

MTA Doktori Értekezés Tézisei

**Angiogén és immunológiai tényezők vizsgálata
prae eclampsia-ban**

Dr. Molvarec Attila

Semmelweis Egyetem

I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika



Budapest

2016

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Célkitűzések	5
3. Betegek és vizsgálati módszerek.....	8
4. Eredmények és megbeszélés	16
5. Az új tudományos eredmények összefoglalása	32
6. Saját közlemények jegyzéke	36
7. Tudósmetria adatok	47
8. Köszönetnyilvánítás	48

1. Bevezetés

A praeclampsia a „nagy szülészeti szindrómák” közé tartozik, és az anyai és perinatális morbiditás és mortalitás egyik vezető oka még a fejlett országokban is. Definíciója folyamatosan változott az elmúlt években. Jelenleg a legszélesebb körben elfogadott, a tudományos vizsgálatokban is használt diagnosztikai kritériuma a terhesség 20. hete után újonnan jelentkező hipertónia, amit szignifikáns proteinuria kísér. A krónikus hipertónia talaján kialakult praeclampsias állapotot ráakódásos praeclampsia néven különítjük el. A praeclampsia több mint terhesség-indukálta hipertónia, a humán terhességre specifikus kórkép az egész anyai szervezetet érintő többszervi megbetegedés. A kórkép definitív megoldása a terhesség befejezése, a magzat és a méhlepény világra segítésével. Globális incidenciáját 4,6%-ra becsülik: legalacsonyabb a Kelet-Mediterrán WHO régióban 1,0%-kal, míg legmagasabb az Afrikai régióban 5,6%-kal. A praeclampsia késői kezdetű formája (≥ 34 . terhességi hét) jóval gyakoribb, mint a korai kezdetű praeclampsia (< 34 . hét). A fejlett országokban incidenciája az utóbbi években emelkedő tendenciát mutat, ami összefüggésbe hozható a hajlamosító tényezők, úgymint a krónikus hipertónia, a diabetes és az obezitás gyakoribbá válásával.

Bár az eclampsit már 4000 évvel ezelőtt az egyiptomi Petrie (Kahun)-papiuszban is megemlítették, a világszerte zajló intenzív kutatás ellenére a praeclampsia kóreredete és patogenezise máig nem tisztázott teljes mértékben. Számos epidemiológiai adat utal arra, hogy az anyai-magzati (apai) immunológiai maladaptatio elsődleges szerepet játszhat a praeclampsia kialakulásában. A leginkább elfogadott elmélet szerint a praeclampsia kialakulása két lépcsőben történik. Az első, preklinikai lépcső a terhesség első felében a kóros placentáció, ami a terhesség második felében a praeclampsia anyai tünetegyüttesének létrejöttéhez (klinikai fázis, második lépcső) vezet.

A praeclampsia első, preklinikai fázisában a trophoblast invázió folyamata gátolt, a lepényi ágy spirális artériáinak 30-50%-a nem alakul át alacsony rezisztenciájú uteroplacentaris erekké, a fennmaradó részükben a „remodelling” pedig csak a deciduális szegmentumban figyelhető meg. A praeclampsia kialakulásának második lépcsőjében a kóros placentáció az uteroplacentaris keringés elégtelenségén keresztül lepényi hipoxiához/ischaemiához, illetve intermittáló reperfúzió révén lepényi oxidatív stresszhez vezet. A praeclampsias terhesek egy részében a spirális artériákban egy obstruktív lézió, akut atherosclerosis (deciduális vaszkulopátia) figyelhető meg, ami a gyakran társuló spirális artéria

trombózissal együtt tovább rontja a placentáris perfúziót. A placentáris oxidatív stressz, valamint a társuló endoplazmás retikulum és gyulladásos stressz hatására a méhlepényből az anyai keringésbe kerülő különböző faktorok vezetnek a praeclampsia anyai tünetegyütteséhez. Ez utóbbit egy anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció jellemzi, amelynek központi eleme a leukociták és az endothelsejtek aktivációja. A szisztémás endothelsejt aktiváció, illetve diszfunkció következménye generalizált vazokonstrikció hipertóniával, az érpermeabilitás fokozódása ödémák kialakulásával, a vesében glomeruláris endotheliosis proteinuriával, az erekben a trombociták és az alvadási rendszer aktiválódása mikrotrombusok képződésével. A generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakciót szisztémás oxidatív stressz, valamint egy akut fázis reakció kíséri a pozitív akut fázis fehérjék emelkedett, míg a negatív akut fázis fehérjék csökkent szintjével, és metabolikus változásokkal is együtt jár (dyslipidaemia, inzulinrezisztencia).

Praeclampsziában az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció, illetve a generalizált endothelsejt diszfunkció létrejöttében számos trophoblast-eredetű faktor szerepet játszhat. A méhlepény fokozott mennyiségben termel pro-inflammatorikus citokineket praeclampsziában. Emellett a corticotrop releasing hormon (CRH), az aktivin A és a leptin keringésben mért koncentrációja is emelkedett praeclampsziában, és ezek mindegyike pro-inflammatorikus hatással rendelkezik. A placenta élettani terhességben úgynevezett trophoblast-törmeléket bocsát az anyai keringésbe apoptózis eredményeként és ez a folyamat praeclampsziában fokozott. A trophoblast-törmelék syncytiotrophoblast mikrovezikulumokat, citokeratin fragmentumokat, valamint magzati DNS-t és RNS-t tartalmaz. A syncytiotrophoblast mikrovezikulumok pro-inflammatorikus tulajdonságúak és képesek közvetlen módon károsítani az endothelsejteket.

A praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős szisztémás gyulladásos válaszreakció központi eleme a generalizált endothelsejt diszfunkció. Egyre növekvő mennyiségű kísérletes és klinikai adat támasztja alá, hogy kialakulásában az anyai keringésben található angiogén és anti-angiogén faktorok közötti egyensúly felborulása fontos szerepet játszik. A szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) az Flt-1 receptor (a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (VEGF-A) és a placentáris növekedési faktor (PlGF) endothelialis receptora) keringésben természetesen előforduló formája, ami az Flt-1 transzkriptum alternatív hasítása útján jön létre, az intracelluláris és transzmembrán Flt-1 domének delécióját eredményezve. Az sFlt-1 nagy affinitással köti meg és antagonizálja a keringésben található angiogén VEGF-A-t és PlGF-t. Az sFlt-1 fokozott lepenyi expresszióját figyelték meg praeclampsziában, a vérkeringésben található sFlt-1 koncentrációjának emelkedését eredményezve, mely szülést

követően normalizálódott. Az emelkedett szérumsFlt-1 koncentráció az anyai keringésben kimutatható szabad VEGF-A és PlGF csökkent szintjével társult. A praeclampsia szérumban található többlet sFlt-1 *in vitro* az angiogenezis zavarát eredményezte, amit exogén VEGF-A és PlGF hozzáadása helyreállított. Az sFlt-1 gátolta továbbá a patkány vese arteriolák VEGF-A és PlGF által kiváltott relaxációját. Mindezeken túlmenően vemhes patkányoknak adott sFlt-1 adenovírus vektor a praeclampsiaat fémjelző hipertóniához, proteinuriához és glomeruláris endotheliosishoz vezetett. Másrészt a rekombináns VEGF-A vagy PlGF kezelés enyhítette a praeclampsia sFlt-1 overexpressziójával kísérleti állatokon kiváltott tüneteit. A keringésben található sFlt-1 szintjének emelkedése és a szabad PlGF szintjének csökkenése hetekkel megelőzi a praeclampsia klinikai tüneteinek megjelenését.

Praeclampsiaiban az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció egy fontos sajátossága az egészséges terhességre jellemző Th2-irányú eltolódás elmaradása és a Th1-típusú immunitás túlsúlya. Saito és munkatársai közölték először, hogy praeclampsiaiban a perifériás vérben a Th1 sejtek gyakorisága és a Th1/Th2 arány szignifikánsan magasabb, míg a Th2 sejtek gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb, mint a szövődménymentes terhesség harmadik trimeszterében. Saito munkacsoportja egy másik tanulmányban a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) megnövekedett interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ és tumor nekrosis faktor (TNF)- α termelését, valamint a vérnyomás átlagértéke és a Th1-típusú citokinek koncentrációja közötti pozitív korrelációt figyelte meg praeclampsiaiban. A Th1-típusú immunitás túlsúlyát praeclampsiaiban a perifériás vér T (helper és citotoxikus) és NK sejtjeiben intracelluláris citokinek mérésével foglalkozó más tanulmányok, valamint praeclampsias terhesek perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek citokin szekréciójának meghatározása is megerősítette.

A praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakció kialakulásában a perifériás vérben található Th1 és Th2 sejtek egyensúlyának felborulása mellett a regulátoros T sejtek csökkent prevalenciája is szerepet játszhat. Számos közleményben számoltak be alacsonyabb regulátoros T sejt gyakoriságról praeclampsias terhesek perifériás vérében, mint egészséges terhes nőkben. Továbbá a regulátoros T sejtek funkcionális aktivitásának csökkenését is megfigyelték praeclampsiaiban. Sasaki és munkatársainak eredményei szerint a regulátoros T sejtek prevalenciája nemcsak a perifériás vérben, hanem a deciduában is alacsonyabb praeclampsiaiban, mint szövődménymentes terhességben. Ugyanakkor olyan tanulmányokat is közöltek, amelyekben nem találtak szignifikáns különbséget a praeclampsias és egészséges terhesek perifériás vérében található regulátoros T sejtek gyakoriságában.

2. Célkitűzések

1. Célunk volt annak vizsgálata, hogy a praeclampsia esetén emelkedett szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) és csökkent placentáris növekedési faktor (PlGF) szérumszint mutat-e összefüggést a betegek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, különös tekintettel a szisztémás gyulladás (C-reaktív protein), endothel-aktiváció (von Willebrand faktor antigén), endothel-sérülés (fibronektin), oxidatív stressz (malondialdehid), valamint trophoblast-törmelék (szabad magzati DNS) markereire.
2. A „betegágy melletti” PlGF gyorseszteszt diagnosztikus hatékonyságának és prognosztikai értékének vizsgálata a terhességi hipertóniák minden formájában.
3. A PlGF gyorseszteszt és a magzati flowmetria összehasonlítása a kedvezőtlen magzati kimenetel (koraszülés, intrauterin növekedési retardáció) azonosításában magas vérnyomással szövődött terhességekben.
4. A vérplazma ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif, member 13) aktivitásának, von Willebrand faktor antigén szintjének és a von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata praeclampsziában.
5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampsziában.
6. A keringésben található citokinek, kemokinek és adhézis molekulák koncentrációjának átfogó módon történő meghatározása nagy teljesítményű multiplex szuszpenziós array technológiával praeclampsziában. Továbbá annak vizsgálata, hogy a citokinek, kemokinek és adhézis molekulák szérumszintje milyen összefüggést mutat a betegek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, különös tekintettel a szisztémás gyulladás, endothel-aktiváció, endothel-sérülés, oxidatív stressz, valamint trophoblast-törmelék markereire.
7. A szérum leptin koncentráció összefüggésének vizsgálata praeclampsziás terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, különös tekintettel a C-reaktív proteinre, a keringésben található citokinekre, kemokinekre, adhézis molekulákra és angiogén faktorokra.
8. Annak vizsgálata, hogy praeclampsia esetén a 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) emelkedett szérumszintje mutat-e összefüggést a betegek klinikai jellemzőivel, standard laboratóriumi paramétereivel, valamint a szisztémás gyulladás,

- endothel-aktiváció, endothel-sérülés, oxidatív stressz és trophoblast-törmelék markereivel.
9. Annak megállapítása, hogy praeclampsia esetén az emelkedett szérum Hsp70 szint összefüggésben áll-e a citokinek, kemokinek, adhézios molekulák és angiogén faktorok keringésben mért koncentrációival.
 10. A humán Hsp60, mycobacterialis Hsp65 és humán Hsp70 elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampsiaiban.
 11. A komplementrendszer klasszikus, lektin és alternatív úton történő szisztémás aktiválódásának vizsgálata praeclampsiaiban.
 12. A vérplazma fikolin-2 és fikolin-3 szintjének meghatározása praeclampsiaiban, és összefüggésük vizsgálata a betegek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, különös tekintettel a kórkép patogenezisében szerepet játszó folyamatok markereire, a komplement aktivációs komplexekre és fragmentumokra, valamint az angiogén faktorokra.
 13. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (VEGF-A) expressziójának vizsgálata praeclampsiaiban.
 14. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata praeclampsiaiban.
 15. A perifériás vérben található citotoxikus T sejtek és NK sejtek intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata praeclampsiaiban.
 16. A perifériás vérben található IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának meghatározása praeclampsiaiban.
 17. A perifériás vérben található konvencionális ($CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+$) és nem konvencionális ($CD4^+ CD25^- FoxP3^+$) regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata praeclampsiaiban.
 18. A perifériás vérben található regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának meghatározása praeclampsiaiban.
 19. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziójának vizsgálata praeclampsiaiban.
 20. Az anandamid szérumszintjének meghatározása praeclampsiaiban.
 21. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsiaiban.
 22. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsiaiban és HELLP-szindrómában.

23. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata praeeclampsia-ban.

3. Betegek és vizsgálati módszerek

3.1. A vizsgálatokban részt vevő terhes és nem terhes nők

A vizsgálatok résztvevői a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, valamint a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályának páciensei közül kerültek ki. Mindegyik résztvevő a kaukázusi rasszhoz tartozott és a Közép-Magyarország régióban lakott. Kizárási kritérium volt a többes terhesség, a diabetes mellitus, az autoimmun megbetegedések, angiopátiák, vesebetegségek, az anyai vagy magzati fertőzés és a magzati fejlődési rendellenességek. A vizsgálatok éhgyomorra történtek, a terhesek közül egyiknél sem volt megindult szülés vagy idő előtti burokrepedés észlelhető. Az egészséges nem terhes nők egyike sem részesült hormonális fogamzásgátló kezelésben, és a vizsgálatok a menstruációs ciklusuk korai follikuláris fázisában (a 3. és 5. ciklusnap között) történtek.

A terhességi hipertóniák klasszifikációját a National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy és az American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2002-es definíciójának megfelelően végeztük. A praeeclampsia kritériumának a korábban normotóniás terheseknél a 20. terhességi hét után jelentkező magas vérnyomást (legalább hat óra különbséggel ≥ 2 alkalommal ≥ 140 Hgmm szisztolés vagy ≥ 90 Hgmm diasztolés vérnyomás) és fehérjevizelést ($\geq 0,3$ g/24h vagy ≥ 1 + a vizelet gyorseszten húgyúti fertőzés nélkül) tekintettük. Minden praeeclampsziás résztvevő normotóniássá vált a szülést követő 12. hétig. A praeeclampsziát súlyosnak tekintettük, ha bármelyik a következő kritériumok közül teljesült: ≥ 160 Hgmm szisztolés vagy ≥ 110 Hgmm diasztolés vérnyomás, proteinuria ≥ 5 g/24h (vagy ≥ 3 + a vizelet gyorseszten), trombocitopenia, emelkedett májenzim értékek, oliguria/anuria, szubjektív tünetek (tartós fejfájás, látászavar, epigastriális vagy jobb bordaív alatti fájdalom) vagy tüdőödéma. A HELLP-szindróma diagnózisa a jellemző laboratóriumi eltéréseken alapult (trombocitaszám < 150 G/l, szérum GOT és GPT aktivitás > 70 E/l, LDH aktivitás > 600 E/l). Korai kezdetű praeeclampsziáról akkor beszéltünk, ha annak tünetei a betöltött 34. terhességi hét előtt léptek fel. Gesztációs hipertóniát akkor diagnosztizáltunk, ha a korábban normotóniás terheseknél a 20. terhességi hét után magas vérnyomás jelentkezett fehérjevizelés nélkül. Krónikus hipertóniát akkor állapítottunk meg, ha a magas vérnyomás a terhesség előtt is fennállt, vagy ha az a 20. terhességi hét előtt jelentkezett, illetve ha szülés után 12 héttel is emelkedett vérnyomás értékeket mértünk. Ráakódásos praeeclampsziáról akkor beszéltünk, ha

a krónikus hipertónia talaján a 20. terhességi hét után fehérjevizelés jelent meg. Az intrauterin növekedési retardáció (IUGR) diagnózisát akkor állítottuk fel, ha a magyarországi születési súlypercentilis táblázat alapján az újszülött születési súlya az adott terhességi korra és nemre vonatkozó 10 percentilis értéket nem érte el.

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatás-értékelési Bizottsága jóváhagyta (TUKEB 177/1999, 52/2008, 188/2008, 184/2013), és előzetes tájékoztatást követően minden résztvevő írásban hozzájárulását adta a vizsgálatok elvégzéséhez. Tudományos vizsgálatainkat a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően végeztük.

3.2. A biológiai minták levétele, előkészítése és tárolása

A vérmintákat alkari vénapunkcióval vettük le natív, valamint EDTA és nátrium-citrát antikoagulánsokat tartalmazó kémcsövekbe. Ezt követően a mintákat szobahőmérsékleten 10 percig 3000 *g*-vel centrifugáltuk. A szérumot és plazmát -80 °C-on, míg az EDTA-val alvadásigátolt vérmintákból származó buffy coat-ot -20 °C-on tároltuk a vizsgálatok elvégzéséig.

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) lítium-heparinos kémcsőbe levett friss vérből sűrűség-grádiens centrifugálással izoláltuk. A sejteket foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldattal kétszer átmostuk, majd RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk. Ha a vizsgálatokra később került sor, a sejteket 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó magzati borjú savóban -80 °C-on tároltuk azok elvégzéséig.

A lepényi mintákat közvetlenül császármetszést követően vettük a köldökzsinór eredése és a lepény széli része közötti területről, elkerülve az infarctusos és meszes régiókat. A lepényi minta egy darabját fixálás nélkül műanyag csőbe helyeztük, és -80 °C-on tároltuk a vizsgálatok elvégzéséig. A minta másik részét 10%-os formalin oldattal 4 napig fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk.

3.3. A szérum sFlt-1 és PlGF koncentráció meghatározása

A szérum össz sFlt-1 és biológiailag aktív PlGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay útján határoztuk meg Cobas e 411-es analizátoron.

3.4. A vérplazma PlGF koncentrációjának meghatározása „betegágy melletti” gyorseszteszt segítségével

Az EDTA-val antikoagulált plazmaminták szabad PlGF szintjének meghatározása az Alere Triage PlGF gyorseszteszttel történt a gyártó utasításainak megfelelően. Az eszköz mérési tartománya 12–3000 pg/ml. A 12 pg/ml alatti értékek a vizsgáló számára a kijelzőn a „<12 pg/ml” jelzéssel jelennek meg. A teszt a gyártó javaslata alapján a betöltött 35. terhességi hét előtt alkalmazható.

3.5. A vérplazma ADAMTS13 aktivitásának meghatározása

Az ADAMTS13 aktivitás meghatározása a FRET-S-VWF73 fluoreszcens szubsztrát hasításából eredő fluoreszcencia kinetikus mérésével történt citrátos plazmamintákban. Az eredményeket 10 egészséges véradó poolozott plazmájában mért aktivitás százalékos arányában adtuk meg.

3.6. A vérplazma von Willebrand faktor antigén szintjének meghatározása

A von Willebrand faktor antigén szintjét citrátos plazmából ELISA (enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat) módszer segítségével határoztuk meg, kereskedelmi forgalomban kapható antitestek segítségével. Az eredményeket 10 egészséges véradó poolozott plazmájában mért érték százalékos arányában adtuk meg.

3.7. A von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata

A von Willebrand faktor multimer mintázatának meghatározása nátrium-dodecilszulfát (SDS)-agaróz gél elektroforézis útján történt EDTA-val antikoagulált plazmamintákban. A kvantitatív multimer analízist GS-800 denzitométeren QuantityOne szoftver alkalmazásával végeztük, és az eredményt a nagy multimerek (>20 mer) százalékos arányában adtuk meg.

3.8. A szérum citokin, leptin és a plazma oszteopontin szintek vizsgálata

Az interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, interferon (IFN)- γ , tumor nekrozis faktor (TNF)- α , interferon- γ -indukált protein (IP)-10, monocita kemotaktikus protein (MCP)-1, intercelluláris adhézios molekula (ICAM)-1 és vaszkuláris sejtadhézios molekula (VCAM)-1 szérum szintjeit multiplex szuszpenziós array útján Bio-Plex 200 analízátor segítségével mértük meg. A

szérum IL-17A, transzformáló növekedési faktor (TGF)- β 1, leptin és a plazma oszteopontin szintjeit ELISA módszerrel határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően.

3.9. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének meghatározása

A Hsp70 (HSPA1A) szérumszintjét az R&D Systems ELISA kitjével határoztuk meg.

3.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása

Az anti-Hsp70 (HSPA1A), anti-Hsp60 és anti-Hsp65 IgG antitestek szérumszintjét ELISA módszerrel mértük meg. Az antitest koncentrációt önkényes egység/ml-ben (Arbitrary Unit – AU/ml) adtuk meg, melyet a vizsgált antitesteket magas koncentrációban tartalmazó humán szérum hígítási sorából készített standard görbe alapján számoltunk ki.

3.12. A komplementrendszer vizsgálata

A C1rC1sC1-INH komplex plazmaszintjét ELISA módszerrel mértük meg. A minták C1rC1sC1-INH tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 ml hígítatlan, hőaggregált IgG-vel aktivált normál humán szérum C1rC1sC1-INH tartalmának).

A C3bBbP aktivációs komplex plazmaszintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A minták C3bBbP tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 ml hígítatlan, zimozánnal aktivált normál humán szérum C3bBbP tartalmának).

Az MBL (mannóz-kötő lektin)-MASP-2 (MBL-asszociált szerin proteáz 2) komplex aktiválhatóságának mértékét Petersen és munkatársai C4-depozíció alapuló módszere alapján határoztuk meg, kisebb módosításokkal. Az egyes mintákban a mannán hatására mért MBL-MASP-2 aktiválhatóság mértékét (melyet az elhasított exogén C4 mennyiségével jellemeztünk) a normál humán szérumra jellemző érték százalékában fejeztük ki.

A C4d, C3a és SC5b9 koncentrációját EDTA-s plazmamintákban a Quidel cég ELISA kitjeivel, míg a fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjét a Hycult Biotech cég ELISA kitjeivel határoztuk meg, a gyártó útmutatása szerint.

3.13. A szérum C-reaktív protein (CRP) koncentráció meghatározása

A szérum CRP szinteket ultraszenzitív, latex szemcsékkel érzékenyített immunoturbidimetriás eljárással mértük meg Cobas Integra 800 automatán a gyártó által forgalmazott kittel.

3.14. A vérplazma szabad magzati DNS mennyiségének meghatározása

Fiú újszülöttek esetén az anyai plazmából szilícium-dioxid adszorpció módszerrel kivontuk a DNS-t, ezt követően meghatároztuk a szabad magzati DNS mennyiségét az Y kromoszóma szex-determináló régiójának (SRY) kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciójával (PCR). A plazmamintában jelenlevő szabad magzati DNS mennyiségének meghatározásához ismert koncentrációjú férfi genomiális DNS-el készített standard hígítási görbét használtunk.

3.15. A vérplazma malondialdehid és fibronectin szintjének meghatározása

A vérplazma malondialdehid szintjét tiobarbiturát alapú kolorimetriás eljárás útján mértük meg. A plazma fibronectin koncentrációkat nefelometria segítségével határoztuk meg a gyártói leírásnak megfelelően.

3.16. A limfociták intracelluláris VEGF-A, galektin-1 és granulizin expressziójának vizsgálata

A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A, galektin-1 és granulizin expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg. A mérést FACSCalibur áramlási citométeren végeztük, és az eredményeket CellQuest Pro szoftver segítségével értékeltük ki.

3.17. Az IL-17A-termelő limfociták, a Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata

A vizsgálatokat a perifériás vérből frissen izolált mononukleáris sejteken áramlási citometriával végeztük. Az intracelluláris citokin meghatározáshoz a perifériás vér mononukleáris sejtjeit forbol-mirisztát-acetáttal és ionomicinnel stimuláltuk brefeldin A jelenlétében 4 órán át, 37 °C-on 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférán. A Th1 sejtek kimutatására a CXCR3, míg a Th2 sejtek azonosítására a CCR4 sejt felszíni kemokin receptor markert használtuk. A mérést BD FACSAria áramlási citométeren végeztük, és az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

3.18. A konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek, valamint a regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának vizsgálata

A perifériás vérben található konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek, valamint a regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciáját áramlási citometriával

határoztuk meg. A mérést BD FACSAria áramlási citométeren végeztük. Az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

3.19. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziójának vizsgálata

A Western blot mérést a chorionlemeztől a basalis lemezig terjedő, teljes vastagságú blokkokon végeztük a CB1, CB2 és FAAH teljes lepényi expressziójának meghatározása céljából. A specifikus sávokat a mintákkal párhuzamosan futtatott egér here homogenátummal és színes molekulásúly markerekkel azonosítottuk. A Western blottal kapott denzitási értékeket GELDOC 1.00-UV rendszerrel kvantifikáltuk. A denzitometriás egységben levő specifikus sávok jeleit ugyanazon membrán megfelelő mitogén-aktivált protein kináz 1 (MAPK1) sáv denzitási jelének értékével korrigáltuk. A CB1, CB2 és FAAH sávok normalizált értékeit a normál placentából nyert értékek átlagának százalékában fejeztük ki.

Az immunhisztokémiai (IHC) festést Leica BOND-MAX rendszerrel, Bond Polimer Refine Detection kit felhasználásával végeztük. Pozitív kontrollként humán kisagyi szövetet használtunk. A metszetekről készült képeket AxioCam ICc 1 kamerával felszerelt Zeiss AxioImager A2 mikroszkóppal készítettük 200x-os és 400x-os nagyítás mellett, AxioVision fényképező és képfeldolgozó szoftver segítségével.

3.20. Az anandamid szérumszintjének meghatározása

A szérum anandamid szinteket nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) technikával határoztuk meg.

3.21. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata

A genomiális DNS-t a buffy coat-ból fenol-kloroform extrakcióval izoláltuk. Polimeráz láncreakcióval egy 255 bázispár hosszúságú, a polimorf lókuszokat tartalmazó fragmentumot amplifikáltunk egy 5'-CAG GGT TAT GTG GCA ATG AC-3' szenz és egy 5'-TAC CTA TAA AAA TGA CAA AAT GAA AT-3' antiszenz primerrel. A PCR terméket, ami az ösztrogén receptor α (ESR1) gén 1-es intronjának egy részét tartalmazta, PvuII és XbaI restrikciós endonukleázzal emésztettük 37 °C-on egy éjszakán át. A hasítási termékek a következők voltak: 255 bázispár (C allél) vagy 97+158 bázispár (T allél) és 255 bázispár (G allél) vagy 142+113 bázispár (A allél). A hasítási termékeket 3%-os agaróz gélen futattuk

meg és etídium-bromiddal festettük. Az értékelés ultraibolya (UV) fénnel való megvilágítással történt.

3.22. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata

A genomiális DNS-t a buffy coat-ból a Miller és munkatársai által 1988-ban leírt kisózásos módszerrel izoláltuk. PCR módszerrel egy 220 bázispár hosszúságú DNS szakaszt sokszorozítottunk meg egy 5'-ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG-3' szenz és egy 5'-AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG-3' antiszenz primerrel. Az amplifikált PCR terméket NcoI restrikciós endonukleázzal emésztettük 37 °C-on egy éjszakán át. A kapott fragmentumok 220 bázispár (A allél) vagy 202+18 bázispár (G allél) hosszúságúak voltak. A hasítási termékeket 2%-os agaróz gélen futattuk meg és etídium-bromiddal festettük. Az értékelés ultraibolya (UV) fénnel való megvilágítással történt.

3.23. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata

A genomiális DNS-t a buffy coat-ból kisózásos módszerrel izoláltuk. A polimeráz láncreakciót az Asp299Gly polimorfizmus esetében egy 5'-GAT TAG CAT ACT TAG ACT ACT ACC TCC ATG-3' szenz és egy 5'-GAT CAA CTT CTG AAA AAG CAT TCC CAC-3' antiszenz primerrel, míg a Thr399Ile polimorfizmus esetében egy 5'-GGT TGC TGT TCT CAA AGT GAT TTT GGG AGA A-3' szenz és egy 5'-CCT GAA GAC TGG AGA GTG AGT TAA ATG CT-3' antiszenz primerrel végeztük. A PCR termékeket NcoI és HinfI restrikciós endonukleázzal emésztettük 37 °C-on egy éjszakán át. A hasítási termékek a következők voltak: 249 bázispár (A allél) vagy 226+23 bázispár (G allél) és 406 bázispár (C allél) vagy 377+29 bázispár (T allél). A hasítási termékeket 2%-os agaróz gélen futattuk meg és etídium-bromiddal festettük. Az értékelés ultraibolya (UV) fénnel való megvilágítással történt.

3.24. Statisztikai módszerek

A folytonos változók eloszlását a Shapiro-Wilk-féle W-tesztel ellenőriztük. Két csoport folytonos változóinak összehasonlításához a Student-féle kétmintás *t*-tesztet, illetve a Mann-Whitney *U*-tesztet, míg több csoport esetén a Kruskal-Wallis-féle varianciaanalízist (ANOVA) használtuk. Post-hoc tesztként az átlagos rangszámok többszörös összehasonlítását végeztük. A csoportok diszkrét változóinak összehasonlításához a Fisher-féle egzakt és a Pearson-féle χ^2 tesztet alkalmaztuk. A korrelációs együtthatókat a Spearman-féle rangszám

korrelációs eljárással számítottuk ki. Többszörös lineáris regresszióval a standardizált regressziós együtthatókat határoztuk meg. Analíziseink során a zavaró (confounding) változók hatását dichotom függő változó esetén többszörös logisztikus regresszióval, míg, ha a függő változó folytonos volt, kovariancia analízissel (analysis of covariance (ANCOVA)) korrigáltuk (adjusztáltuk). A többszörös lineáris regressziót, valamint a kovariancia analízist nem paraméteres módszerként a függő változók logaritmikus transzformációja után végeztük el. Méréseink diagnosztikus pontosságát a Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe segítségével értékeltük ki. A PIGF gyorseszti eredménye és a terhesség időtartama közötti összefüggést Kaplan-Meier görbén ábrázoltuk és a hazard ratio-t egyváltozós és többváltozós Cox-regresszió alkalmazásával számítottuk ki.

Genetikai vizsgálatainknál a Hardy-Weinberg szabály teljesülését (a Hardy-Weinberg egyensúly meglétét) a Guo és Thompson által leírt egzakt módszerrel ellenőriztük, ami a Markov-lánc egy módosított változatát használja. A módszer kis esetszám esetén pontosabb a χ^2 teszténél. A polimorf lókuszok közötti kapcsoltságot (linkage disequilibrium (LD)) egy permutációs eljárással határoztuk meg az úgynevezett Expectation-Maximization (EM) algoritmus segítségével. Tekintettel arra, hogy a PCR-RFLP eljárással meghatározott genotípusok esetében a gametikus fázis és így a haplotípus nem volt ismert, a haplotípus gyakoriságot a gametikus fázis rekonstrukciójával, az Excoffier-Laval-Balding (ELB) algoritmussal becsültük meg. A Toll-like receptor 4 gén LD profiljának vizsgálatát és a tag SNP-k azonosítását az International HapMap Project adatainak segítségével végeztük (www.hapmap.org).

Statisztikai elemzéseinkhez a STATISTICA, az SPSS, a MedCalc, a GraphPad Prism és a MATLAB szoftvereket használtuk fel. A populációgenetikai számításainkat az Arlequin szoftverrel végeztük. Minden statisztikai analízisünkben a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. A szérumban sFlt-1 és PlGF koncentráció vizsgálata praeeclampsziában elektrokemilumineszcens immunoassay útján

Eredményeink szerint az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszint praeeclampsziában összefüggést mutat a szisztolés és diasztolés vérnyomás értékekkel, a veseműködés zavarával, az endothel-diszfunkcióval, a trophoblast deportációs folyamattal, a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, valamint a klinikai tünetek súlyosságával és korábbi terhességi korban történő jelentkezésével. Az anyai életkor, a testtömeg index, a dohányzás, a paritás, a vérvételkorai terhességi kor, a májfunkciós paraméterek, a gyulladás és az oxidatív stressz markerei (C-reaktív protein, malondialdehid) azonban nem mutattak kapcsolatot a praeeclampsziás terhesek keringésében található angiogén faktorok szintjével. Eredményeink arra utalnak, hogy a VEGF-A és a PlGF alapvető az endothelium integritásához élettani terhességben, illetve, hogy az angiogén és anti-angiogén faktorok közötti egyensúly felborulása lényeges szerepet játszik a praeeclampsia patogenezisében.

Praeeclampsziás csoportunkban szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a keringő sFlt-1 és a trophoblast-törmelék markerének tekintett szabad magzati DNS szintek között, ami arra enged következtetni, hogy a trophoblast deportatio (trophoblast-törmelék megjelenése az anyai vérkeringésben) lehet felelős – legalábbis részben – a praeeclampsziában észlelt emelkedett szérumban sFlt-1 koncentrációért. Ezt a legújabb irodalmi adatok is megerősítették, amelyek szerint a syncytiotrophoblast mikrovezikulumok sFlt-1-et is expresszálnak.

Intrauterin növekedési retardációval társult praeeclampsziában szignifikánsan alacsonyabb szérumban PlGF koncentrációt találtunk, mint amikor IUGR nem volt megfigyelhető. Ezen eseteket a méhlepény vérkeringésének jelentős beszűkülése jellemzi. A lepusztató tényezők különösen fontosak a korai praeeclampsia patogenezisében, ami vizsgálatunkban szintén szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációval társult. A praeeclampsziás terhesek szérumban PlGF koncentrációja a terhesség időtartamával (a szüléskori terhességi korig) párhuzamosan emelkedett, jelezve a PlGF meghatározás prognosztikai jelentőségét praeeclampsziában.

Korábbi vizsgálatokkal összhangban, tanulmányunkban is jobb diagnosztikus pontosságúnak bizonyult praeeclampsziában az sFlt-1/PlGF hányados, mint a szérumban sFlt-1 és PlGF szint önmagában.

4.2. A „betegágy melletti” PlGF gyorseszteszt diagnosztikus hatékonyságának és prognosztikai értékének vizsgálata magas vérnyomással szövődött terhességekben

Tanulmányunkban pozitív PlGF teszteredményt kaptunk a proteinuriával társult hipertóniás terhességek majdnem mindegyikében, a proteinuria nélküli hipertóniás esetek több mint felében, míg a kontroll csoportból mindössze 1 esetben. A 35. terhességi hét előtt levett plazmamintákat elemezve, a PlGF teszt magas szenzitivitással rendelkezett a praeclampsia (95,7%), HELLP-szindróma (95,0%) és a ráakódásos praeclampsia (82,4%) felismerésében.

A terhesség 35 hétnél rövidebb időtartamát a pozitív PlGF teszt az esetek 93,7%-ában, míg a 37. hét előtti lezárásának szükségességét 90,5%-ban jelezte előre. A PlGF teszt képes azonosítani hipertóniás terhességek minden formájában azokat az eseteket, amikor a koraszülés kockázata nagyobb, beleértve a gesztációs és krónikus hipertóniát is. Cox-regresszió alkalmazásával hipertóniás terhesekben szoros összefüggést találtunk a PlGF teszteredmény és a terhesség időtartama között, a vérvételkori terhességi korra és proteinuriás hipertónia formákra történő adjusztálást követően is. Ez a megfigyelés mutatja a teszt jó prognosztikai értékét, ugyanis az alacsony plazma PlGF koncentráció jelzi a kórkép súlyosságát (a terhesség 37. hét előtti lezárásának szükségességét) nemcsak praeclampsziában, hanem a terhességi hipertóniák proteinuriával nem járó formáiban is.

Eredményeink klinikai jelentőségét az adja, hogy a negatív PlGF teszteredménnyel elkülöníthetjük a gesztációs és krónikus hipertóniás terhesek azon alcsoportját, akiknél a praeclampsia, illetve ráakódásos praeclampsia kialakulásának kockázata alacsony. Ezek a terhes nők kevésbé intenzív klinikai ellátást igényelnek. Másrészt a pozitív PlGF teszteredmény azonosítja azt a nagy kockázatú hipertóniás terhes populációt, akik esetében a terhesség sürgős lezárása válhat szükségessé. A jövőben elképzelhető, hogy a „betegágy melletti” PlGF gyorseszteszt elősegíti majd klinikai döntéseink meghozatalát hipertóniás terhesekben.

4.3. A PlGF gyorseszteszt és a magzati flowmetria összehasonlítása a kedvezőtlen magzati kimenetel azonosításában magas vérnyomással szövődött terhességekben

A PlGF gyorseszteszt 100 pg/ml alatti eredménye azonosította az összes olyan hipertóniás terhest, akinél a terhesség sürgős lezárására volt szükség kóros flowmetriás lelet miatt, illetve 100%-ban azonosította az IUGR előfordulását, a koraszülést pedig 61-ből 56 esetben. A PlGF gyorseszteszt azonosította továbbá azon hipertóniás terhesek nagy részét, akiknél a magzati flowmetria normális eredményt adott, de a terhesség 37. hét előtti lezárására volt szükség

kóros CTG lelet vagy oligohydramnion miatt. A két módszert együtt értékelve, normális flowmetriás lelet és PlGF teszteredmény mellett IUGR nem fordult elő, míg koraszülés csak 5 esetben, ami közül 2 idő előtti burokrepedés miatt történt.

Tanulmányunkban a PlGF teszt pozitív eredményt adott hipertóniás terhesekben kóros flowmetria és IUGR előfordulása esetén minden esetben, kóros CTG lelet vagy oligohydramnion mellett az esetek nagy részében, illetve azon eutróf magzatot hordó terhesek jelentős részében is, akiknél a terhesség 37. hét előtti lezárása vált szükségessé. Eredményeink azt mutatják, hogy a PlGF teszt kiváló szenzitivitással rendelkezik a magzati kockázat (kóros flowmetriás lelet, IUGR, kóros CTG lelet, oligohydramnion, koraszülés) azonosításában a magas vérnyomással szövődött terhességek proteinuriával járó, illetve anélküli formáiban is.

A PlGF gyorsteszt klinikailag hasznos információval szolgálhat a 35. terhességi hét előtt azon hipertóniás terhesek azonosításában, akiknél a terhesség sürgős lezárása válhat szükségessé kóros flowmetriás lelet, vagy normális flowmetriás eredmény esetén kóros CTG lelet vagy oligohydramnion miatt. A pozitív PlGF teszteredmény 100%-ban képes azonosítani az IUGR előfordulását normális magzati flowmetriás lelet esetén is. Másrészt a normális flowmetriás lelet és PlGF teszteredmény együttes előfordulása azonosítja azt a hipertóniás terhes populációt, akiknél a kedvezőtlen magzati kimenetel kockázata alacsony.

4.4. A vérplazma ADAMTS13 aktivitásának, von Willebrand faktor antigén szintjének és a von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata praeclampsziában

Eredményeink azt mutatják, hogy a magas von Willebrand faktor antigén szint ellenére a vérplazma ADAMTS13 aktivitása nem csökken praeclampsziában. Továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezete is intakt praeclampsziában. Korábbi tanulmányokban összefüggést mutattak ki az emelkedett plazma von Willebrand faktor antigén szint és csökkent ADAMTS13 aktivitás között több kórképben is. Az inverz kapcsolat biológiai jelentősége azonban még nem tisztázott. Úgy tűnik, hogy praeclampsziában az ADAMTS13 aktivitás független a von Willebrand faktor antigén szintjétől. Megfigyelésünkkel összhangban az ADAMTS13 aktivitás nem volt minden esetben alacsony, amikor a plazma von Willebrand faktor antigén szintet magasnak találták, és fordítva.

HELLP-szindrómában emelkedett plazma von Willebrand faktor antigén szint mellett csökkent ADAMTS13 aktivitást figyeltek meg korábbi vizsgálatokban. Elképzelhető, hogy az emelkedett von Willebrand faktor szint és csökkent ADAMTS13 aktivitás együttes jelenléte hozzájárulhat a mikrotrombusok képződéséhez és a konsumptív trombocitopenia létrejöttéhez HELLP-szindrómában. A jövőben érdemes lenne megvizsgálni, hogy a

vérplazma ADAMTS13 aktivitásának csökkenése képes-e előre jelezni a HELLP-szindróma kialakulását praeclampsziás terhesekben.

4.5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampsziában

Tanulmányunkban szignifikáns pozitív lineáris összefüggést találtunk praeclampsziás terhesekben a plazma oszteopontin és fibronectin szintek között. Kifejezett endothelsejt károsodással járó praeclampsziában az oszteopontin plazmaszintje szignifikánsan magasabb volt. Az endothelsejt károsodás fontos szerepet játszik a praeclampsia klinikai tüneteinek kialakulásában. A plazma fibronectin koncentráció az endothel-sérülés elfogadott markere praeclampsziában, és összefüggést mutat a kórkép súlyosságával és szövődményeivel. A magas fibronectin szinttel rendelkező praeclampsziás terhesek között vizsgálatunkban is gyakrabban fordult elő a kórkép súlyos formája. A plazma oszteopontin és fibronectin szintek között praeclampsziás terhesekben megfigyelt pozitív lineáris összefüggés oka nem ismert. Mindkét glikoprotein az extracelluláris mátrix komponense és képesek integrin molekulákhoz kapcsolódni. Kimutatták továbbá, hogy a két fehérje között keresztkötések is kialakulhatnak. Ezért feltételezzük, hogy kifejezett endothelsejt károsodás esetén az oszteopontin és a fibronectin együtt kerül be az érfalból a perifériás keringésbe. Ez megmagyarázhatja a plazmaszintjük között tanulmányunkban talált összefüggést.

4.6. A szérum citokin profil vizsgálata praeclampsziában

Tanulmányunkban átfogó módon meghatároztuk egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek keringésében számos citokin, kemokin és adhézíós molekula koncentrációját.

Saito és munkatársai közölték először, hogy praeclampsziában a Th1-típusú immunitás túlsúlya figyelhető meg. Vizsgálataikat áramlási citometriával, illetve a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek tenyésztésével és a felülúszó citokin koncentrációinak mérésével végezték. Tanulmányunkban a keringésben található IL-2 és IFN- γ IL-4-gyel szembeni relatív túlsúlya (emelkedett IL-2/IL-4 és IFN- γ /IL-4 hányados) megerősíti praeclampsziában a Th1-túlsúlyos szisztémás környezet fennállását.

Eredményeink szerint a Th1/Th2 egyensúly megváltozása mellett számos más gyulladásos paraméter szérumszintje módosul praeclampsziában. Szövődménymentes terhességgel összehasonlítva praeclampsziában a keringésben található pro-inflammatorikus citokinek (IL-6, IL-17A és TNF- α), kemokinek (IL-8, IP-10 és MCP-1), valamint az ICAM-1

és VCAM-1 sejtadhéziós molekulák szintje megemelkedik, egy pro-inflammatorikus szisztémás környezetet létrehozva.

A szérumban MCP-1 és ICAM-1 koncentráció praeeclampsias terhesekben pozitív korrelációt mutatott a szérumban CRP és malondialdehid szintekkel, ami arra utal, hogy a leukociták kemotaxisa és endothelsejtekhez történő adhézioja fontos eleme a praeeclampsiaiban megfigyelhető szisztémás gyulladásos válaszreakciónak és oxidatív stressznek. Az MCP-1 és ICAM-1 szérumszintek összefüggése a vérnyomás értékekkel és a májfunkciós laboratóriumi paraméterekkel arra enged következtetni, hogy ezen citokinek és az általuk vezérelt gyulladásos folyamatok közreműködhetnek a magas vérnyomás és a hepatocelluláris károsodás kialakulásában praeeclampsias terhesekben.

Tanulmányunkban szignifikáns korrelációt találtunk az IP-10, az MCP-1 és a VCAM-1 szérumszintje, valamint az endothelialis markerek (von Willebrand faktor antigén, fibronectin) között mind szövődmenymentes terhességben, mind praeeclampsiaiban. A szérumban IP-10, MCP-1 és VCAM-1 koncentrációk összefüggésben álltak továbbá a vese- és májfunkciós paraméterekkel is. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy ezen gyulladásos molekulák fontos szerepet játszanak az endothelsejt károsodás kialakulásában. Az IP-10 mutatta a legszorosabb összefüggést az endothel-diszfunkcióval egészséges és praeeclampsias terhesekben is. Az IP-10 (CXCL10) pro-inflammatorikus és anti-angiogén tulajdonságokkal is rendelkezik, és praeeclampsiaiban ezen kemokint tartják a gyulladás és angiogén egyensúlyzavar közötti egyik lehetséges kapcsolatnak.

Nagy szenzitivitású ELISA módszerrel kimutattuk, hogy a pro-inflammatorikus IL-17A szérumszintje emelkedett praeeclampsiaiban. Eredményeink szerint az emelkedett IL-17A koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados a praeeclampsia egymástól független kockázati tényezője, ami arra utal, hogy a keringő IL-17A szint megváltozása és az angiogén egyensúlyzavar független folyamatok praeeclampsiaiban. Ráadásul a megnövekedett szérumban IL-17A koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados additív hatását figyeltük meg a praeeclampsia kockázatában.

4.7. A szérumban leptin koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkel, kemokinekkel, adhézio molekulákkal és angiogén faktorokkal praeeclampsiaiban

A leptin szérumszintje szignifikáns korrelációt mutatott az IP-10 szérumszintjével mind szövődmenymentes terhességben, mind praeeclampsiaiban. Ez egybevág azzal a korábbi *in vitro* megfigyeléssel, hogy a leptin szelektív módon képes indukálni az IP-10 expresszióját

és szekrécióját humán monocitákban. Ahogy az előző pontban már említettem, az IP-10 (CXCL10) pro-inflammatorikus és anti-angiogén tulajdonságokkal is rendelkezik, és emiatt a gyulladás és angiogén egyensúlyzavar közötti egyik lehetséges kapcsolatnak tekintik praeclampsziában. Az IP-10 mutatta a legszorosabb összefüggést az endothel-diszfunkció markereivel, valamint a vese- és májfunkciós paraméterekkel egészséges és praeclampsziás terheseinkben is. Ezért feltételezzük, hogy az IP-10-nek összekötő szerepe lehet az emelkedett keringő leptin koncentráció és a generalizált endothel-diszfunkció között praeclampsziában.

Tanulmányunkban az emelkedett szérumsFt-1 és csökkent PlGF koncentráció nem mutatott összefüggést a leptin szérumszintjével praeclampsziában, jelezve, hogy az angiogén egyensúlyzavar és a keringésben található leptin koncentrációjának megváltozása egymástól független mechanizmusok ezen multifaktoriális kórkép patogenezisében. Eredményeink szerint az emelkedett szérumsFt-1 és csökkent PlGF hányadosnak szinergetikus hatása van a praeclampsia rizikójában, ahogy azt a kombinációjuk lényegesen nagyobb esélyhányadosa mutatta.

4.8. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel

Eredményeink szerint a Hsp70 szérumszintje szignifikáns pozitív korrelációt mutat a CRP és a malondialdehid szintekkel praeclampsziás terhesekben, ami arra utal, hogy a szisztémás gyulladás és oxidatív stressz lehet felelős – legalábbis részben – a keringésben található Hsp70 szintjének emelkedéséért.

Az intracelluláris hősokkfehérjék nemcsak aktív módon képesek kijutni az extracelluláris térbe, hanem passzív módon is a széteső, nekrotikus sejtekből a plazmamembrán destrukcióját követően. A Hsp70 szérumszintje és a májfunkciós paraméterek között praeclampsziás terheseinkben megfigyelt szignifikáns korreláció arra enged következtetni, hogy a Hsp70 felszabadulása a nekrotikus májsejtekből hozzájárulhat a szérumsFt-1 koncentráció emelkedéséhez praeclampsziában.

A megnövekedett keringő Hsp70 szint azonban nemcsak következménye lehet a praeclampsziának, hanem szerepet játszhat annak patogenezisében is. A stressznek kitett, illetve károsodott, széteső sejtekből az extracelluláris térbe kerülő Hsp70 a sejtek közötti ősi veszély jelként képes egy pro-inflammatorikus immunválaszt létrehozni. A Hsp70 és CRP szérumszintek között talált korreláció annak lehetőségét is felveti, hogy a keringésben található Hsp70 hozzájárulhat az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásához.

praeclampsziában. Ezt alátámaszthatja, hogy korábbi tanulmányokban az emelkedett keringő Hsp70 szintet számos gyulladásos folyamattal kapcsolatba hozták.

4.9. A szérumban Hsp70 (HSPA1A) koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhéziónak molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampsziában

Megfigyeléseink szerint az emelkedett szérumban Hsp70 koncentráció szignifikáns összefüggésben áll az IL-12p40, az MCP-1, az ICAM-1 és a VCAM-1 szérumszintjével praeclampsziában. Ez megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a keringésben található Hsp70-nek szerepe lehet a praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásában.

Praeclampsziás terheseinkben a megnövekedett szérumban MCP-1, ICAM-1 és VCAM-1 koncentráció szignifikáns összefüggést mutatott a vérnyomás értékekkel, a vese- és májfunkciós paraméterekkel, valamint a plazma fibronektin szintjével. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a keringésben található Hsp70 közvetett módon hozzájárulhat a generalizált endothel-diszfunkció létrejöttéhez praeclampsziában.

Praeclampsziában az anyai keringésben megnövekedett mennyiségben található Hsp70 forrása nem tisztázott teljes mértékben. Jól ismert, hogy a fehérvérsejtek kifejezetten aktiválódnak praeclampsziában, és képesek Hsp70 és gyulladásos molekulák kibocsátására is. Praeclampsziás terheseinkben a Hsp70 és a pro-inflammatorikus molekulák szérumszintje között talált szignifikáns korreláció arra utal, hogy a perifériás vérkeringésben található fehérvérsejtek lehetnek a Hsp70 további forrásai praeclampsziában. Mivel az ICAM-1 és a VCAM-1 az endothelsejteken is kifejeződik, a Hsp70 szérumszintjével talált összefüggésük azt is felveti, hogy a Hsp70 az aktiválódott, illetve károsodott endothelsejtekből is bekerülhet az anyai keringésbe praeclampsziában.

Tanulmányunkban az emelkedett szérumban sFlt-1 és csökkent PlGF koncentráció nem mutatott összefüggést a Hsp70 szérumszintjével praeclampsziás terheseinkben, jelezve, hogy az angiogén egyensúlyzavar és a keringésben található Hsp70 koncentrációjának megváltozása egymástól független folyamatok a praeclampsia patogenezisében. Eredményeink szerint az emelkedett szérumban Hsp70 koncentrációnak és sFlt-1/PlGF hányadosnak additív hatása van a praeclampsia kockázatában, ahogy azt a kombinációjuk lényegesen nagyobb esélyhányadosa mutatta.

4.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampsziában

Eredményeink szerint a humán Hsp60, mycobacterialis Hsp65 és humán Hsp70 elleni antitestek jelen vannak egészséges terhes nők perifériás vérében. Ezen antitestek szérumszintje azonban nem változik praeclampsziában. Az anti-Hsp60 és anti-Hsp70 antitestek jelenléte az összes vizsgált szérummintánkban alátámasztja azok természetes autoantitestként betöltött szerepét. Vizsgálati csoportjainkban az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 szérumszintje közötti szoros korreláció keresztreakáló epitópok jelenlétére utal.

Megfigyeléseink szerint az emelkedett szérum Hsp70 koncentráció ellenére a hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintje nem változik praeclampsziában. Lehetséges, hogy ezek az antitestek a hősokkfehérjéket fokozottan expresszáló szövetekhez történő kötődés révén szekvesztrálódnak a keringésből, vagy immunkomplexeket képeznek a keringésben található hősokkfehérjékkel. A hősokkfehérjék elleni antitestek koncentrációja nem mindig emelkedett meg a keringésben, amikor a megfelelő hősokkfehérje szintje magas volt, és fordítva. Tekintve, hogy a praeclampsziát a Th1-típusú immunitás túlsúlya jellemzi, az is lehetséges, hogy a hősokkfehérjék elleni celluláris immunválasz játszik inkább szerepet a kórkép patogenezisében.

4.11. A komplementrendszer vizsgálata praeclampsziában

Tanulmányunkban meghatároztuk a komplementrendszer aktiválódásának markereit (C1rC1sC1-INH: klasszikus út, MBL-MASP2 aktivitás: lektin út, C3bBbP: alternatív út, C4d: klasszikus és lektin út, C3a: közös út és SC5b9: terminális út) praeclampsziás terhesek szisztémás keringésében. Eredményeink szerint a C1rC1sC1-INH és C3bBbP aktivációs komplexek plazmaszintje szignifikánsan emelkedett praeclampsziában, ami a komplementrendszer klasszikus és alternatív úton történő szisztémás aktiválódását mutatja, a terminális komplex (SC5b9) fokozott képződéséhez vezetve. A terminális komplex anyai keringésben mért excesszív mennyisége összefüggést mutat az intrauterin növekedési retardációval praeclampsziás terhesekben.

Vizsgálatunkban nem találtunk kapcsolatot a mannóz-kötő lektin út szérumban mért aktivitása és a praeclampsia között. Korábbi tanulmányok a mannóz-kötő lektin (MBL) keringésben mért szintjét, illetve az MBL polimorfizmusok szerepét vizsgálták praeclampsziában, ezek azonban ellentétes eredményekre jutottak. Megjegyzem, hogy a keringésben található MBL emelkedett szintje nem jelenti a mannóz-kötő lektin út

aktiválódását, az lehet a kórképben megfigyelt akut fázis reakció része is. A mannóz-kötő lektin út funkcionális aktivitását először határoztuk meg praeclampsziában.

Tanulmányunkban a plazma fikolin-2 és fikolin-3 koncentráció nem mutatott összefüggést a komplement aktivációs markerek keringésben mért szintjével, ami arra utal, hogy a fikolin-mediált lektin út nem játszik szerepet a szisztémás komplement aktivációban praeclampsziában. A fikolinok direkt opsoninként hatva képesek elősegíteni a mikroorganizmusok, apoptotikus és nekrotikus sejtek eltávolítását fagocitózis útján. Az apoptotikus méhlepényből trophoblast eredetű sejtes és szubcelluláris anyagok az anyai keringésbe is bekerülnek szövődménymentes terhességben és fokozott mennyiségben praeclampsziában is. Ez a trophoblast-törmelék szabad magzati DNS-t és sFlt-1-et is tartalmaz. Tanulmányunkban a fikolin-2 és a szabad magzati DNS, valamint az sFlt-1 keringésben mért koncentrációja között egészséges és praeclampsziás terhesekben megfigyelt inverz korreláció arra enged következtetni, hogy a fikolin-2 közvetlen módon részt vehet a trophoblast eredetű anyagok anyai keringésből történő eltávolításában. Praeclampsziában a keringő fikolin-2 csökkent szintje miatt – aminek oka a fokozott felhasználódás vagy elsődleges hiány is lehet – zavart szenvedhet az apoptotikus és nekrotikus lepenyi anyagoknak az anyai keringésből történő eltávolítása, ami hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyüttesének a kialakulásához.

Vizsgálatunkban szignifikáns fordított korrelációt találtunk a fikolin-2 plazmaszintje, valamint a vese-és májfunkciós paraméterek, illetve az endothel-aktiváció és endothel-sérülés markerei között praeclampsziás terhesekben. A szérum sFlt-1 szintre történő illesztést követően azonban ezek az összefüggések a szérum kreatinin koncentráció kivételével eltűntek. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a keringésben található fikolin-2 fokozott felhasználódás vagy elsődleges hiány (pl. genetikai ok) miatti csökkent szintje közvetett módon, a lepenyi eredetű, sFlt-1-et is tartalmazó anyagoknak az anyai keringésből történő károsodott eltávolítása útján hozzájárulhat a generalizált endothelsejt diszfunkció, és ezáltal a kórkép anyai tünetegyüttesének a létrejöttéhez. A fikolin-2 és a kreatinin szintje közötti független kapcsolat praeclampsziában a fikolin-2-nek a vesekárosodásban betöltött közvetlen szerepét is felveti.

4.12. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata praeclampsziában

Egészséges terhes nőkben a perifériás vérben található T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége intracelluláris VEGF-A expressziót mutatott, azonban a VEGF-A-pozitív T

(helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökkent praeeclampsias terhesekben, ami arra utal, hogy a keringő T és NK sejtek kevesebb VEGF-A-t termelnek praeeclampsiaiban. A perifériás vérben található T és NK sejtek csökkent VEGF-A termelése hozzájárulhat az angiogén egyensúlyzavar és a következményes generalizált endothelsejt diszfunkció létrejöttéhez praeeclampsiaiban. A keringő T és NK sejtek aktiválódnak praeeclampsiaiban és nagy mennyiségű pro-inflammatorikus citokint termelnek. Feltételezzük, hogy a perifériás vér limfocitáinak csökkent VEGF-A expressziója az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció részjelensége praeeclampsiaiban. Lehetséges, hogy az aktiváció hatására a keringő T és NK sejtek megváltoztatják fenotípusukat, és VEGF-A helyett inkább gyulladásos citokineket expresszálnak.

4.13. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata praeeclampsiaiban

Megfigyeléseink szerint egészséges terhes nőkben a perifériás vérben található T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége, míg nem terhes nőkben csak egy kis hányada mutat intracelluláris galektin-1 expressziót. Praeeclampsiaiban a galektin-1-pozitív T (helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökken szövődménymentes terhességgel összehasonlítva, ami arra utal, hogy a keringő T és NK sejtek kevesebb galektin-1 fehérjét termelnek praeeclampsiaiban.

Irodalmi adatok szerint a galektin-1 kulcsszerepet játszik az anya és szemiallogén magzata közötti immuntolerancia kialakításában. Azon eredményeink, hogy egészséges nem terhes nőkkel szemben egészséges terhes nőkben a T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége intracelluláris galektin-1 expressziót mutatott, összhangban vannak a galektin-1 immuntolerancia kialakításában betöltött központi szerepével. A perifériás vérben található limfociták galektin-1 termelése elősegítheti a szisztémás Th2- és regulátoros T sejt-túlsúly kialakulását szövődménymentes terhességben.

Praeeclampsiaiban a galektin-1-pozitív T (helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben kifejezetten csökken. Feltételezésünk szerint a perifériás vér limfocitáinak csökkent galektin-1 expressziója a generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakció részjelensége praeeclampsiaiban. Elképzelhető, hogy a lepényi és/vagy anyai eredetű gyulladásos stimulusok hatására a keringő T és NK sejtek megváltoztatják fenotípusukat, és galektin-1 helyett inkább pro-inflammatorikus citokineket termelnek. Bár a galektin-1 képes előidézni a Th1 és Th17 sejtek apoptózist, a Th2 sejtek védettek a galektin-1-gyel szemben a sejt felszíni glikoproteinjeik különböző szialilációja miatt. Ezért lehetséges, hogy a perifériás

vérben található T és NK sejtek csökkent galektin-1 termelése hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyüttesére jellemző pro-inflammatorikus Th1- és Th17-típusú immunválasz kialakulásához.

4.14. A perifériás vérben található citotoxikus T sejtek és NK sejtek intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata praeclampsziában

Eredményeink szerint egészséges terhes nőkben a perifériás vérben található NK sejtek többsége, míg a citotoxikus T sejteknek csak egy kis hányada mutat intracelluláris granulizin expressziót. Ez a megfigyelésünk összhangban van korábbi tanulmányokkal, amelyek az NK sejteket találták a keringésben található granulizin fő forrásának. A keringő NK sejtek granulizin termelése elősegítheti a terhesek fertőzésekkel és tumorokkal szembeni védelmét. Az anyai életkor és a granulizin-termelő NK sejtek gyakorisága között egészséges terhesekben észlelt szignifikáns inverz korreláció az anyai szervezet védekező mechanizmusainak meggyengülésére utal az életkor előrehaladtával.

Praeclampsziás terhesekben a granulizin-termelő citotoxikus T sejtek aránya a perifériás vérben kifejezetten megemelkedik, ami arra utal, hogy a keringő citotoxikus T sejtek granulizin termelése fokozott praeclampsziában. Ez indokolhatja a szérumban granulizin koncentrációjának korábban leírt emelkedését praeclampsziában. Az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció részeként a citotoxikus T sejtek aktiválódnak és fokozott válaszkésztséget mutatnak az apai antigénekre praeclampsziában. Ez magyarázhatja a granulizin-termelő citotoxikus T sejtek nagyobb gyakoriságát praeclampsziában.

A granulizin kemotaktikus hatást gyakorol a monocitákra, a CD4⁺ és CD8⁺ memória (CD45RO⁺) T sejtekre, az NK sejtekre és az érett monocita-eredetű dendritikus sejtekre. Továbbá a granulizin képes aktiválni a monocitákat pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek termeléséhez vezetve. Ezért feltételezhető, hogy a perifériás vérben található citotoxikus T sejtek fokozott granulizin termelése hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyüttesére jellemző pro-inflammatorikus Th1-típusú immunválasz kialakulásához.

4.15. A perifériás vérben található IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának meghatározása praeclampsziában

Vizsgálatunkban mind a Th1/Th2, mind a Th17/regulátoros T sejt arányt szignifikánsan magasabbnak találtunk a szisztémás keringésben praeclampsziában. Emellett az IL-17A-termelő citotoxikus T sejtek (Tc17) és NK sejtek prevalenciája is szignifikánsan

emelkedett volt praeclampsziában. Ezek a változások egy pro-inflammatorikus szisztémás környezetet eredményeznek praeclampsziában.

Santner-Nanan és munkatársai közölték először, hogy praeclampsziában a perifériás vérben található Th17 sejtek prevalenciája szignifikánsan magasabb, míg a regulátoros T sejteké szignifikánsan alacsonyabb, mint szövődmenymentes terhességben. Tanulmányunkban ezt a megfigyelést megerősítettük. A perifériás vérben található Th17 és regulátoros T sejtek arányának emelkedése hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős szisztémás gyulladásos válaszreakció létrejöttéhez.

A CD4 sejtek mellett a CD8 és NK sejtek is képesek IL-17A termelésére. Először mutattuk ki, hogy a Th17 sejtek mellett az IL-17A-termelő citotoxikus T sejtek (Tc17) és NK sejtek prevalenciája is szignifikánsan magasabb praeclampsziában, mint szövődmenymentes terhességben. Ezen limfociták IL-17A és egyéb pro-inflammatorikus citokin termelése részt vehet a generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakció kialakulásában praeclampsziában. Az NK sejtek kóros aktivációját korábban már összefüggésbe hozták a praeclampsia patogenezisével.

Tanulmányunkban sejtfelszíni kemokin receptor markerekkel a Th1 sejtek túlsúlyát mutattuk ki praeclampsziában a Th2 sejtekkel szemben. A Th17/regulátoros T sejt arány, illetve az IL-17A-termelő limfociták gyakoriságának megváltozása befolyásolhatja a Th1 sejtek prevalenciáját, mivel az IL-17A képes más pro-inflammatorikus citokinek, többek között az IFN- γ termelését serkenteni. Az IL-17A-termelő limfociták és a CXCR3⁺ CD4 sejtek prevalenciája között azonban nem találtunk kapcsolatot, ami azt mutatja, hogy a Th17 sejtek, illetve az IL-17A-termelő citotoxikus T sejtek és NK sejtek pro-inflammatorikus hatásukat inkább közvetlenül, semmint a Th1/Th2 arány befolyásolásán keresztül fejtik ki praeclampsziában.

4.16. A perifériás vérben található konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata praeclampsziában

Eredményeink szerint nemcsak a konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ regulátoros T sejtek, hanem a nem konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejtek gyakorisága is szignifikánsan alacsonyabb a perifériás vérben praeclampsziában, mint szövődmenymentes terhességben.

A regulátoros T sejtek differenciálódásához nélkülözhetetlen FoxP3 transzkripciós faktor nemcsak a CD4⁺ CD25⁺ T sejtekben, hanem a CD4⁺ CD25⁻ T sejtek egy részében is kifejeződik. A FoxP3 ektópiás expressziója szuppresszív funkcióval látta el a perifériás CD4⁺

CD25⁻ T sejteket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a FoxP3, és nem pedig a CD25 a szuppresszív T sejtek legjobb markere. Tanulmányunkban először mutattuk ki, hogy a nem konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejtek gyakorisága is csökken praeclampsziában. A konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ és a nem konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejtek egymáshoz viszonyított arányában azonban nem találtunk különbséget egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek között. Ez azt mutatja, hogy a konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek gyakorisága párhuzamosan változik szövődménymentes terhességben és praeclampsziában, és hogy mindkét alcsoport jelenléte a szisztémás keringésben egyaránt fontos a terhesség alatti immuntolerancia biztosításában.

4.17. A perifériás vérben található regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának meghatározása praeclampsziában

A regulátoros T sejtek nem alkotnak egy homogén sejtcsoportot, hanem további alcsoportokra oszthatók. Eredményeink szerint a perifériás vérben található regulátoros T sejtek közül a funkcionálisan legaktívabb effektor regulátoros T sejtek (CD4⁺ FoxP3⁺⁺ CD45RA⁻) gyakorisága csökkent a legnagyobb mértékben, míg a naiv regulátoros T sejteké (CD4⁺ FoxP3⁺ CD45RA⁺) változatlan maradt praeclampsziában. Ez hozzájárulhat a természetes és az adaptív immunrendszer praeclampsziában észlelt aktiválódásához. Ezzel összhangban a perifériás vérben található CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ CD45RA⁻ aktivált T sejtek gyakoriságát tanulmányunkban is magasabbnak találtuk praeclampsziában, mint szövődménymentes terhességben. Továbbá a kimerült, funkcionálisan kevésbé aktív CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ CD279⁺ regulátoros T sejtek gyakorisága magasabb volt praeclampsziában, ami az effektor regulátoros T sejtek csökkent prevalenciájával együtt magyarázhatja a regulátoros T sejtek praeclampsziában megfigyelt funkciózavarát.

A regulátoros T sejteknek eredetük alapján két alcsoportja különíthető el: thymus eredetű (thymicus, természetes) regulátoros T sejtek, és a periférián indukált (extrathymicus, indukált) regulátoros T sejtek. Eredményeink szerint a regulátoros T sejtek eredete nem lényeges a praeclampsia patogenezise szempontjából, mivel a thymicus (CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ Helios⁺) és extrathymicus (CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ Helios⁻) regulátoros T sejtek arányában nem találtunk szignifikáns különbséget egészséges és praeclampsziás terhesek között. A Helios⁺ effektor és naiv regulátoros T sejtek prevalenciája sem különbözött a két csoport között.

4.18. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziójának vizsgálata praeclampsziában

Western blot módszerrel végzett méréseink szerint a kannabinoid receptor 1 (CB1) lepényi expressziója szignifikánsan nagyobb volt praeclampsziában, amit az immunhisztokémiai vizsgálat is megerősített. A kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziójában és immunreaktivitásában azonban nem találtunk különbséget praeclampsziás és egészséges terhesek között.

A CB1 immunreaktivitás kifejezetten erősebb volt a syncytiotrophoblast rétegben és a boholy mesenchymában praeclampsziás lepényi mintáinkban szövödménymentes terhességgel összehasonlítva. Ezeket az eredményeket az endokannabinoid rendszer implantációban és placentációban betöltött szerepe magyarázhatja. A trophoblast invázió folyamatát az endokannabinoid rendszer erősen befolyásolja. Megfigyelték, hogy a CB1 mind alacsony, mind magas expressziója elégtelen trophoblast migrációs képességhez vezet. Feltételezésünk szerint a CB1 fokozott expressziója az elégtelen trophoblast invázió következtében a placentáció zavarához, és így a praeclampsia kialakulásához vezethet.

Tanulmányunkban erős CB1 immunreaktivitást figyeltünk meg praeclampsziában a deciduában is. A szintetikus kannabinoidok gátolják a humán deciduális sejtek differenciálódását és azok apoptózist váltják ki CB1 aktiváción keresztül. Ezért elképzelhető, hogy a magas CB1 expresszió megnövekedett apoptózishoz vezet és így gátolja a decida kialakulását. Másrészt az is lehetséges, hogy a CB1 fokozott expressziója inkább a decida remodelling folyamatát zavarja meg, és azon keresztül vezet a kóros placentációhoz, spontán vetélést vagy később praeclampsziát okozva.

A praeclampsziás lepényi mintáinkban erősebb CB1 immunfestődést mutattak a boholykapillárisok endothel- és simaizomsejtjei is. Ez a kóros placentációra adott adaptív válasz is lehet, mivel az endokannabinoidok a CB1 és az 1-es típusú vanilloid receptoron (TRPV1) hatva, NO-mediált és NO-független útvonalakon keresztül képesek vazodilatációt kiváltani, növelve ezzel a méhlepény vérellátását.

4.19. Az anandamid szérumszintjének meghatározása praeclampsziában

Eredményeink szerint az anandamid szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb praeclampsziában, mint szövödménymentes terhességben, azonban nem mutat összefüggést az sFlt-1 és PlGF szérumszintjével.

Korábban bemutattuk, hogy a syncytiotrophoblast réteg erős CB1 immunfestődést mutat praeclampsziás terhesek méhlepényében. Ezért lehetséges, hogy a praeclampsziában

megfigyelt csökkent szérumban anandamid koncentráció az anandamid CB1-et fokozottan expresszáló syncytiotrophoblasthoz történő kötődésének, és így a méhlepénybeni szekvesztrációjának a következménye.

Mind az exogén, mind az endogén kannabinoidok anti-inflammatorikus hatását kimutatták. Az anandamid a Th17-mediált gyulladásos folyamatot csillapítja. Az endokannabinoidok a citokintermelés egyensúlyát Th1-ről Th2 irányba tolják el. Továbbá mind az anandamid, mind az exogén Δ^9 -tetrahydrokannabinol serkenti a regulátoros T sejtek funkcióját CB1 és CB2 receptorokon keresztül. Mindezekre tekintettel feltételezhető, hogy az anandamid csökkent szérumszintje hozzájárulhat az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásához, illetve a szisztémás Th1- és Th17-túlsúlyhoz a Th2 és regulátoros T sejtekkel szemben praeclampsziában.

Az endokannabinoid rendszer krónikus aktivációja komplex szív- és érrendszeri változásokhoz vezet, elsősorban bradycardiát, valamint a vérnyomás és myocardialis kontraktilitás csökkenését okozza. Ezért lehetséges, hogy a csökkent szérumban anandamid koncentráció szerepet játszik a vérnyomás emelkedésében praeclampsziában.

Tanulmányunkban az emelkedett szérumban sFlt-1 és csökkent PlGF koncentráció nem mutatott összefüggést az anandamid szérumszintjével praeclampsziában, jelezve, hogy az angiogén egyensúlyzavar és a keringésben található anandamid koncentrációjának megváltozása egymástól független folyamatok praeclampsziában.

4.20. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsziában

Az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI polimorfizmusának vizsgálata során azt figyeltük meg, hogy a homozigóta T-A haplotípus hordozók szignifikánsan magasabb kockázattal rendelkeznek súlyos praeclampsziára, ami az életkortól, terhesség előtti BMI-től, primiparitástól és dohányzástól függetlennek bizonyult. Továbbá az XbaI polimorfizmus GG genotípusát hordozó súlyos praeclampsziás terhesek kockázata szignifikánsan alacsonyabb volt intrauterin növekedési retardációra.

Az ösztrogén receptor α gén PvuII polimorfizmusa esetében azt írták le, hogy a C, de nem a T allél a B-myb transzkripció faktor kötőhelyének részét képezi és intragenikus enhancer-ként funkcionál. Azt is kimutatták, hogy az ösztrogének fokozzák a myb transzkripció faktor expresszióját. A T allél jelenléte az ösztrogén receptor α expressziójának, és így az ösztrogének azon keresztül kifejtett hatásainak csökkenéséhez vezethet, egy relatív ösztrogénhiányos állapotot eredményezve.

Az ösztrogén receptor α és β fontos szerepet játszik az uteroplacentáris és szisztémás keringés fenntartásában terhesség alatt. Ezért feltételezzük, hogy az ösztrogén receptor α gén polimorfizmusa által kiváltott relatív ösztrogénhiányos állapot (csökkent ösztrogén receptor α expresszió) vazokonstriktiót okoz a szisztémás és uteroplacentáris keringésben, és ezen keresztül fokozhatja a praeclampsia és az intrauterin növekedési retardáció kockázatát.

4.21. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsziában és HELLP-szindrómában

A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A polimorfizmusa esetében a mutáns allélről kimutatták, hogy a transzkripció hatásosabb aktivátora, mint a vad allél, és szoros összefüggést mutat a HLA-A1, B8, DR3 autoimmun MHC haplotípussal, emelkedett szérums TNF- α szintet eredményezve. Tanulmányunkban azt figyeltük meg, hogy a mutáns allél hordozó terhesek kockázata súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsziára szignifikánsan magasabb volt, mint a nem hordozóké, ami az életkortól, terhesség előtti BMI-től és primiparitástól függetlennek bizonyult.

Feltételezésünk szerint a TNF- α G-308A polimorfizmus a súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsia kockázatát azáltal befolyásolja, hogy a mutáns allél hordozó terhesekben növekszik a TNF- α képződése az anya és magzat közötti határfelületen, ami a trophoblast invázió zavarához és a lepényi perfúzió következményes csökkenéséhez vezet.

4.22. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsziában

Tanulmányunkban nem találtunk szignifikáns különbséget a Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G) és Thr399Ile (C1196T) polimorfizmusának allél, genotípus és haplotípus frekvenciáiban egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek között a közép-magyarországi kaukázusi populációban. Tekintettel arra, hogy a Thr399Ile polimorfizmus a Toll-like receptor 4 gén nagyfokban informatív tag SNP-je, ami tökéletes kapcsolságban áll a gén teljes hosszában elhelyezkedő 5 további egy pontos nukleotid variációval, eredményeink arra utalnak, hogy e genomikus régió szekvencia variációi nem mutatnak összefüggést a praeclampsziával.

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. Teljesen automatizált elektrokemilumineszcens immunoassay módszerrel kimutattam, hogy az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszint praeclampsziában összefüggésben áll a szisztolés és diasztolés vérnyomás értékekkel, a veseműködés zavarával, az endothel-diszfunkcióval, a trophoblast deportációs folyamattal, a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, valamint a klinikai tünetek súlyosságával és korábbi terhességi korban történő jelentkezésével. Eredményeim alátámasztják az angiogén egyensúlyzavar központi szerepét a praeclampsia patogenezisében.
2. A betegség mellett is alkalmazható PlGF gyorseszteszt hatékony hipertóniával szövődött terhességekben a 35. terhességi hét előtt mind a diagnózisban, mind a terhesség várható időtartamának előrejelzésében. A teszt a jövőben elősegítheti klinikai döntéseink meghozatalát a hipertóniás terhes nők kezelésében.
3. A PlGF gyorseszteszt hatékonyabb hipertóniával szövődött terhességekben a kedvezőtlen magzati kimenetel (37. terhességi hét előtti szülés szükségessége, intrauterin növekedési retardáció) azonosításában, mint a magzati flowmetria.
4. A magas von Willebrand faktor antigén szint ellenére a vérplazma ADAMTS13 aktivitása nem csökken praeclampsziában. Továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezete is intakt praeclampsziában.
5. A plazma oszteopontin és fibronektin szintek között szignifikáns pozitív lineáris összefüggés figyelhető meg praeclampsziás terhesekben. Kifejezett endothelsejt károsodással járó praeclampsziában az oszteopontin plazmaszintje szignifikánsan magasabb.
6. Nagy teljesítményű multiplex szuszpenziós array technológiával kimutattam, hogy a praeclampsziát egy pro-inflammatorikus szisztémás környezet jellemzi. A szisztémás gyulladás, oxidatív stressz és endothel-diszfunkció markereivel, valamint a vérnyomás értékekkel, máj- és vesefunkciós paraméterekkel megfigyelt összefüggésük arra utal, hogy a pro-inflammatorikus citokinek, kemokinek és adhézións molekulák megnövekedett mennyisége az anyai keringésben fontos szerepet játszik a praeclampsia anyai tünetegyüttesére jellemző kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakcióban és generalizált endothel-diszfunkcióban.

7. A pro-inflammatorikus IL-17A szérumszintje emelkedett praeclampsziában. A megnövekedett szérum IL-17A koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados hatása additív a praeclampsia kockázatában.
8. Az emelkedett szérum leptin koncentráció szignifikáns összefüggést mutat az interferon- γ -indukált protein-10 (IP-10) szérumszintjével praeclampsziában. Az emelkedett szérum leptin koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampsia rizikóját.
9. A Hsp70 emelkedett szérumszintje összefüggést mutat a szisztémás gyulladás, az oxidatív stressz és a hepatocelluláris károsodás markereivel praeclampsziában.
10. Az emelkedett szérum Hsp70 koncentráció szignifikáns összefüggésben áll az IL-12p40, az MCP-1, az ICAM-1 és a VCAM-1 szérumszintjével praeclampsziában. Továbbá az emelkedett szérum Hsp70 koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampsia kockázatát.
11. A humán Hsp60, mycobacterialis Hsp65 és humán Hsp70 elleni antitestek jelen vannak egészséges terhes nők perifériás vérében. Ezen antitestek szérumszintje azonban nem változik praeclampsziában.
12. A C1rC1sC1-INH és C3bBbP aktivációs komplexek plazmaszintje szignifikánsan emelkedett praeclampsziában, ami a komplementrendszer klasszikus és alternatív úton történő szisztémás aktiválódását mutatja, a terminális komplex (SC5b9) fokozott képződéséhez vezetve. A terminális komplex anyai keringésben mért excesszív mennyisége összefüggést mutat az intrauterin növekedési retardációval praeclampsziás terhesekben.
13. A fikolin-2 csökkent plazmaszintje praeclampsziában összefüggésben áll a trophoblast-törmelék és az endothel-diszfunkció markereivel, a vese-és májfunkciós paraméterekkel, valamint az sFlt-1 és PlGF szérumszintjével. A csökkent plazma fikolin-2 és fikolin-3 koncentráció azonban nem mutat kapcsolatot a komplement aktivációs markerek keringésben mért szintjével praeclampsziában.
14. Szövődménymentes terhességben a perifériás vérben található T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége intracelluláris VEGF-A expressziót mutat, azonban a VEGF-A-pozitív T (helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökken praeclampsziában.
15. Egészséges terhes nőkben a perifériás vérben található T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége, míg nem terhes nőkben csak egy kis hányada mutat intracelluláris galektin-1 expressziót. Praeclampsziában a galektin-1-pozitív T (helper és citotoxikus) és

- NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökken szövődménymentes terhességgel összehasonlítva.
16. Szövődménymentes terhességben a perifériás vérben található NK sejtek többsége, míg a citotoxikus T sejteknek csak egy kis hányada mutat intracelluláris granulizin expressziót. Praeclampsziában a granulizin-termelő citotoxikus T sejtek aránya a perifériás vérben kifejezetten megemelkedik, míg a granulizin-pozitív NK sejteké változatlan marad.
 17. A perifériás vérben található Th17 és regulátoros T sejtek arányának megemelkedése mellett az IL-17A-termelő citotoxikus T sejtek (Tc17) és NK sejtek prevalenciája is szignifikánsan magasabb praecclampsziában. Az IL-17A-termelő limfociták prevalenciája azonban nem mutat kapcsolatot a Th1 sejtekével praecclampsziában.
 18. Nemcsak a konvencionális $CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+$ regulátoros T sejtek, hanem a nem konvencionális $CD4^+ CD25^- FoxP3^+$ regulátoros T sejtek gyakorisága is szignifikánsan alacsonyabb a perifériás vérben praecclampsziában, mint szövődménymentes terhességben.
 19. A perifériás vérben található regulátoros T sejtek közül a funkcionálisan legaktívabb effektor regulátoros T sejtek ($CD4^+ FoxP3^{++} CD45RA^-$) gyakorisága csökken a legnagyobb mértékben, míg a naiv regulátoros T sejteké ($CD4^+ FoxP3^+ CD45RA^+$) változatlan marad praecclampsziában. Továbbá a kimerült, funkcionálisan kevésbé aktív $CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+ CD279^+$ regulátoros T sejtek gyakorisága szignifikánsan magasabb praecclampsziában. A thymicus ($CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+ Helios^+$) és extrathymicus ($CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+ Helios^-$) regulátoros T sejtek aránya nem különbözik egészséges és praecclampsziás terhesek között.
 20. Western blot módszerrel végzett méréseink szerint a kannabinoid receptor 1 (CB1) lepényi expressziója szignifikánsan nagyobb praecclampsziában, mint szövődménymentes terhességben. A CB1 immunhisztokémiai festődés kifejezetten erősebb a syncytiotrophoblast rétegben, a boholy mesenchymában, a boholykapillárisok endothel- és simaizomsejtjeiben, a decíduában, valamint az amnionban. A kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziója és immunreaktivitása azonban nem mutat különbséget praecclampsziás és egészséges terhesek között.
 21. Az anandamid szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb praecclampsziában, mint szövődménymentes terhességben, azonban nem mutat összefüggést az sFlt-1 és PlGF szérumszintjével.
 22. Az ösztrogén receptor α gén PvuII (rs2234693) és XbaI (rs9340799) T-A haplotípusának homozigóta hordozói szignifikánsan magasabb kockázattal rendelkeznek súlyos

praeeklampsziára. Továbbá az XbaI polimorfizmus GG genotípusát hordozó súlyos praeeklampsziás terhesek kockázata szignifikánsan alacsonyabb intrauterin növekedési retardációra.

23. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmus mutáns (TNF2 vagy A) alléljét hordozó terhesek kockázata súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeeklampsziára szignifikánsan magasabb, mint a nem hordozóké.
24. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusa nem mutat összefüggést a praeeklampsziával a közép-magyarországi kaukázusi populációban.

6. Saját közlemények jegyzéke

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben

1. **Molvarec A***, Vér A*, Fekete A, Rosta K, Derzbach L, Derzsy Z, Karádi I, Rigó J Jr. Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens Res* 2007; 30: 205-211.

* megosztott első szerzők

IF: 2,951

2. **Molvarec A**, Jermendy A, Nagy B, Kovács M, Várkonyi T, Hupuczi P, Prohászka Z, Rigó J Jr. Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *Clin Chim Acta* 2008; 392: 52-57.

IF: 2,960

3. **Molvarec A**, Jermendy A, Kovács M, Prohászka Z, Rigó J Jr. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and preeclampsia: lack of association in a Caucasian population. *Hypertens Res* 2008; 31: 859-864.

IF: 3,146

4. **Molvarec A**, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 151-159.

IF: 2,167

5. **Molvarec A**, Rigó J Jr, Böze T, Derzsy Z, Cervenak L, Makó V, Gombos T, Udvardy ML, Hárshfalvi J, Prohászka Z. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost* 2009; 101: 305-311.

IF: 4,451

6. **Molvarec A**, Derzsy Z, Kocsis J, Bőze T, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 491-498.
IF: 2,167
7. **Molvarec A**, Tamási L, Losonczy G, Madách K, Prohászka Z, Rigó J Jr. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15: 237-247.
IF: 3,162
8. Stenczer B, Rigó J Jr, Prohászka Z, Derzsy Z, Lázár L, Makó V, Cervenak L, Balogh K, Mézes M, Karádi I, **Molvarec A**. Plasma osteopontin concentrations in preeclampsia - is there an association with endothelial injury? *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 181-187.
IF: 2,069
9. Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, **Molvarec A**. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol* 2010; 47: 1500-1506.
IF: 2,916
10. **Molvarec A**, Szarka A, Walentin S, Szűcs E, Nagy B, Rigó J Jr. Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res* 2010; 33: 892-898.
IF: 2,353
11. **Molvarec A**, Ito M, Shima T, Yoneda S, Toldi G, Stenczer B, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 567.e1-8.
IF: 3,313
12. Csuka D, **Molvarec A**, Derzsy Z, Varga L, Füst G, Rigó J Jr, Prohászka Z. Functional analysis of the mannose-binding lectin complement pathway in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2010; 87: 90-96.
IF: 2,204

13. Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Bekő G, **Molvarec A**. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11: 59.
IF: 3,000
14. **Molvarec A**, Blois SM, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol* 2011; 139: 48-56.
IF: 4,046
15. Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vásárhelyi B, **Molvarec A**. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66: 223-229.
IF: 3,050
16. **Molvarec A**, Szarka A, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1957-1962.
IF: 2,535
17. **Molvarec A**, Shiozaki A, Ito M, Toldi G, Stenczer B, Szarka A, Nakashima A, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2011; 91: 56-63.
IF: 2,966
18. **Molvarec A**, Szarka A, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 124.
IF: 2,045
19. Szarka A, Walentin Sz, Lázár L, Nagy B, Rigó J Jr, **Molvarec A**. Keringő angiogén faktorok vizsgálata praeeclampsziában. *Magy Nőorv L* 2011; 74(5): 28-37.

20. Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, **Molvarec A**. The frequency of peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ and CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68: 175-180.
IF: 3,317
21. Halmos A, Rigó J Jr, Szijártó J, Füst G, Prohászka Z, **Molvarec A**. Circulating ficolin-2 and ficolin-3 in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2012; 169: 49-56.
IF: 3,409
22. **Molvarec A**, Szarka A, Lázár L, Bekő G, Rigó J Jr. A szérum citokinprofil vizsgálata szövődménymentes terhességben és praeclampsiaiban. *Magy Nőorv L* 2012; 75(2): 10-20.
23. Gullai N, Stenczer B, **Molvarec A**, Fügedi G, Veresh Z, Nagy B, Rigó J Jr. Evaluation of a rapid and simple placental growth factor test in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res* 2013; 36: 457-462.
IF: 2,936
24. **Molvarec A**, Gullai N, Stenczer B, Fügedi G, Nagy B, Rigó J Jr. Comparison of placental growth factor and fetal flow Doppler ultrasonography to identify fetal adverse outcomes in women with hypertensive disorders of pregnancy: an observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13: 161.
IF: 2,152
25. Gullai N, **Molvarec A**, Kauker B, Rigó J Jr. A placentáris növekedési faktor (PlGF) prognosztikai szerepe magas vérnyomással szövődményes terhesség esetén. *Hypertonia és Nephrologia* 2013; 17(3-4): 123-129.
26. Fügedi G, Molnár M, Rigó J Jr, Schönléber J, Kovalszky I, **Molvarec A**. Increased placental expression of cannabinoid receptor 1 in preeclampsia: an observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014; 14: 395.
IF: 2,190
27. Alasztics B, Gullai N, **Molvarec A**, Rigó J Jr. Az angiogén faktorok szerepe praeclampsiaiban. *Orv Hetil* 2014; 155: 1860-1866.
28. **Molvarec A**, Fügedi G, Szabó E, Stenczer B, Walentin S, Rigó J Jr. Decreased circulating anandamide levels in preeclampsia. *Hypertens Res* 2015; 38: 413-418.
IF: 2,658 (2014)

29. Toldi G, Vásárhelyi ZE, Rigó J Jr, Orbán C, Tamássy Z, Bajnok A, Shima T, Saito S, **Molvarec A**. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2015; 74: 110-115.
IF: 2,438 (2014)
30. **Molvarec A**, Czegle I, Szijártó J, Rigó J Jr. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2015; 112: 53-57.
IF: 2,815 (2014)
31. **Molvarec A**. A praeclampsia kialakulásának immunológiai háttere. In: Fülöp V (szerk.). *Az immunológia időszerű kérdései a humánreprodukcióban II.* Egyetemi tankönyv. Miskolci Egyetemi Kiadó, Miskolc Egyetemváros, 2016 (megjelenés alatt).

6.2. A Ph.D. értekezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben

1. Szalay J, **Molvarec A**. A női genitalis tractus higiéniája. *Komplementer Medicina* 2000; 4(8): 35-38.
2. **Molvarec A**, Szalay J. A természetes mikronizált progeszteron hüvelyi alkalmazásával szerzett kezdeti tapasztalataink korai spontán vetélés ismétlődésének megelőzésében és bizonyítottan sárgatest-elégtelenségben szenvedő habituális vetélő nők kezelésében. *Magy Nőorv L* 2001; 64(4): 303-308.
3. **Molvarec A**, Szalay J. A dysmenorrhoea és kezelése. *Családorvosi Fórum* 2005; 6(7): 25-30.
4. Rigó J, Szendei G, Rosta K, Fekete A, Bögi K, **Molvarec A**, Rónai Z, Vér A. Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22: 521-525.
IF: 0,995
5. **Molvarec A**, Szalay J. Nőgyógyászati vérzészavarok. *Családorvosi Fórum* 2006; 7(6): 41-47.
6. **Molvarec A**, Bábinszki A, Kovács K, Tóth F, Szalay J. Intrauterine intestinal obstruction due to fetal midgut volvulus: a report of two cases. *Fetal Diagn Ther* 2007; 22: 38-40.
IF: 0,844
7. **Molvarec A**, Nagy B, Kovács M, Walentin S, Imreh E, Rigó J Jr, Szalay J, Füst G, Prohászka Z, Karádi I. Lipid, haemostatic and inflammatory variables in relation to the

estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms. Clin Chim Acta 2007; 380: 157-164.

IF: 2,601

8. **Molvarec A**, Széplaki G, Kovács M, Széplaki Z, Fazakas A, Prohászka Z, Füst G, Karádi I. Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. Clin Chim Acta 2007; 382: 100-105.

IF: 2,601

9. Nagy B, Savli H, **Molvarec A**, Várkonyi T, Rigó B, Hupuczi P, Rigó J Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analyses. Clin Chim Acta 2008; 389: 126-131.

IF: 2,960

10. Madách K*, **Molvarec A***, Rigó J Jr, Nagy B, Péntes I, Karádi I, Prohászka Z. Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008; 139: 133-138.

* megosztott első szerzők

IF: 1,565

11. Szarka A, Gerlei Zs, Berkes E, Kóbori L, **Molvarec A**, Garamvölgyi Z, Rigó J Jr. Májtranszplantációt követően sikeresen kiviselt terhesség. Magy Nőorv L 2008; 71(6): 277-279.

12. Rosta K*, **Molvarec A***, Enzsöly A, Nagy B, Rónai Z, Fekete A, Sasvári-Székely M, Rigó J Jr, Vér A. Association of extracellular superoxide dismutase (SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 142: 134-138.

* megosztott első szerzők

IF: 1,582

13. **Molvarec A**, Kalabay L, Derzsy Z, Szarka A, Halmos A, Stenczer B, Arnaud P, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Preeclampsia is associated with decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein (fetuon-A) concentration. Hypertens Res 2009; 32: 665-669.

IF: 2,426

14. Nagy B, Várkonyi T, **Molvarec A**, Lázár L, Hupuczi P, Than NG, Rigó J. Leptin gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia and HELLP syndrome. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 1033-1037.
IF: 1,886
15. Lázár L, Rigó J Jr, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z, **Molvarec A**. Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. BMC Med Genet 2009; 10: 120.
IF: 2,840
16. Jeager J, Schuler Zs, **Molvarec A**, Perlaki M, Sassi L, Kőhalmi B, Silhavy M, Harmath Á, Rigó J, Görbe É. Prevention of bronchopulmonary dysplasia by infants that have an increased risk for the development of the disease. Clin Exp Med J 2009; 3: 463-477.
17. Tamási L, Bohács A, Tamási V, Stenczer B, Prohászka Z, Rigó J Jr, Losonczy G, **Molvarec A**. Increased circulating heat shock protein 70 levels in pregnant asthmatics. Cell Stress Chaperones 2010; 15: 295-300.
IF: 3,162
18. Várkonyi T, Lázár L, **Molvarec A**, Than NG, Rigó J Jr, Nagy B. Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. BMC Med Genet 2010; 11: 25.
IF: 2,439
19. Görbe E, Vámos R, Joó GJ, Jeager J, **Molvarec A**, Berecz B, Horváth A, Sulya B, Rigó J Jr. Perioperative analgesia of infants during the therapy for retinopathy of prematurity. Med Sci Monit 2010; 16: CR186-189.
IF: 1,699
20. Lázár L, Nagy B, **Molvarec A**, Rigó J Jr. A vérplazma összes szabad DNS, valamint szabad magzati DNS mennyisége praeclampsiaával szövődött és szövődménymentes terhességek esetében. Orv Hetil 2010; 151: 784-787.
21. Bohács A, Cseh A, Stenczer B, Müller V, Gálffy G, **Molvarec A**, Rigó J Jr, Losonczy G, Vásárhelyi B, Tamási L. Effector and regulatory lymphocytes in asthmatic pregnant women. Am J Reprod Immunol 2010; 64: 393-401.
IF: 2,451

22. Toldi G, Stenczer B, **Molvarec A**, Takáts Z, Bekő G, Rigó J Jr, Vászárhelyi B. Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. Clin Chem Lab Med 2010; 48: 1423-1426.
IF: 2,069
23. Gullai N, Szűcs M, Debreczeni-Mór A, Stenczer B, **Molvarec A**, Rigó J Jr. Meteorológiai tényezők és a praeeclampsia előfordulási gyakoriságának összefüggései. Magy Nőorv L 2010; 73(5): 225-228.
24. Toldi G, Stenczer B, Treszl A, Kollár S, **Molvarec A**, Tulassay T, Rigó J, Vászárhelyi B. Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. Am J Reprod Immunol 2011; 65: 154-163.
IF: 3,050
25. Szabó G, **Molvarec A**, Stenczer B, Rigó J Jr, Nagy B. Natriuretic peptide precursor B gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia. Clin Chim Acta 2011; 412: 1371-1375.
IF: 2,535
26. Kovács EM, **Molvarec A**, Rigó J Jr, Szabó A. Bilateral serous retinal detachment as a complication of acquired peripartum thrombotic thrombocytopenic purpura bout. J Obstet Gynaecol Res 2011; 37: 1506-1509.
IF: 0,942
27. Stenczer B, **Molvarec A**, Veresh Z, Gullai N, Nagy GR, Walentin S, Sziójártó J, Rigó J Jr. Circulating levels of the anti-angiogenic thrombospondin 2 are elevated in pre-eclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 2011; 90: 1291-1295.
IF: 1,771
28. Toldi G, Bíró E, Szalay B, Stenczer B, **Molvarec A**, Rigó J, Vászárhelyi B, Bekő G. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in healthy pregnancy and preeclampsia. Clin Chem Lab Med 2011; 49: 1873-1876.
IF: 2,150
29. Toldi G, **Molvarec A**, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, Bikov A, Rigó J Jr, Vászárhelyi B, Losonczy G, Tamási L. Peripheral T(h)1/T(h)2/T(h)17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. Int Immunol 2011; 23: 669-677.
IF: 3,415

30. Nagy B, **Molvarec A**, Hupuczi P, Rigó J Jr. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben. *Magy Nőorv L* 2011; 74(1): 10-14.
31. Stenczer B, **Molvarec A**, Szabó G, Szarka A, Fügedi G, Szijártó J, Rigó J Jr. Circulating levels of thrombospondin-1 are decreased in HELLP syndrome. *Thromb Res* 2012; 129: 470-473.
IF: 3,133
32. Kollár S, Sándor N, **Molvarec A**, Stenczer B, Rigó J Jr, Tulassay T, Vásárhelyi B, Toldi G. Prevalence of intracellular galectin-1-expressing lymphocytes in umbilical cord blood in comparison with adult peripheral blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 1608-1613.
IF: 3,940
33. Lázár L, Nagy B, **Molvarec A**, Szarka A, Rigó J Jr. Role of hsa-miR-325 in the etiopathology of preeclampsia. *Mol Med Rep* 2012; 6: 597-600.
IF: 1,170
34. Szabó G, **Molvarec A**, Stenczer B, Rigó J Jr, Nagy B. A natriureticus peptid prekursor B-gén (TTTC)n polimorfizmusa súlyos praeclampsziával szövődött terhességben. *Magy Nőorv L* 2012; 75(1): 22-27.
35. Toldi G, Vásárhelyi B, Biró E, Fügedi G, Rigó J Jr, **Molvarec A**. B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase expression in peripheral blood of healthy pregnant and pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69: 264-271.
IF: 2,668
36. Szabó G, **Molvarec A**, Nagy B, Rigó J Jr. Increased B-type natriuretic peptide levels in early-onset versus late-onset preeclampsia. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 281-288.
IF: 2,707
37. Blois SM, Gueuvoghlian-Silva BY, Tirado-Gonzalez I, Torloni MR, Freitag N, Mattar R, Conrad ML, Unverdorben L, Barrientos G, Knabl J, Toldi G, **Molvarec A**, Rose M, Markert UR, Jeschke U, Daher S. Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 644-649.
IF: 3,747
38. Szelényi Z, Fazakas A, Szénási G, Kiss M, Tegze N, Fekete BC, Nagy E, Bodó I, Nagy B, **Molvarec A**, Patócs A, Pepó L, Prohászka Z, Vereckei A. Inflammation and oxidative stress caused by nitric oxide synthase uncoupling might lead to left

ventricular diastolic and systolic dysfunction in patients with hypertension. *J Geriatr Cardiol* 2015; 12: 1-10.

IF: 1,395 (2014)

39. Garamvölgyi Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Kecskeméti A, **Molvarec A**. Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20: 575-581.

IF: 3,163 (2014)

40. Szelényi Z, Fazakas A, Szénási G, Tegze N, Fekete B, **Molvarec A**, Hadusfalvy-Sudár S, Jánosi O, Kiss M, Karádi I, Vereckei A. The mechanism of reduced longitudinal left ventricular systolic function in hypertensive patients with normal ejection fraction. *J Hypertens* 2015; 33: 1962-1969.

IF: 4,720 (2014)

41. Fazakas A, Szelényi Z, Szénási G, Nyíró G, Szabó PM, Patócs A, Tegze N, Fekete BC, **Molvarec A**, Nagy B, Jakus J, Örsi F, Karádi I, Vereckei A. Genetic predisposition in patients with hypertension and normal ejection fraction to oxidative stress. *J Am Soc Hypertens* 2016; 10: 124-132.

IF: 2,606 (2014)

42. Szilágyi A, Jakab A, **Molvarec A**. A nőgyógyászati endokrinológia legújabb eredményei, fejlődési irányai. *Magy Nőorv L* 2016; 79(1): 21-29.

6.3. A Ph.D. értekezésben tárgyalt „in extenso” közlemények időrendben

1. **Molvarec A**, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J Jr. Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 780-786.

IF: 2,960

2. **Molvarec A**, Prohászka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J Jr. Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol* 2007; 73: 172-179.

IF: 3,011

3. **Molvarec A**, Rigó J Jr, Nagy B, Walentin S, Szalay J, Füst G, Karádi I, Prohászka Z. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. J Reprod Immunol 2007; 74: 163-169.

IF: 3,011

7. Tudománymetriai adatok

Összesített impakt faktor:	157,63
Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora:	100,71
ebből második szerzőként megosztott első szerzős:	3,147
Összes hivatkozások száma:	1409
Független hivatkozások száma:	1173
Hirsch index:	23
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	73,416
ebből első és utolsó szerzős:	68,276
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények független hivatkozásainak száma:	789
A Ph.D. értekezésben nem tárgyalt további közlemények impakt faktora:	75,232
A Ph.D. értekezésben tárgyalt közlemények impakt faktora:	8,982

8. Köszönetnyilvánítás

Első helyen szeretnék köszönetet mondani **Rigó János professzor úrnak**, aki a Ph.D. értekezésem megvédését követően a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikára meghívott, és az azóta eltelt közel egy évtized alatt mindenben támogatta tudományos tevékenységemet.

Hálás köszönettel tartozom **Karádi István professzor úrnak**, az MTA levelező tagjának, hogy tudományos érdeklődésemet a praeeclampsia felé terelte, és hogy a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutató Laboratóriumában lehetőséget biztosított kutatómunkám elvégzéséhez.

Köszönetemet fejezem ki **Füst György és Prohászka Zoltán professzor uraknak**, hogy a III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutató Laboratóriumában segítették tudományos munkámat, aminek eredményeként a Ph.D. értekezésem megvédését követően is számos közös közlemény született. Füst György Professzor Úr doktori értekezésem elkészültét sajnos nem érthette meg.

Köszönettel tartozom **Shigeru Saito professzor úrnak**, a Journal of Reproductive Immunology főszerkesztőjének, hogy a Matsumae International Foundation posztdoktori ösztöndíjával a Toyamai Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 6 hónapot tölthettem és kutatómunkát végezhettem. Tudományos együttműködésünk hazatérésemet követően is folytatódott és több közös közlemény megszületéséhez vezetett. Shigeru Saito professzor úrnak a Semmelweis Egyetem 2015-ben tiszteletbeli doktori címet (Doctor Honoris Causa) adományozott.

Köszönetet szeretnék mondani **Toldi Gergelynek, Vásárhelyi Barna professzor úrnak, Stenczer Baláznak, néhai Lázár Leventének, Nagy Bálintnak, Bekő Gabriellának, Szijártó Jánosnak, Molnár Miklós dékánhelyettes úrnak, Schönleber Júliának, Kovalszky Ilona professzor asszonynak, Szabó Eszternek, Kocsis Juditnak, Cervenak Lászlónak, Csuka Dorottyanak, Makó Veronikának, Gombos Tímeának, Mézes Miklós professzor úrnak**, az MTA rendes tagjának, **Balogh Krisztiánnak, Hársfalvi Jolánnak, Udvardy Miklós Lászlónak, Vér Ágotának, Rosta Klárának, Jermendy Ágnesnek**, valamint **Tamási Lillának**, akik hozzájárultak a doktori értekezésem alapjául szolgáló közlemények létrejöttéhez.

Köszönöm **Kovács Margitnak, Szűcsné Walentin Szilviának, Szigeti Antalnénak, Bíró Edinának és Végh Editnek** a laboratóriumi meghatározásokban nyújtott segítségét.

Köszönet illeti feleségemet, **Czegle Ibolya** belgyógyászt, klinikai onkológust, hogy megértette és támogatta tudományos kutatás iránti elkötelezettségemet.

A doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkát a **Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar**, a **Magyar Hypertonia Társaság**, valamint az **Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok** T 049531 és PD 109094 pályázata támogatta.