková diagnostika a léčba plodu. In PAŘÍZEK A, et al. *Porodnická analgezie a anestezie*. Praha: Grada , 2002. s. 66-71.

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Benzydamin a možnosti jeho využití v gynekologii. *Moderní Gynekologie a Porodnictví*, 2001, roč.10, Suppl.č. 3, s. 376-381.

VÍŠKOVÁ H, CALDA P. Benzydamin a možnosti jeho využití v gynekologii. (3. sjezd SSG ČR, Brno, květen 2001. Abstrakta.) *Praktická Gynekologie,* 2001, roč. 5, č. 5, s. 8-9.

X. Seznam zkratek a vzorců

AdoHcy	adenosylhomocystein
AdoMet	adenosylmethionin
AHCY	S-adenosylhomocysteinhydroláza
BMI	body mass index
BHMT	betain-homocysteinmethyltransferáza
CBS	cystationin β–syntháza
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
CMP	cévní mozková příhoda
CTH	cystathionin γ–lyáza
Cys	cystein
CH3- FH4	methylentetrahydrofolát
EDTA	ethylen-diamin-tetraoctová kyselina (ethylene diamine tetraacetic acid)
FH4	tetrahydrofolát
GSH	glutathion
Hcy	homocystein
HELLP	syndrom hemolýzy, zvýšených jaterních enzymů a nízkých trombocytů (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IUGR	intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation)
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
MAT	methionin-adenosyltransferáza
Met	methionin
MTR	methionin syntáza
MTRR	methionin syntáza reduktáza
MTHFR	methylentetrahydrofolát reduktáza

ns	nesignifikantní
NTD	rozštěpy nervové trubice (neural tube defects)
oGTT	orální glukózový toleranční test
OR	odds ratio
PDXK	pyridoxalkináza
PI	pulsatilní index
PIH	těhotenstvím indukovaná preeklampsie (pregnancy induced hypertension)
Tau	taurin
t-Cys	celkový cystein (total cysteine)
t-Cys-Gly	celkový cysteinylglycin (total cysteinylglycine)
t-Hcy	celkový homocystein (total homocysteine)
VLBW	novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností (pod 1500g) (very low birth weight)

XI. Literatura

1) MURPHY MM, SCOTT JM, McPARTLIN JM, FERNANDEZ-BALLART JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in longitudinal study. *Am J Clin Nutr*, 2002, roč. 76: s.614-9.
2) ESKES TKAB. Homocystein and human reproduction, In: CARMEL R, JACOBSEN DW, editors. *Homocysteine in Health and Disease.* Cambridge: Cambridge University Press, 2001. s. 451-465.
3) HEINECKE JW: Unique Aspects of Sulphur Chemistry: Homocysteine and Lipid oxidation. In: CARMEL R, JACOBSEN DW, editors. *Homocysteine in Health and Disease.* Cambridge: Cambridge University Press, 2001. s. 32-39.
4) GAULL G, STURMAN JA, RAIHA NC: Development of mammalian sulphur metabolism: absence of cystationase in human fetal tissues. *Pediatr Res*, 1972, vol. 6, s. 538-47.
5) COUGHTRIE MW et al. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact*, 1998, vol. 109(1-3), s. 3-27.
6) HUXTABLE RJ. The physiological action of taurine. *Physiol Rev,* 1992, vol.101, s.163-172.
7) STURMAN JA. Taurine in development. *Physiol Rev*, 1993, vol. 73, s. 321-333.
8) SCHULLER-LEVIS GB, PARK E. Taurine: new implication for an old amino acid. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, vol. 226, s. 195-202.
9) ANDERSON A, HULTBERG B, BARTTSTROM L, ISAKSSON A. Decrease serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem,* 1992, vol. 30, s. 377-9.
10) STAMAMLER JS, SLIVKA A. Biological chemistry of thiols in vasculature and in vasculatur-related disease. *Nutr Rev,* 1996, vol. 54, s. 1-30.
11) FINKELSTEIN JD. Metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr*, 1998, vol.157 Suppl, s.40-4.
12) MEISTER A. Glutathion metabolism and its selective modification. *J Biol Chem,* 1988, vol. 263, s. 205-8.
13) ARRIC BA, NATHAN CF. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review. *Cancer Res,* 1984, vol. 44, s. 4224-32.
14) WILCKEN DEL, WILCKEN B. Historical Overview and Recent Perspectives. In Carmel R, Jacobsen DW: *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press 2001.

15) McCULLY KS. Vascular pathology of homocysteinemia:implication for pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol,* 1969, vol. 56, s. 111-28.
16) MUDD SH, FINKELSTEIN JD, IRREVERRE F, LASTER L. Homocysteinuria: An enzymatic defect. *Science*, 1964, vol. 143, s. 1443-5.
17) WILCKEN DEL, WILCEN B. The pathogenesisn of coronary artery disease. A possible role of methionin methabolis. *J Clin Invest*, 1976, vol. 57, s. 1079-82.
18) BOUSHEY CJ, BERESFORD SA, OMENN GS, MOTULSKY AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA,* 1995, vol. 274, s. 1049-57.
19) REFSUM H, UELAND PM, NYGARD O, VOLLSET SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, 1998, vol. 49, s. 31-62.
20) NYGARD O, NORDREHAUG JE, REFSUM H, UELAND PM, FARSTAD M, VOLLSET SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1997, vol. 337, s. 230-36.
21) ROSENQUIST TH, RATASHAK SA, SELHUB J. Homocysteine induced congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, s. 15227-32.
22) D'ANGELO A, SELHUB J. Homocysteine and tromboembolic disease. *Blood*, 1997, vol.90, s. 1-11.
23) JOOSTEN E, LESAFFRE E, RIEZLER R, GHEKIERE V, DEREYMAEKER L, et al. Is metabolic eviedence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 1998, vol. 52, s. 76-79.
24) BELL IR, EDMAN JS, SELHUB J, MORROW FD, MARBY DW, et al. Plasma homocysteine in vascular disease and in nonvascular dementia of depressed elderly people. *Acta Psychiatr Scand*, 1992, vol. 86, s. 386-90.
25) RIGGS KM, SPIRO A, TRUCKER K, RUSH D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the normative aging study. *Am J Clin Nutr*, 1996, vol. 63, s. 306-14.
26) DEKKER GA, DE VRIES JI, DOELITZSCH PM, HUIJGENS PC, VON BLOMBERG BM, JACOBS C, VAN GEIJN HP. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, vol. 173, s. 1042-8.
27) RAIJMAKERS MTM, ZUSTERZEEL PLM, STEEGERS EAP, HECTORS MPC, DEMACKER PNM, PETERS WHM. Plasma Thiol Status in Preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 2000, vol. 95, s. 180-184.
28) LOPEZ-QUESADA E, VILASECA MA, LAILLA JM. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eu J Obstet Gynecol Repr Biol*, 2003, vol. 108, s. 45-49.

29) HIETALA R, TURPEINEN U, LAATIKAINEN T. Serum homocysteine at 16 weeks and subsequent preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 2001, vol. 97, s. 527-9.
30) RAIJMAKERS MTM, ZUSTERZEEL PLM, ROES EM, STEEGERS EAP, MULDER TPJ, PETERS WHM. Oxidized and free whole blood thiols in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 2001, vol. 97, s. 272-276.
31) GODDIJN-WESSEL TA, WOUTERS MG, VAN DE MOLEN EF, SPUIJGROEK MD, STEEGERS-THEUNISSEN RP, BLOM HJ, BOERS GH, ESKES TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996, vol. 66, s. 23-9.
32) STEEGERS-THEUNISSEN RP, BOERS GH, TRIJBELS FJ, FINKELSTEIN JD, BLOM HJ, THOMAS CM, BORM GF, WOUTERS MG, ESKES TK. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism*, 1994, vol. 43, s. 1475-80.
33) DE BREE A, VERSCHUREN WWM, BLOM HJ, KROMHOUT D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in general population sample. *Am J Epidemiol*, 2000, vol. 154, s. 150-4.
34) WEIR DG, SCOTT JM. Homocysteine as risk factor for cardiovascular and related disease: nutritional implications. *Nutr Rev*, 1998, vol. 1, s. 311-38.
35) BELLAMY MF, MCDOWELL IF. Putative mechanism for vascular damage by homocysteine. *J Inherit Metab Dis*, 1997, vol. 20, s. 307-15.
36) DEKKER GA, SIBAI BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concept. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, vol. 179, s. 1359-75.
37) JAUNIAUX E, WATSON AL, HEMPSTOCK J, BAO YP, SKEPPER JN, BURTON GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, 2000, vol. 157, s. 2111-22.
38) DUARTE NL, WANG XL, WILCKEN DE. Effect of anticoagulant and time of plasma separation on measurement of homocysteine. *Clinical Chemistry*, 2002, vol. 48, s. 665-668.
39) CANDITO M, BEDOUCHA P, GIBELIN P et al. Fasting, postprandial, and post-methionine-load homocysteinemia and methylentetrahydrofolate reductase polymorphism in vascular disease. *Journal of Inhereted Metabolic Disease*, 1999, vol. 22, s. 588-92.
40) SULBERBERG J, DUDMAN N. Methionin loading. In Carmel R, Jacobsen DW: *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press 2001.
41) No authors listed. Prevention of neural tube defects: result of the medical research council vitamin study. MRC vitamin study restudy research group. *Lancet*, 1991, vol. 338, s. 131-37.

42) CZEIZEL AE, DUAS I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Nex England Journal of Medicine*, 1992, vol. 327, s. 1832-35.
43) LUMLEY J, WATSON L, WATSON M, BOWER C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). *The Cochrane Library Issue 3*, Oxford: Update Software, 2002.
44) AUBARD Y, DARODES N, CANTALOUBE M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy – review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol and reprod Biol*, 2000, vol. 93, s. 157-65.
45) ESKES TK. Open or clodes? A world of difference: a history of homocysteine research. *Nutr Rev*, 1998, vol. 56, s. 236-44.
46) MILL JL, MCPRTLIN JM, KIRKE PN. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet*, 1995, vol. 345, s. 149-51.
47) ZHAO W, MOSLEY BS, CLEVES MA, MELNYK S, JAMES SJ, HOBBS CA. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocystein, and glutathione metabolism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, vol. 76, s. 230-6.
48) STEIN Z, SUSSER M, SAENPER G, MARROLA F. Famine and human development: *The Dutch hunger winter of 1944-1945*. New York: Oxford University Press 1975.
49) SMITHLESS RW, SHEPPARD S, SCHORAH CJ, SELLER MJ, NEVIN NC, HARRIS R, READ AP, FIELDING DW. Possible prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet*, 1980, vol. 1, s. 339-40.
50) SMITHELLS RW, AHEPARD S, SCHORAH CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*, 1976, vol. 51, s. 944-50.
51) STEEGERS-THEUNISEN RPM, BOERS GHJ, TRIJBELS FJM, FINKELSTEIN JD, BLOM HJ, THOMAS CMG, BORM GF, WOUTERS MGAJ, ESKES TKAB. Maternal hyperhomocysteinemia: A risk factor for neural-tube defects? *Metabolism*, 1994, vol. 43, s. 1475-80.
52) MILLS JL, MCPARTLIN, KIRKE PN, LEE YJ, CONLEY MR, WEIR DG, SCOTT JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*, 1995, vol. 345, s. 149-51.
53) SCOTT JM, MC PARTLIN, MOLLOY A, MCNULTY H, HALLIGAN A, DARLING M, WEIR DG. Folate metabolism in pregnancy. *Adv Exp Med Biol*, 1993, vol. 338, s. 727-732.
54) DEN HEIJER M, KOSTER T, BLOM HJ, BOS GMJ, BRIET E, REITSMA PH, VANDENBROUCKE JP, ROSENDAAL FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-venous trombosis. *N Eng J med*, 1996, vol. 334, s. 759-62.

55) WALKER MC, SMITH GN, PERKINS SL, KEELY EJ, GARNER PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1999, vol. 180, s. 660-64.
56) MALINOV MR, RAJKOVIC A, DUELL PB, HESS DL, UPSAON BM. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocystein suggest a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism. *Obstet Gynecol*, 1998, vol. 178, s. 228-33.
57) CHAMBERS JC, MCGREGOR A, JEAN-MARIE J, KOONER JS. Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Lancet*, 1997, vol. 351, s. 367.
58) WELCH, UPCHURCH G, LOSCALZO J. Hyperhomocysteinemia and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, vol. 811, s. 48-58.
59) RATNOFF OD. Activation of Hageman factor by L-homocysteine. *Science*, 1968, vol. 162, s. 1007-9.
60) RODGERS GM, KANE WH. Activatio of endogenous factor V by homocysteine-induced endothelial cell activatior. *J Clin Invest*, 1986, vol. 77, s. 1909-16.
61) RODGERS GM, CONN MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*, 1990, vol. 75, s. 895-901.
62) SELHUB J, JACQUES PF, BOSTOM AG. Association between plasma homocysteine concentration and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*, 1995, vol.332, s. 286-91.
63) KRIJT J, VACKOVA M, KOZICH V. Measurement of Homocysteine and Other Aminothiols in Plasma: Advatages of Using Tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant ompared with Tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*, 2001, vol.47, s. 1821-28.
64) BURKE G, ROBINSON K, REFSUM H. Intrauterine growth retardarding perinatal death and maternal homocysteinemia levels. *N Eng J Med*, 1991, vol. 326, s. 69-70.
65) DECKKER GR, DEVRIES JJ. Underlying disorders associated with sever onset preeclampsia. *Amer J Obstet Gynecol*, 1995, vol. 173, s. 1042-5.
66) MTIRAOUI N, ZAMMITI W, GHAZOUANI L, BRAHAM NJ, SAIDI S, FINAN RR, ALMAWI W, MAHJOUD. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and chages in homocysteine concentrations in women with idiopatic recurrent pregnancy losses. *Reproduction*, 2006, vol. 131, s. 395-401.
67) HYJÁNEK J, ŽIVNÝ J, DOLEŽAL A, CALDA P, KROFTA L, VINGLEROVÁ H, JENÍČEK J, DVOŘÁKOVÁ J, BOČANOVÁ E, DUDKOVÁ V, DUBSKÁ L, PEJZNOCHOVÁ H, LOUČKA M, MARTINÍKOVÁ V, MACHÁČKOVÁ L, CABRNOCHOVÁ I. Homocysteinemie – její význam v gynekologii a porodnictví. *Čes Gynek*, 2000, vol.65, s. 406-12.

68) ŽIVNÝ J, POMYJE J, FISCHEROVÁ D, PAŘÍZEK A. Fyziologické změny u ženy v těhotenství, v *Porodnická analgezie a anestezie*. Praha: Grada Publishing, 2002. s.51-62.
69) BONNETTE RE, CAUDII MA, BODDIE AM, HUTSON AD, KAUWELL GPA, BAILEY LB. Plasma homocysteine concentrations in pregnant and nonpregnant women with controled folate intake. *Obstet Gynecol*, 1998, vol. 92, s. 167-70.
70) KANG SS, WONG PWK, ZHOU JM, COOK HY. Total homocysteine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. *Metabolism*, 1986, vol. 35, s. 889-91.
71) CAMPBELL J, WATHEN N, PERRY G, SONEJI S, SOURIAL N, CHARD T. The coelomic cavity: An important site of materno-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol*, 1993, vol. 100 s. 765-67.
72) CAMPBELL RP, DAYTON DH, SOHAL GS. Neural tube defects: A review of human and animal studies in the etiology of neural tube defects. *Teratology*, 1986, vol. 34, s. 171-87.
73) VAN DER PUT NMJ, VAD DEN HEUVEL LP, STEEGERS-THEUNISSEN RPM, TRIJBELS FJM, ESKES TKAB, MARIMAN EC, DEN HEIJER M, BLOM HJ. Decreased methylentetrahydrofolate reductase activity due to the 677 C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med*, 1996, vol. 74, s. 691-94.
74) WHITEHEAD AS, GALLAGHER P, MILLS JL, KIRKE JL, BURKE H, MOLLOY AM, WEIR DG, SHIELDS DC, SCOTT JM. A genetic defect in 5,10-methylentetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med*, 1995, vol. 88, s. 763-66.
75) OU CY, STEVENSON RE, BROWN VK, SCHWARTZ CE, ALLEN WP, KHOURY MJ, ROZEN R, OAKLEY GP, ADAMS MJ. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet*, 1996, vol. 63, s. 610-14.
76) SHIELDS DC, KIRKE PN, MILLS JL, RAMSBOTTOM D, MOLLOY AM, BURKE H, WEIR DG, SCOTT JM, WHITEHEAD AS. The "thermolabile" variant of methylanetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotype of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet*, 1999, vol. 64, s. 1045-55.
77) CHRISTENSEN B, ARBOUR L, TRAN P, LECLERC D, SABBAGHIAN N, PLATT R, GILFIX BM, ROSENBLATT DS, GRAVEL RA, FORBES P, ROZEN R. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine syntethase, folate levels in red blood cells and risk for neural tube defects. *Am J Med Genet*, 1999, vol.84, s. 151-57.

78) VAN DER PUT NMJ, ESKES TKAB, BLOM HJ. Is the common 667 C-T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q J Med*, 1997, vol. 90, s. 111-15.
79) VAN DER PUT NMJ, GABREELS F, STEVENSENS, EMB, SMEITINK JAM, BLOM HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*, 1998, vol. 62, s. 1044-51.
80) WEISBERG I, TRAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 1998, vol. 64, s. 169-72.
81) VAN DER PUT NMJ, VAN DER MOLEN EF, KLUIJTMANS LAJ, HEIL SG, TRIJBELS FJM, ESKES TKAB, VAN OPPENRAAIJ-EMMERZAAL D, BANERJEE R, BLOM HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine syntethase: Relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med*, 1997, vol. 90, s. 511-17.
82) RAMSBOTTOM D, SCOTT JM, WEIR DG, KIRKE PN, MILLS JL, GALLAGHER PM, WHITEHEAD AS. Are common mutations of cystationie beta synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet*, 1997, vol. 51, s. 39-42.
83) FOWLER B: Disorder of homocysteine metabolism. *J Inher Metab*, 1997, vol. 54, s. 270-85.
84) VAN DER PUT NMJ, STRAATEN HWM, TRIJBELS FJM, BLOM HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: An overview. *Exp Biol Med Vol*, 2001, vol. 226, s. 243-70.
85) VAN DER PUT NMJ, TRIJBELS FJM, HOL F, ESKES TKAB, STEEGERS-THEUNISSEN RPM, VAN DEN HEUVEL LPWJ, MARIMAN EC, BLOM HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase in sporadic and hereditary spina bifida offspring. In Mato JM, Caballero A Ed: Proceedings of Workshop on Methionine Metabolism, Molecular Mechanism and Clinical Implications. *Consejo Superior de Investigaciones Cientificas*, 1996, s.186-191.
86) STEEGERS-THEUNISSEN R, BOERS G, TRIJBELS F, ESKES T. Neural tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 324, s. 199-200.
87) ROSENQUIST TH, ANDALORO V, MONAGHAN D, SELHUB J. Homocysteine and congenital defects: a role of the NMDA receptor. *Netherlands Journal of Medicine*, 1998, vol.52(supplement), s. S17.
88) COUMANS AB, HIJGENS PC, JAKOBS C et al. Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. *Human Reproduction*, 1999, vol. 14, s. 221-214.

89) NELEN WL, BLOM HJ, STEEGERS EA. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 2000, vol. 74, s. 1196-99.
90) GODDJIN-WESSEL T, WOUTERS M, VANDERMOLEN E et al. Hyperhomocysteinemia – a risk factor for placental abruption or infarction. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 1996, vol. 66, s. 23-29.
91) OWEN EP, HUMAN L, CAROLISSEN AA et al. Hyperhomocysteinemia-a risk factor for abruption placentae. *Journal of Inhereted Metabolic Disease*, 1997, vol. 20, s. 359-62.
92) VAN DER MOLEN E, VERBRUGGEN B, NOVAKOVA L. Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2000, vol. 107, s. 785-91.
93) VAN DER MOLEN E, ARENDS GE, NELEN WL et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, vol. 182, s. 1258-63.
94) RAY JG, LASKIN CA. Folic acide and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, preeclampsia and pregnancy loss: a systemic review. *Placenta*, 1999, vol. 20, s. 519-29.
95) ARAKI A, SAKO Y, FUKUSHIAMA Y, MATSUMOTO M, ASADA T, KITA T. Plasma sulfylhydryl-containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis*, 1989, vol. 79, s. 139-46.
96) JACOB N, BRUCKERT E, GIRAL P, FOGLIETTI G, TURPIN G. Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients. *Aterosclerosis*, 1999, vol. 146, s. 53-59.
97) MILLS BJ, WEISS MM, LANG CA, LIU MC, ZIEGLER C. Blood glutathione and cysteine changes in cardiovascular disea se. *J Lab Clin Med*, 2000, vol. 135, s. 396-401.
98) MANSOOR MA, BERGMARK C, SVARDAL AM, LONNING PE, UELAND PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, vol. 15, s. 232-40.
99) VAN DEN BRANDHOF WE, HANKS K, SCHOUTEN EG, VERHOEFEN P. The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2001, vol. 157, s. 403-9.
100) STAMLER JS, SLIVKA A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev*, 1996, vol. 54, s. 1-30.
101) HEINECKE JW, ROSEN H, SUZUKI LA, CHAIT A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of

low density lipoprotein by arterial smooth muscle cell. *J Biol Chem*, 1987, vol. 262, s. 10098-103.
102) UELAND PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem*, 1995, vol. 41, s. 340-2.
103) MANSOOR MA, GUTTORMSEN AB, FISKERSTRAND T, REFSUM H, UELAND PM, SVARDAL AM. Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that followa homocysteine administration. *Clin Chem*, 1993, vol. 39, s. 980-5.
104) MANSOOR MA, SVARDAL AM, SCHNEEDE J, UELAND PM. Dynamic relatio between reduced, oxidised, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem*, 1992, vol. 38, s. 1316-21.
105) EL-KHAIRY L, UELAND PM, NYGARD O, REFSUM H, VOLLSET SE. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, 1999, vol. 70, s. 1016-24.
106) WOUTERS MG, BOERS GH, BLOOM HJ et al. Hyperhomocysteinémia: a risk factor in women with unexpected recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*, 1993, vol. 60, s. 820-5.
107) QUERE I, BELLET H, HOFFER M, JANBON C, MARES P, GRIS JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril*, 1998, vol. 69, s. 152-4.
108) HAGUE WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2003, vol. 17, s. 459-69.
109) STEEGERS-THEUNISSEN RP, WATHEN NC, ESKES TK, VAN RAAIJ-SELTEN B, CHARD T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. *Br J Obstet Gynecol*, 1997, vol. 104, s. 20-4.
110) DE VRIES JLP, DEKKER GA, HUIJGENS PC, JAKOBS C, BLOMNERG BME, VAN GEIJN HP. Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997, vol. 104, s. 1248-54.
111) BURKE G, ROBINSON K, REFSUM H, DRUMM J, GRAHAM I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *New J Med*, 1992, vol. 43, s. 1475-80.
112) HAYES JD, MCLELLAN LI. Glutathione and glutathione dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 1999, vol. 31, s. 273-300.
113) QUIG D: Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev*, 1998, vol. 3, s. 262-270.

114) DE FLORA S, IZZOTTI A, D'AGOSTINI F, BALANSKY RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, 2001, vol. 22, s. 999-1013.
115) ZHANG SM, WILLETT WC, SELHUB J, MANSON JE, COLDITZ GA, HANKINSON SE. A prospective study of plasma total cysteine and risk of Breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , 2003, vol. 12, s. 1188-93.
116) Zrušit JONES DP, CARLSON JL, SAMIEC PS, STERNBERG P, MODY VC, REED RL, BROWN LA. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivates by HPLC. *Clin Chem Acta*, 1998, vol. 275, s. 175-184.
117) Zrušit SMITH CV, HANSEN TN, MARTIN NE, MCMICKEN HW, ELLIOT SJ. Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatr Res*, 1993, vol. 34, s. 360-65.
118) VAN ROOIJ IA, SWINKELS DW, BLOM HJ, MERKUS HM, STEEGERS-THEUNISSEN RP. Vitamin and homocystein status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, vol. 189, s. 1155-60.
119) WONG WY, ESKES TK, KUIJPERS-JAGTMAN AM, SPAUWEN PH, STEEGERS EA, THOMAS CM, HAMEL BC, BLOM HJ, STEEGERS-THEUNISSEN RP. Nonsyndromic orofacial clefts: asspciation with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*, 1999, vol. 60, s. 253-7.
120) VERKLEIJ-HAGOORT A, BLIEK J, SAYED-TABATABAEI F, URSEM N, STEEGERS E, STEEGERS-THEUNISSEN R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymofphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet*, 2007, vol. 143, s. 952-60.
121) RAO AK, KAPLAN R, SHETH S. Inherited trombophilic states. *Semin Tromb Hemost*, 1998, vol. 24, s. 3-12.
122) FALCON CR, CATTANEO M, PANZERI D, MARTINELLI I, MANNUCCI PM. High Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous trombosis. *Arterioscler Thromb*, 1994, vol. 14, s. 1080-3.
123) DEN HEIJER M, BLOM HJ, GERRITS WBJ et al. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet*, 1995, vol. 345, s. 882-5.
124) Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with follic acid based suplements: metaanalysis of randomised trials. *British Medical Journal*, 1998, vol. 316, s. 894-98.

125) WARD M, MCNULTY H, MCPARTLIN J, STRAIN JJ, WEIR DC, SCOTT JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowerd by physiological doses of folic acid. *Quarterly Journal of Medicine*, 1997, vol. 90, s. 519-24.
126) UBNIC JB, VERMMAK WJH, VAN DER MERWE A, BECKER PJ, DELPORT R, POTGIETER HC. Vitamin requirements for treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *Journal of Nutrition*, 1994, vol. 124, s. 1927-33.
127) MC KINLEY MC, MC NULTY H, MC PARTLIN J, STRAIN JJ, PENTIEVA K, WARD M, WEIR DG, SCOTT JM. Low dose vitamin B6 effectively lowers fasting homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavine replete. *Am J Clin Nutr*, 2001, vol. 73, s. 759-64.
128) QUINLIVAN EP, MCPARTLIN J, MCNULTY H, WARD M, STRAIN JJ, WEIR DG, SCOTT JM. Importance of both folic acid and vitamin B 12 in reduction of risk of vasculat disease. *Lancet*, 2002, vol. 359, s. 227-28.
129) EL-KHAIRY L, VOLLSET ES, REFSUM H, UELAND PM. Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, 2003, vol. 77, s. 467-72.
130) RAIJMAKERS MTM, ROES EM, STEEGERS EAP, VAN DER WILDT B, PETERS WHM. Umbilical cord and maternal plasma thiol concentrations in normal pregnancy. *Clinical Chemistry*, 2001, vol. 47, s. 749-751.
131) KIM MH, KIM E, PASSEN EL, MEZER J, KANG SS. Cortisol and estradiol. Nongenetic factors for hyperhomocysteinemia. *Metabolism*, 1997, vol. 46, s. 247-9.
132) CHIEN PF, SMITH K, WATT PW, SCRIMGEOUR CM, TAYLOR DJ, RENNIE MJ. Protein turnover in the human fetus studied at term using stable isotope tracer amino acids. *Am J Physiol*, 1993, vol. 265, s. 31-5.
133) VINA J, VENTO M, GARCIA SALA F, PUERTES IR, GASCO E, SASTRE J et al. L-cysteine and glutathione metabolism are impared in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr*, 1995, vol. 61, s. 1067-9.
134) SOGHIER LM, BRION LP. Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supůementation in parenterally fed neonates. *The Cochrane Library*, 2006, vol. 4, s. 1-27.
135) EL-KHAIRY L, VOLLSET SE, REFSUM H, UELAND PM. Plasma total cysteine, pregancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, 2003, vol. 77, s. 467-72.
136) HUBEL CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, vol. 222, s. 222-235.

137) DAVIDGE ST. Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*, 1998, vol. 16, s. 65-73.
138) YU CK, LAKASING L, PAPAGEORGHIOU AT, SPENCER K, NICOLAIDES KH. Uterine artery Doppler and mid-trimester plasma homocysteine in subsequent pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2004, vol. 16, s. 134-9.
139) ARULKUMARAN S, SYMONDS IM, FOWLIE A. Oxford handbook of obstetrics and gynaecology. *Oxford University Press*, 2004, s. 181-184.
140) FOLEY MR, STRONG T jr., GARITE TJ. *Obstetric intensive care manual*. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2004.
141) PAPAGEORGIOU AT, YU CK, CICERO S et al. Second trimester uterine artery Doppler screening in unselected populations: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2002, vol. 12, s. 78-88.
142) BERSINGER NA, SMARASON AK, MUTTUKRISHNE S, et al. Women with preeklampsia have increased serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin A, activin A and soluble E-selectin. *Hypertens Pregnancy*, 2003, vol. 22, s. 45-55.
143) FLORIO P, REIS FM, PEZZANI I, et al. The addition of activin A and inhibin A to uterine artery Doppler velocimetry to improve the early prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2003, vol. 21, s. 165-9.
144) HANKEY GJ, EIKELBOOM JW: Homocysteine and vascular disease. *Lancet*, 1999, vol. 354, s. 407-13.
145) STRUHLINGER MC, TSAO PS, HER JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 2001, vol. 104, s. 2569-75.
146) ZITTOUN J, ZITTOUN R. Modern clinical testing strategie in cobaltamine and folate deficiency. *Semin Hematol*, 1999, vol. 36, s. 35-46.
147) MCMULLIN MF, YOUNG PB, BAILIE KE, et al. Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamine B12 deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol*, 2001, vol. 23, s. 161-5.
148) RAY JG, LASKIN CA. Folic acide and homocystein metabolic defects and risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: systematic review. *Placenta*, 1999, vol. 20, s. 519-29.
149) WANG J, TRUDINGER BJ, DUARTE N, et al. Elevated homocysteine levels in placental diseases snd associated preeclampsia. *Br J Obstet Gynecol*, 2000, vol. 107, s. 935-8.
150) SANCHEZ SE, ZHANG C, RENE MM, et al. Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine concentrations in pre-eclamptic and normotensive Peruvian women. *Am J Epidemiol*, 2001, vol.153, s. 474-80

151) RAJKOVIC A, CATALANO P, MALINOW MR. Elevated homocystein levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 1997, vol. 90, s. 168-71.
152) SORENSEN TK, MALINOW MR, WILLIAMS MA, et al. Elevated second trimester serum homocysteine levels and subsequent risk of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, 1999, vol. 48, s. 98-103.
153) COTTER AM, MOLLOY AM, SCOTT JM, DALY SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, vol. 185, s. 781-5.
154) PAPAGEORGHIOU AT, YU CK, ERASMUS IE, CUCKLE HS, NICOLAIDES KH. Assesment of risk for the development of pre-eclampsia by maternal characteristics and uterine artery Doppler. *Br J Obstet Gynecol*, 2005, vol. 112, s. 703-9.
155) VOLLSET SE, REFSUM H, IRGENS LM, EMBLEM BM, TVERDAL A, GJESSING HK, MONSEN ALB, UELAND PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr*, 2000, vol. 71, s. 962-8.
156) COTTER AM, MOLLOY AM, SCOTT JM, DALY SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of nonsevere pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, vol. 189, s. 391-4.
157) HAMPEL FR, RONCHETTI EM, ROUSUEEUW PJ, STAHLER WA. *Robust Statistics - The Approach Based on Influence Functions*. New York: J.Wiley and Son. 1986.
158) VÍŠEK JÁ. The least trimmed squares. Sensitivity study. *Proceedings of the Prague Stochastics 2006,* eds. Hušková M, Janžura M. Matfyzpress. s. 728-738.
159) CHESLEY LC. Plasma and red cell volumes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1972, vol. 112, s. 440-50.
160) ANDERSON A, HULTBERG B, BRATTSTORM L, ISAKSSON A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1992, vol. 30, s. 377-9.
161) POWERS RW, MAJORS AK, KERCHNER LJ, CONRAD KP. Renal handling of homocysteine during normal pregnancy and preeclampsia. J Soc Gynecol Investig, 2004, vol. 11, s. 45-50.

Glutation je nejsilnější intracelulární antioxidant a má též důležitou roli v detoxikaci [112,113]. Využití glutationu v epidemiologických studiích je limitováno tím, že naměřená plazmatická hodnota je značně ovlivněna metodikou zpracování vzorku (odběr, zpracování a uchovávání vzorku). I minimální hemolýza (0,1-1%) může způsobit značně vyšší hodnoty glutationu, neboť koncentrace glutationu v erytrocytech je asi 500 krát vyšší než v plazmě [116]. Kromě toho vzorky krve musí být odebírány do zkumavky s činidlem bránícím autooxidaci a enzymatické degradaci glutationu [116,117].

Cys

Hcy

Hcy^2

Hcy^3

157) *biochemie od Hanky 1*;
158) *biochemie od Hanky 2*;
~~157)~~159) *biochemie od Hanky 3*;
~~158)~~160)
~~159)~~161)

Naformátováno: Odrážky a číslování

V době, kdy jsme se studii prováděli a publikovali její výsledky neexistovala publikovaná data prospektivního sledování hladiny cysteinu v krvi těhotných. Dostupné byly pouze case control studie těhotných s rozvinutým patologickým stavem jako preeklampsie [27] a dále byly publikovány retrospektivní studie hodnotící závislost hladiny cysteinu u netěhotných žen a rizika některých patologických stavů v jejich předchozím těhotenství (abrupce placenty,

předčasného porodu, nízké porodní hmotnosti, mrtvorozenosti, novorozenecké úmrtnosti a vrozených vývojových vad) [129].

PE výsledky

Ze třech pozorování nelze učinit žádný statisticky signifikantní závěr, nicméně je přinejmenším pozornostihodné, že hodnoty všech následných preeklamptiček se ve třetím trimestru posunuly do horního kvartilu. To naznačuje, že nárůst nebo nedostatečný pokles cysteinu v průběhu těhotenství je rizikem pro následný rozvoj preeklampsie.