

MTA Doktori Értekezés

**Angiogén és immunológiai tényezők vizsgálata
praeclampsiaiban**

Dr. Molvarec Attila

Semmelweis Egyetem

I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika



Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Az értekezésben szereplő rövidítések jegyzéke.....	7
1. Bevezetés	12
1.1. A praeclampsia klinikai jelentősége, epidemiológiája és kockázati tényezői	12
1.2. A praeclampsia kóreredete és patogenezise.....	15
1.2.1. A praeclampsia kialakulásának kétlépcsős modellje	16
1.2.2. A placentáció zavara praeclampsziában	18
1.2.3. Első lépcső (preklinikai fázis): az „első interface” immunológiai folyamatai	19
1.2.4. Második lépcső (klinikai fázis): a „második interface” immunológiai folyamatai	20
1.2.5. Az angiogén egyensúlyzavar szerepe a praeclampsia kialakulásában.....	22
1.2.6. Az immunreguláció zavara praeclampsziában.....	24
1.2.7. Maternális praeclampsia.....	26
2. Célkitűzések	27
3. Betegek és vizsgálati módszerek.....	30
3.1. A vizsgálatokban részt vevő terhes és nem terhes nők.....	30
3.2. A biológiai minták levétele, előkészítése és tárolása	31
3.3. A szérum sFlt-1 és PlGF koncentráció meghatározása	32
3.4. A vérplazma PlGF koncentrációjának meghatározása „betegágy melletti” gyorseszteszt segítségével.....	32
3.5. A vérplazma ADAMTS13 aktivitásának meghatározása	33
3.6. A vérplazma von Willebrand faktor antigén szintjének meghatározása	33
3.7. A von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata.....	34
3.8. A szérum citokin, leptin és a plazma oszteopontin szintek vizsgálata	34
3.9. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének meghatározása	35
3.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása	36
3.12. A komplementrendszer vizsgálata.....	37

3.13. A szérumb C-reaktív protein (CRP) koncentráció meghatározása.....	38
3.14. A vérplazma szabad magzati DNS mennyiségének meghatározása.....	38
3.15. A vérplazma malondialdehid és fibronectin szintjének meghatározása.....	39
3.16. A limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata.....	39
3.17. A limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata	40
3.18. A limfociták intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata	41
3.19. Az IL-17A-termelő limfociták, a Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata	41
3.20. A konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata	42
3.21. A regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának vizsgálata	42
3.22. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepenyi expressziójának vizsgálata	43
3.23. Az anandamid szérumszintjének meghatározása.....	45
3.24. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata	45
3.25. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata.	46
3.26. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata	47
3.27. Statisztikai módszerek	47
4. Eredmények	49
4.1. A szérumb sFlt-1 és PlGF koncentráció vizsgálata praeclampsziában elektrokemilumineszcens immunoassay útján.....	49
4.2. A „betegágy melletti” PlGF gyorseszteszt diagnosztikus hatékonyságának és prognosztikai értékének vizsgálata magas vérnyomással szövődött terhességekben	55
4.3. A PlGF gyorseszteszt és a magzati flowmetria összehasonlítása a kedvezőtlen magzati kimenetel azonosításában magas vérnyomással szövődött terhességekben	61
4.4. A vérplazma ADAMTS13 aktivitásának, von Willebrand faktor antigén szintjének és a von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata praeclampsziában	65

4.5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampszában.....	67
4.6. A szérumbcitokin profil vizsgálata praeclampszában	70
4.7. A szérumb leptin koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhéziós molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampszában.....	77
4.8. A Hsp70 (HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel.....	79
4.9. A szérumb Hsp70 (HSPA1A) koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhéziós molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampszában.....	82
4.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampszában	84
4.11. A komplementrendszer vizsgálata praeclampszában	86
4.12. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata praeclampszában.....	90
4.13. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata praeclampszában.....	91
4.14. A perifériás vérben található citotoxikus T sejtek és NK sejtek intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata praeclampszában.....	93
4.15. A perifériás vérben található IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának meghatározása praeclampszában	95
4.16. A perifériás vérben található konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata praeclampszában	98
4.17. A perifériás vérben található regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának meghatározása praeclampszában.....	100
4.18. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepenyi expressziójának vizsgálata praeclampszában.....	103
4.19. Az anandamid szérumszintjének meghatározása praeclampszában.....	108
4.20. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata praeclampszában.....	110

4.21. A tumor nekrozis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsziában és HELLP-szindrómában	115
4.22. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata praeclampsziában	118
5. Megbeszélés.....	122
5.1. A szérum sFlt-1 és PlGF koncentráció vizsgálata praeclampsziában elektrokemilumineszcens immunoassay útján.....	122
5.2. A „betegágy melletti” PlGF gyorseszteszt diagnosztikus hatékonyságának és prognosztikai értékének vizsgálata magas vérnyomással szövődött terhességekben	123
5.3. A PlGF gyorseszteszt és a magzati flowmetria összehasonlítása a kedvezőtlen magzati kimenetel azonosításában magas vérnyomással szövődött terhességekben	124
5.4. A vérplazma ADAMTS13 aktivitásának, von Willebrand faktor antigén szintjének és a von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata praeclampsziában	125
5.5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampsziában.....	126
5.6. A szérum citokin profil vizsgálata praeclampsziában	127
5.7. A szérum leptin koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhézis molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampsziában.....	128
5.8. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel	129
5.9. A szérum Hsp70 (HSPA1A) koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhézis molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampsziában.....	131
5.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampsziában	132
5.11. A komplementrendszer vizsgálata praeclampsziában	133
5.12. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata praeclampsziában.....	137
5.13. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata praeclampsziában.....	138

5.14. A perifériás vérben található citotoxikus T sejtek és NK sejtek intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata praeeclampsziában.....	139
5.15. A perifériás vérben található IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciájának meghatározása praeeclampsziában	140
5.16. A perifériás vérben található konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata praeeclampsziában	141
5.17. A perifériás vérben található regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának meghatározása praeeclampsziában.....	142
5.18. A kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) lepényi expressziójának vizsgálata praeeclampsziában.....	144
5.19. Az anandamid szérum szintjének meghatározása praeeclampsziában.....	146
5.20. Az ösztrogén receptor α (ESR1) gén PvuII (c.454-397T>C, rs2234693) és XbaI (c.454-351A>G, rs9340799) polimorfizmusának vizsgálata praeeclampsziában.....	147
5.21. A tumor nekrosis faktor- α gén G-308A (rs1800629) polimorfizmusának vizsgálata praeeclampsziában és HELLP-szindrómában	148
5.22. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G, rs4986790) és Thr399Ile (C1196T, rs4986791) polimorfizmusának vizsgálata praeeclampsziában	149
6. Az új tudományos eredmények összefoglalása	152
7. Irodalomjegyzék	156
8. Saját közlemények jegyzéke	192
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben	192
8.2. A Ph.D. értekezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai „in extenso” közlemények időrendben	196
8.3. A Ph.D. értekezésben tárgyalt „in extenso” közlemények időrendben	201
9. Tudósnymetriai adatok	203
10. Köszönetnyilvánítás	204

Az értekezésben szereplő rövidítések jegyzéke

A	adenin
ABTS	azino-bisz-etilbenzotiazolin-szulfonsav
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADAMTS13	A Disintegrin-like And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif, member 13
ANCOVA	kovariancia analízis
Ang	angiopoietin
ANOVA	varianciaanalízis
APC	allofikocianin
APC-Cy7	allofikocianin-cianin 7
Asp	aszpartát
AT1	angiotenzin receptor 1
AU	önkéntes egység (Arbitrary Unit)
AUC	görbe alatti terület
β	standardizált regressziós együttható
BMI	testtömeg index
BSA	marha szérum albumin
C	citozin
C1-INH	C1-inhibitor
CB	kannabinoid receptor
CCR4	kemokin receptor 4
CD	differenciálódási antigének rendszere (cluster of differentiation)
CEU	Utah állambeli lakosok észak- és nyugat-európai származással
CHT	krónikus hipertónia
CI	konfidencia intervallum
CRH	corticotrop releasing hormon
CRP	C-reaktív protein
CSF	kolóniastimuláló faktor
CTG	kardiotokográfia
CTLA-4	citotoxikus T limfocita antigén 4
CXCL10	CXC motif ligand 10

CXCR3	CXC motíf receptor 3
DAB	diaminobenzidin
df	szabadságfok (degree of freedom)
DIC	disszeminált intravaszkuláris koaguláció
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát
DTT	ditiotreitól
E	egység
ECL	felerősített kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
EM	Expectation-Maximization (a várható érték maximalizálásán alapuló módszer)
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid szintáz
EPC	endothelialis progenitor sejt
ESR1	ösztrogén receptor α
FAAH	zsírsav-amid hidroláz
FACS	áramlási citometria (fluorescence-activated cell sorting)
FcRL3	Fc receptor-like protein 3
fgl2	fibrinogen-like protein 2
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
Flk-1	fetal liver kinase-1
Flt-1	fms-szerű tirozin kináz-1
FoxP3	forkhead box P3
FRETs	fluoreszcens rezonancia energia transzfer szubsztrát
G	guanin
GHT	gesztációs hipertónia
Gly	glicin
GM-CSF	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
GOT	glutamát-oxálacetát-transzamináz
GPT	glutamát-piruvát-transzamináz
HELLP	hemolízis, emelkedett májenzim értékek, alacsony trombocitaszám

HEPES	hidroxietil-piperazin-etánszulfonsav
HLA	humán leukocita antigén
HPLC-MS	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria
HRP	torma peroxidáz
Hsp, HSP	hőszokkfehérje
ICAM	intercelluláris adhézións molekula
IDO	indolamin 2,3-dioxigenáz
IF	impakt faktor
IFN	interferon
Ig	immunglobulin
IHC	immunhisztokémia
IL	interleukin
IL-1ra	IL-1 receptor antagonista
Ile	izoleucin
IP	interferon- γ -indukált protein
IUGR	intrauterin növekedési retardáció
kDa	kiloDalton
KDR	kináz inzert domén tartalmú receptor
KIR	killer immunglobulinszerű receptor
Ko	kontroll csoport
Lag-3	limfocita aktivációs gén 3
LCI	konfidencia intervallum alsó határa
LD	linkage (kapcsoltsági) disequilibrium
LDH	laktát-dehidrogenáz
LIF	leukémia gátló faktor
LOX-1	lektinszerű oxidált LDL (alacsony sűrűségű lipoprotein) receptor-1
LP	a terhesség időtartama
M	mol/l
MAPK1	mitogén-aktivált protein kináz 1
MASP2	MBL-asszociált szerin proteáz 2
MBL	mannóz-kötő lektin
MCP	monocita kemotaktikus protein
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MIP	makrofág inflammatorikus protein

mRNS	hírvivő ribonukleinsav
n.a.	nem alkalmazható
NAPE-PLD	N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz-D
NHBPEP	National High Blood Pressure Education Program
NICE	National Institute for Health and Clinical Excellence
NK sejt	természetes ölő sejt
n.m.	nem mérve
NO	nitrogén-monoxid
NS	nem szignifikáns
OPD	orto-feniléndiamin
OR	esélyhányados
p	statisztikai szignifikancia érték
P	properdin
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat
PC5	fikoeritrin-cianin 5
PCR	polimeráz láncreakció
PD-1	programmed death receptor 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PE	fikoeritrin
PE	praeclampsia
PE-Cy7	fikoeritrin-cianin 7
PerCP	peridinin-klorofill
PGI₂	prosztaciklin
PIGF	placentáris növekedési faktor
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
PVDF	polivinilidén-fluorid
R	Spearman-féle korrelációs együttható
RFLP	restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus
RNS	ribonukleinsav
ROC	Receiver Operating Characteristic

ROR	RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor
rs	referencia SNP (egyponos nukleotid variáció) azonosító szám
SC5b9	terminális komplex
SD	szórás (standard deviáció)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
sEng	szolubilis endoglin
sFlt-1	szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1
SIPE	rarakódásos praeclampsia
SNP	egyponos nukleotid variáció
SRY	az Y kromoszóma szex-determináló régiója
STAT-5	signal transducer and activator of transcription 5
T	timin
TBS	Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat
TBS-T	Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat
Tc	citotoxikus T sejt
TGF	transzformáló növekedési faktor
Th	helper T sejt
Thr	treonin
Tie	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF (epidermal growth factor)-like domains
TNF	tumor nekrosis faktor
Treg	regulátoros T sejt
TRPV1	1-es típusú vanilloid receptor
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
UCI	konfidencia intervallum felső határa
UV	ultraibolya
VCAM	vaszkuláris sejtadhéziós molekula
VEGF	vaszkuláris endothelialis növekedési faktor
VEGFR	vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor
VWF	von Willebrand faktor
VWF:Ag	von Willebrand faktor antigén
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

1.1. A praeclampsia klinikai jelentősége, epidemiológiája és kockázati tényezői

A praeclampsia a „nagy szülészeti szindrómák” közé tartozik, és az anyai és perinatális morbiditás és mortalitás egyik vezető oka még a fejlett országokban is (1, 2). 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 (2). A krónikus hipertónia talaján kialakult praeclampsias állapotot ráakódásos praeclampsia néven különböztetjük el. A praeclampsia több mint terhesség-indukálta hipertónia, a humán terhességre specifikus kórkép az egész anyai szervezetet érintő többszervi megbetegedés (3). A kórkép definitív megoldása a terhesség befejezése, a magzat és a méhlepény világra segítségével. Globális incidenciáját 4,6%-ra becsülik: legalacsonyabb a Kelet-Mediterrán WHO régióban 1,0%-kal, míg legmagasabb az Afrikai régióban 5,6%-kal (4). A praeclampsia késői kezdetű formája (≥ 34 . terhességi hét) jóval gyakoribb, mint a korai kezdetű praeclampsia (< 34 . hét) (5). 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 (6, 7).

A kórkép szövődményei révén mind az anya, mind a magzat életét és egészségét veszélyezteti (8).

Anyai szövődmények:

- Abruptio placentae
- Disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC)
- HELLP-szindróma
- Tüdőödéma/aspiráció
- Akut veseelégtelenség
- Eclampsia
- Májelégtelenség, májhematóma
- Stroke
- Anyai halálozás

Magzati szövődmények:

- Koraszülés
- Intrauterin növekedési retardáció
- Hipoxia, neurológiai károsodás
- Perinatális halálozás

Világszerte a közvetlen anyai halálozás 10-15%-áért a praeclampsia és eclampsia tehető felelőssé (9). Súlyos anyai szövődményei a központi idegrendszert, a májat, a vesét, a tüdőt és az alvadási rendszert érintik. A praeclampsia emelkedett perinatális morbiditással és mortalitással jár. Ennek oka elsősorban a koraszülés és az intrauterin növekedési retardáció gyakoribb előfordulása. A koraszülések 15%-ának hátterében a praeclampsia miatti indukált koraszülés áll (10).

Egyre több irodalmi adat támasztja alá, hogy a kórelőzményben szereplő praeclampsia fokozza a krónikus hipertónia, a koszorúér-betegség, a stroke, a kardiovaszkuláris mortalitás, a vénás tromboembólia, a veseelégtelenség, a 2-es típusú diabetes mellitus, a hypothyreosis, valamint a kognitív és pszichológiai zavarok kockázatát (11). A praeclampsia az újszülöttre nézve is jár hosszú távú következményekkel: a hipertónia, az inzulinrezisztencia, a diabetes mellitus, a neurológiai problémák, a stroke és a mentális zavarok kockázatát emeli (11). Ebben a koraszülés és az intrauterin növekedési retardáció gyakoribb előfordulása is szerepet játszik (12).

A praeclampsia első terhesgondozási vizit során azonosítható kockázati tényezőit Duckitt és Harrington dolgozta fel egy szisztémás review formájában (13). Kontrollált kohorsz tanulmányok eredménye szerint a praeclampsia kockázatát a következő tényezők emelik (a korrigálatlan relatív kockázatot és annak 95%-os konfidencia intervallumát is feltüntettem):

- Antifoszfolipid antitestek jelenléte: 9,72 (4,34-21,75)
- Praeclampsia diabetes mellitus: 3,56 (2,54-4,99)
- Kórelőzményben praeclampsia: 7,19 (5,85-8,83)
- Családi anamnézisben praeclampsia: 2,90 (1,70-4,93)
- Primiparitás: 2,91 (1,28-6,61)
- Gemini versus singularis terhesség: 2,93 (2,04-4,21)

- Trigemini versus gemini terhesség: 2,83 (1,25-6,40)
- Magas BMI az első megjelenéskor: 1,55 (1,28-1,88)
- Magas BMI a terhesség előtt: 2,47 (1,66-3,67)
- ≥ 130 Hgmm szisztolés vérnyomás az első megjelenéskor: 2,37 (1,78-3,15)
- ≥ 80 Hgmm diasztolés vérnyomás az első megjelenéskor: 1,38 (1,01-1,87)
- Idős anyai életkor (≥ 40 év) multiparákban: 1,96 (1,34-2,87)
- Idős anyai életkor (≥ 40 év) primiparákban: 1,68 (1,23-2,29)

Individuális tanulmányok azt mutatták, hogy a praeclampsia kockázata fokozott autoimmun betegség, vesebetegség és krónikus hipertónia fennállása esetén is, illetve ha 10 év vagy több telt el az előző terhesség óta (13, 14). A kórkép kockázata emelkedett afro-amerikai és filippínó-amerikai nőkben, illetve alacsony képzettség esetén (15-17). Egy, a terhesség alatti anyai fertőzések és a praeclampsia kapcsolatát vizsgáló szisztémás review és metaanalízis a húgyúti fertőzéssel (poolozott esélyhányados (OR): 1,57, 95%-os konfidencia intervallum (CI): 1,45-1,70) és a periodontális megbetegedéssel (poolozott OR: 1,76, 95% CI: 1,43-2,18) talált összefüggést (18). A terhesség alatti dohányzás azonban csökkenti a praeclampsia kockázatát (19). Az American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) állásfoglalása szerint mindaddig, amíg megfelelő prediktív teszt nem áll rendelkezésünkre a praeclampsia előrejelzésére, a kórelőzmény gondos felvétele és a kockázati tényezők feltárása az egyetlen és legjobb módszer azon terhesek kiszűrésére, akiknél a terhesség alatt a kórkép nagyobb eséllyel alakulhat ki (20). A National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) terhességi hipertóniák kezelésére vonatkozó irányelve a kockázati tényezőket magas és közepes csoportra osztotta (21). Az irányelv legalább 1 magas, vagy 2 közepes kockázati tényező jelenléte esetén a praeclampsia megelőzésére kisdózisú aszpirin szedését javasolja a 12. terhességi héttől a szülésig.

Magas kockázat:

- Krónikus hipertónia
- Krónikus vesebetegség
- Kórelőzményben terhességi hipertónia
- Diabetes mellitus
- Autoimmun betegség

Közepes kockázat:

- Anyai életkor ≥ 40 év
- Primiparitás
- Többes terhesség
- Utolsó terhesség óta eltelt idő >10 év
- BMI ≥ 35 kg/m² az első megjelenéskor
- Családi anamnézisben praeclampsia

1.2. A praeclampsia kóreredete és patogeneze

Bár az eclamsiát már 4000 évvel ezelőtt az egyiptomi Petrie (Kahun)-papyrusban is megemlítették, a világszerte zajló intenzív kutatás ellenére a praeclampsia kóreredete és patogeneze máig nem tisztázott teljes mértékben (22). Számos epidemiológiai adat utal immunológiai folyamatok szerepére a praeclampsia kóreredetében (23). A praeclampsia gyakrabban fordul elő primiparákban, mint multiparákban. A multiparitás protektív hatása azonban elvész, ha a terhesség új partnertől fogant (primipaternitás koncepció) (24). Skjaerven és munkatársai szerint azonban a partnercsere csak a szülések között eltelt hosszabb időintervallumon keresztül növeli a praeclampsia kockázatát (14). A primipaternitás koncepcióját mindenesetre alátámasztja az is, hogy a kórkép kockázata magasabb, ha a fogamzást megelőző házasság tartama az apával rövid, és így csak minimális apai spermaexpozíció előzi meg a terhességet, illetve ha a védekezés korábban barrier módszerrel történt (25, 26). Azt is megfigyelték, hogy az orális szex és a sperma lenyelése csökkenti a praeclampsia kockázatát (27). A praeclampsia incidenciája magasabb donor inseminatio, petesejt-, illetve embryodonatio esetében (28). Donor (heterológ) inseminatio esetén a magzat immunológiai szempontból szemi-allograftnak tekinthető, de a fogamzás előtt a biológiai apával spermaexpozíció nem történt. A petesejtdonatio esetében a magzat egy komplett allograft az anyai szervezet számára, de apai spermaexpozíció történt. Az asszisztált reprodukciós eljárások közül a praeclampsia incidenciája az embryodonatio eseteiben a legmagasabb, amikor a magzat komplett allograft és a fogamzást spermaexpozíció nem előzi meg a biológiai apával.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az anyai-magzati (apai) immunológiai maladaptatio elsődleges szerepet játszhat a praeclampsia kialakulásában (23, 29). A fogamzást megelőző tartós spermaexpozíció protektív hatását a következőkkel magyarázzák.

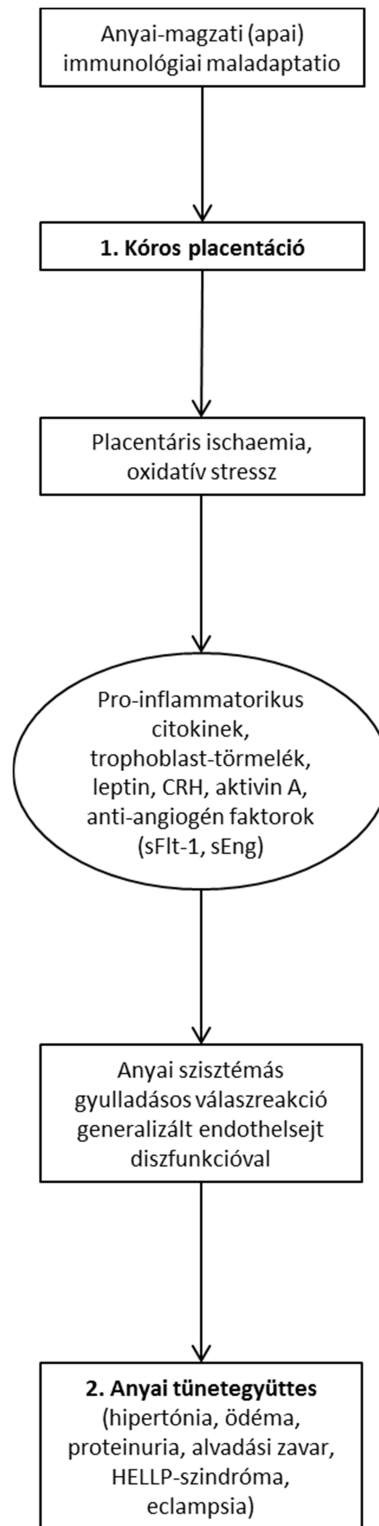
Az ondó apai MHC Ia, Ib és II. osztályú hisztokompatibilitási antigéneket tartalmaz, és a női genitális traktusba kerülve az azokra adott protektív immunválasz révén egy partner-specifikus mucosalis immuntoleranciát vált ki. Ez terhesség későbbi létrejöttékor ugyanattól a partnertől meggátolhatja a szemiallogén magzat apai antigénjei ellen irányuló immunválasz kialakulását (30). Ebben az ondóban magas koncentrációban található transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β)-nak tulajdonítanak elsődleges szerepet. A TGF- β képes indukálni a regulátoros T sejteket, amelyek több különböző mechanizmus révén immunszuppresszív hatást fejtenek ki. Egérkísérletben párosodást követően a regulátoros T sejtek expanzióját figyelték meg a méhet draináló paraaortikus nyirokcsomókban. A regulátoros T sejt-válasz és az immuntolerancia kialakulásához az ondónak mind az ondóplazma, mind a spermium komponensei szükségesek (31).

A praeclampsia patogenezisében a placentának központi szerepe van, amit alátámaszt az is, hogy definitív megoldása a terhesség lezárása a méhlepény megszületésével. A méhlepénnyel szemben a kórkép kialakulásának nem feltétele a magzat jelenléte, ugyanis komplett molaterhesség mellett is jelentkezhet (32). Továbbá a praeclampsia, HELLP-szindróma, illetve eclampsia postpartum eseteiben méhkaparással (a visszamaradt mikroszkopikus lepenyrészek eltávolításával) gyógyulás érhető el (33). A placentának azonban nem feltétlenül szükséges kórosan fejlődnie a kórkép létrejöttéhez.

1.2.1. A praeclampsia kialakulásának kétlépcsős modellje

A leginkább elfogadott elmélet szerint a praeclampsia kialakulása két lépcsőben történik (1. ábra). 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 (34). Immunológiai folyamatok mindkét lépcsőben részt vesznek, de azok más antigének és effektorok közreműködésével, más ún. immunológiai határfelületen (interface-en) zajlanak (29).

Az „első interface” immunológiai történései, amelyek a kétlépcsős modell első fázisáért felelősek, az anyai immunsejtek (uterinális NK sejtek, T limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek) és az extravillosus cytotrophoblast sejtek között zajlanak a lepenyi ágyban (35). Az uterinális NK sejtek már a koraterhességi deciduában jelen vannak, a terhesség első felében a deciduális fehérvérsejtek 70%-át teszik ki. Fenotípusukban eltérnek a perifériás keringésben található NK sejtektől: alacsonyabb citotoxikus aktivitást mutatnak, inkább citokineket és angiogén faktorokat termelnek (36).



1. ábra

A praeclampsia kialakulásának kétlépcsős modellje

CRH: corticotrop releasing hormon; sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; sEng: szolubilis endoglin; HELLP: hemolízis, emelkedett májenzim értékek, alacsony trombocitaszám

A „második interface” immunológiai eseményei a praeeclampsia anyai tünetegyütteséért (második lépcső) felelősek és a keringő anyai immunsejtek (T limfociták, NK sejtek, monociták, dendritikus sejtek) és a magzatbolyhok syncytiotrophoblast rétege között zajlanak a haemochorialis placentában (35).

1.2.2. A placentáció zavara praeeclampsziában

A spirális artériák konverziója alacsony rezisztenciájú, nagy kapacitású uteroplacentáris erekké egy többlépcsős folyamat, amelynek első, decidua-asszociált lépése az implantáció körül kezdődik (37). A trophoblast-mediált lépések során szövődménymentes terhességben a 6. héttől kezdődően az extravillosus cytotrophoblast sejtek behatolnak a deciduába, majd a myometriumba. A spirális artériák falát penetrálva belépnek azok lumenébe, ahol endovaszkuláris dugókat képeznek. A trophoblast dugók megvédik a fejlődő embryot az organogenezis idején a szabad gyökök okozta károsodástól. A 9. terhességi hét után a spirális artériák rekanalizálódnak a placenta laterális régióitól centrális irányba haladva, mely folyamat a 12. hétre fejeződik be folyamatos intervillosus áramlást biztosítva (38). Ez az intraplacentáris oxigéntenzio emelkedéséhez vezet és egy átmeneti mérsékelt oxidatív stresszel jár a méhlepényben (39). Ennek hatására az extravillosus cytotrophoblast sejtek megváltoztatják sejtfelszíni adhézis molekula expressziójukat az epithelialis sejtekre jellemzőről az endothelsejtekére („integrin switching”). Ezt a folyamatot pseudo-vaszkulogenezisnek nevezik, ami azt is eredményezi, hogy a cytotrophoblast sejtek invazivitása fokozódik (40, 41). Ettől kezdve az endovaszkuláris cytotrophoblast sejtek elfoglalják a spirális artériák endothelsejtjeinek a helyét és behatolnak a tunica mediába, ahol elpusztítják az elasztikus, muskuláris és neurális szöveteket (spirális artéria „remodelling”). Ennek következtében az anyai vazomotor kontroll nem tud érvényesülni, és a létrejövő uteroplacentáris erek képesek biztosítani az intervillosus ür megfelelő vérellátását a növekvő magzat számára. A spirális artériák konverziója a 20. terhességi hétre fejeződik be és a spirális artériák deciduális szakaszától a myometrialis szakasz belső harmadáig terjed (42).

A méhlepény normális fejlődésének szabályozásában az angiogén faktorok, elsősorban a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF) és az angiopoietin (Ang) család tagjai is részt vesznek, de szerepük részletei még tisztázásra várnak. A VEGF-A hatását nagy affinitású receptor tirozin kinázokon, az fms-szerű tirozin kináz 1 (Flt-1, vagy más néven VEGFR-1) receptoron és a kináz inzert domén tartalmú receptoron (KDR/Flk-1, vagy más néven VEGFR-2) keresztül fejt ki (43). A placentáris növekedési faktort (PlGF) a méhlepény termeli, az Flt-1 receptorhoz kötődve a VEGF-A angiogén hatását potenciózza (44, 45). Az

angiopoietin-1 és angiopoietin-2 a Tie-2 receptor tirozin kinázon keresztül hat (46). Ezen angiogén faktorok és receptoraik haemochorialis placentációban betöltött szerepét a terhesség egész időtartama alatt legátfogóbb módon a közönséges selyemmajmokban vizsgálták. Az eredmények arra utalnak, hogy a VEGF-A/Flt-1 és az angiopoietin-1/Tie-2 a trophoblast differenciálódás és invázió, a VEGF-A/KDR és az angiopoietin-1/Tie-2 a fetoplacentáris vaszkularizáció, míg az angiopoietin-2/Tie-2 az anyai vaszkuláris „remodelling” szabályozásában játszhat szerepet (47).

A praeeclampsia 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 (42, 48-50). A kóros placentációért a trophoblast differenciálódásának zavarát is felelőssé teszik. Praeeclampsziában a cytotrophoblast sejtek nem mutatják az endothelialis sejtekre jellemző adhézis molekula mintázatot (a pszeudo-vaszkulogenezis zavara) (40). Továbbá azt is feltételezik, hogy az anyai antioxidáns kapacitás elégtelensége és a következményes élettant meghaladó mértékű lepényi oxidatív stressz is szerepet játszhat a placentáció zavarában praeeclampsziában (39).

1.2.3. Első lépcső (preklinikai fázis): az „első interface” immunológiai folyamatai

Az extravillosus cytotrophoblast sejteken a nagyfokú polimorfizmust mutató, erős transzplantációs antigének (HLA-A, HLA-B, HLA-D) nem expresszálódnak. Ehelyett felszínükön HLA-C, HLA-E és HLA-G antigének találhatók (51). Ezek közül egyedül a HLA-C polimorf, több mint 1000 haplotípusa ismert, így az apai identitás hordozásáért egyedül felelős (52). Az uterinális NK sejtek KIR2D receptoraival kapcsolatba lépve kontrollálja azok citokin és angiogén faktor termelését. Az extravillosus cytotrophoblast sejtek felszínén jelenlevő HLA-E az uterinális NK sejtek C-lektinszerű CD94/NKG2A receptorához kötődve gátolja azok citotoxikus (killer) funkcióját (53). A HLA-G, illetve annak szolubilis formája pedig a KIR2DL4 receptoron keresztül stimulálja az uterinális NK sejtek citokin és angiogén faktor szekrécióját, amelyek az implantációt, placentációt és a méhlepény vaszkuláris érését segítik elő (54-56). A syncytiotrophoblast és villosus cytotrophoblast sejtek felszínükön humán leukocita antigéneket nem expresszálnak.

A trophoblast invázió szabályozásában az uterinális NK sejtek és az extravillosus cytotrophoblast sejtek kommunikációja fontos szerepet játszik. Az uterinális NK sejtek az extravillosus cytotrophoblast sejtek felől érkező aktiváló szignál hatására számos citokint (interferon (IFN)- γ , granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF), makrofág

inflammatorikus protein (MIP)-1 α , kolóniastimuláló faktor (CSF)-1, leukémia gátló faktor (LIF)) és angiogén faktort (VEGF-A, VEGF-C, PlGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2, transzformáló növekedési faktor (TGF)- β 1) termelnek, amelyek a trophoblast invázió és a vaszkuláris „remodelling” folyamatait kontrollálják (54, 55, 57, 58).

Az uterinális NK sejtek és az extravillosus cytotrophoblast sejtek kölcsönhatásában a partner-specifikus jelet a polimorf HLA-C biztosítja. Az uterinális NK sejteken kifejeződő anyai killer immunglobulinszerű receptorok (KIR) is nagyfokú polimorfizmust mutatnak. A KIR haplotípusok két csoportba sorolhatók: A és B. Az A haplotípus csak gátló receptorokat kódol a HLA-C számára, míg a komplexebb B haplotípus változó számú aktiváló receptort is. Az anyai KIR genotípus így háromféle lehet: AA (nincs aktiváló receptor), AB és BB (egy vagy több aktiváló KIR jelenléte). A HLA-C két haplotípusa különböztethető meg az α 1 domén 80-as pozíciójában elhelyezkedő aminosav dimorfizmus alapján: C1 (aszparagin) és C2 (lizin). A HLA-C2 erősebben kötődik a KIR receptorokhoz, mint a HLA-C1 (59). A praeclampsia kockázata szignifikánsan magasabb volt a gátló KIR A haplotípust homozigóta formában hordozó anyákban, ha egyidejűleg a magzat a HLA-C2 haplotípusra nézve homozigóta vagy heterozigóta volt (60). Ez a kombináció az uterinális NK sejtek gátlásához és így a placentáció zavarához vezet.

Bár az extravillosus cytotrophoblast sejtek és az uterinális NK sejtek együttműködésének zavara magyarázhatja a partner-specificitást praeclampsziában, de azt nem, hogy miért ritkább a kórkép multiparákban. Érdekes megfigyelés, hogy a deciduális regulátoros T sejtek felismerik az apai HLA-C antigéneket és képesek meggátolni a magzat ellen irányuló anyai immunreakciót élettani terhességben (61, 62). Ez arra utal, hogy a regulátoros T sejtek részt vesznek a partner-specifikus immuntolerancia kialakításában terhesség alatt. A T sejt memória révén egy következő terhességben meggátolhatják a szemi-allogén magzat apai antigénjei elleni immunválaszt, és így magyarázatul szolgálhatnak a praeclampsia ritkább előfordulására multiparákban. Ez azt is érthetővé teszi, hogy a partnercsere miért fokozza a praeclampsia kockázatát multiparákban. Ha az előző terhesség óta több mint 10 év telt el, a praeclampsia kockázata szintén emelkedett, feltehetően azért, mert a regulátoros T sejtek csak rövid távú memóriával rendelkeznek (29, 63).

1.2.4. Második lépcső (klinikai fázis): a „második interface” immunológiai folyamatai

A praeclampsia kialakulásának második lépcsőjében a kóros placentáció az uteroplacentáris keringés elégtelenségén keresztül lepényi hipoxiához/ischaemiához, illetve intermittáló reperfúzió révén lepényi oxidatív stresszhez vezet. A praeclampsziás terhesek egy

résében 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 (64). A placentáris oxidatív stressz, valamint a társuló endoplazmáshálók és gyulladásos stressz hatására a méhlepényből az anyai keringésbe kerülő különböző faktorok vezetnek a praeeclampsia anyai tünetegyütteséhez (29). Ez utóbbit egy anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció jellemzi, amelynek központi eleme a leukociták és az endothelsejtek aktivációja (65). 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 (66). 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) (29, 67-70).

Az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció összetevői praeeclampsziában (70):

- Leukocitózis (71, 72)
- Leukocita aktiváció (73)
- Komplement aktiváció (74-77)
- Alvadási rendszer aktivációja (78)
- Trombocita aktiváció (79)
- Endothelsejt aktiváció (80)
- Pro-inflammatorikus citokinek (tumor nekrosis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-8) emelkedett plazma/szérumszintje (81, 82)

Praeeclampsziában az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció, illetve a generalizált endothelsejt diszfunkció létrejöttében számos trophoblast-eredetű faktor szerepet játszhat (70). A méhlepény fokozott mennyiségben termel pro-inflammatorikus citokineket praeeclampsziában (83). Emellett a corticotrop releasing hormon (CRH), az aktin A és a leptin keringésben mért koncentrációja is emelkedett praeeclampsziában, és ezek mindegyike pro-inflammatorikus hatással rendelkezik (84-86). A placenta élettani terheességben úgynevezett trophoblast-törmelék bocsát az anyai keringésbe apoptózis eredményeként és ez

a folyamat praeclampsia-ban fokozott. A trophoblast-törmelék syncytiotrophoblast mikrovezikulumokat, citokeratin fragmentumokat, valamint magzati DNS-t és RNS-t tartalmaz (87). A syncytiotrophoblast mikrovezikulumok pro-inflammatorikus tulajdonságúak és képesek közvetlen módon károsítani az endothelsejteket (88, 89). Mennyiségük két esetben nőhet meg az anyai keringésben. Az egyik eset az, amikor a méhlepény mérete nagyobb, ami magyarázhatja, hogy a praeclampsia miért gyakoribb a harmadik trimeszterben. A többes terhesség is nagyobb lepenyi volumennel jár, és a praeclampsia magasabb kockázatával társul. A másik szituáció az, amikor a lepenyi hipoxia és oxidatív stressz miatt a syncytiotrophoblast apoptózis fokozódik, valamint nekrosis is hozzájárul ahhoz, hogy trophoblast-törmelék nagyobb mennyiségben kerül be az anyai keringésbe (87). Ilyenkor a lepenyi eredetű gyulladásos stimulus minősége is megváltozik, mert a syncytiotrophoblast mikrovezikulumok peroxidált lipideket is tartalmazhatnak (90). A legújabb irodalmi adatok szerint a syncytiotrophoblast mikrovezikulumok anti-angiogén faktorokat is expresszálnak (91-93).

A kóros placentáció azonban nem feltétlenül vezet a praeclampsia kialakulásához, az más szülészeti kórképekben is megfigyelhető, úgymint intrauterin növekedési retardációban, a koraszülés (idő előtti burokrepedéssel vagy anélkül), lepenyleválás, valamint középidős spontán vetélés eseteiben (94). Redman és munkatársai szerint a kóros placentáció nem oka a praeclampsia-nak, hanem egy erős hajlamosító tényező a kórkép létrejöttére. Az hogy az anyai tünetegyüttes kialakul vagy nem, azon múlik, hogy a placentáció zavara milyen mértékű gyulladásos stimulust vált ki (magzati-apai tényezők szerepe), illetve, hogy az anyai szervezet hogyan reagál ezekre a stimulusokra (anyai tényezők szerepe) (65).

1.2.5. Az angiogén egyensúlyzavar szerepe a praeclampsia kialakulásában

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 (95).

A szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) az Flt-1 receptor (a VEGF-A és a PlGF endothelialis receptora) keringésben természetes 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 (96). Az sFlt-1 fokozott lepenyi expresszióját figyelték meg praeclampsia-ban, 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 praeclampsiaszérumban 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 adenovírusvektor a praeclampsiaát fémjelző hipertóniához, proteinuriához és glomeruláris endotheliosishoz vezetett (97). Másrészt a rekombináns VEGF-A vagy PlGF kezelés enyhítette a praeclampsia sFlt-1 overexpressziójával kísérleti állatokon kiváltott tüneteit (98, 99). A keringésben található sFlt-1 szintjének emelkedése és a szabad PlGF szintjének csökkenése hetekkel megelőzi a praeclampsia klinikai tüneteinek megjelenését (100).

A praeclampsia több kockázati tényezője is összefüggést mutat a keringő sFlt-1 koncentrációval. Az sFlt-1 szintje magasabb primiparákban, ikerterhességben, mola hydatidosában, valamint 13-as triszómiában szenvedő magzatok esetén (101-105). Az utóbbi magyarázatul szolgálhat az a tény, hogy az Flt-1/sFlt-1 gén a 13-as kromoszómán (13q12) helyezkedik el. Érdekes módon az sFlt-1 koncentrációja alacsonyabb dohányzó terhesekben, ami magyarázhatja a dohányzás protektív hatását praeclampsiaiban (106). Valóban, a dohányfüst dóziszfüggő módon csökkentette a lepényi boholykivonat sFlt-1 termelését *in vitro* (107).

A szolubilis endoglin az endoglinnak (CD105, a TGF- β endothelialis ko-receptora) egy megcsonkított formája, ami a keringésben megkötí és antagonizálja az angiogén TGF- β -t. A szolubilis endoglin lepényi expresszióját és szérumszintjét szignifikánsan magasabbnak találták praeclampsiaiban. A rekombináns szolubilis endoglin *in vitro* az angiogenezis zavarát idézte elő. A szolubilis endoglin adenovírusvektor adása *in vivo* hipertóniát, proteinuriát és fokális glomeruláris endotheliosist eredményezett vemhes patkányokban. A szolubilis endoglin potenciózta az sFlt-1 anti-angiogén hatását, ugyanis szolubilis endoglin és sFlt-1 adenovírusvektor együttes adása súlyos hipertóniához, nefrotikus mértékű proteinuriához, továbbá HELLP-szindróma, valamint intrauterin növekedési retardáció kialakulásához vezetett (108). A szolubilis endoglin szérumszintje praeclampsias terhesekben már hetekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt megemelkedik (109).

Az sFlt-1 és a szolubilis endoglin anti-angiogén hatását részben az endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) VEGF-A, PlGF és TGF- β általi aktiválásának gátlásán keresztül fejt ki (110). A praeclampsiahoz társuló prokoaguláns állapot és trombocitopenia kialakulásában központi szerepet tulajdonítanak az anti-trombotikus prosztaciklinnek (PGI₂).

Mind a VEGF-A, mind a TGF- β serkenti a prosztaciklin termelődését (111, 112). A prosztaciklin vizeletben található metabolitjainak szintje már a praeclampsia tüneteinek megjelenése előtt csökken (113).

Az sFlt-1 és a szolubilis endoglin fokozott lepényi termelődésének oka praeclampsiaiban nem tisztázott teljes mértékben. A lepényi hipoxia képes fokozni az sFlt-1 és a szolubilis endoglin lepényi képződését (114-116). A praeclampsia állatkísérletes modelljén a lepényi ischaemia megnövelte az sFlt-1 és a szolubilis endoglin lepényi expresszióját és keringésben mért koncentrációját (117-119). A lepényi hipoxia mellett a csökkent hem oxigenáz-1 expressziót, a keringő angiotenzin receptor 1 (AT1) elleni agonista autoantitesteket és a katekol-O-metiltranszferáz deficienciát is kapcsolatba hozták az sFlt-1 és szolubilis endoglin fokozott lepényi képződésével praeclampsiaiban (120-122).

A generalizált endothelsejt diszfunkció kialakulásában az sFlt-1 és a szolubilis endoglin mellett más keringő faktorok is szerepet játszhatnak praeclampsiaiban (110). Az anti-angiogén endosztatin, trombospondin-2, valamint a vizeletben található prolaktin fragmentumok (vazoinhibinek) szintje is emelkedett praeclampsiaiban (123-126). A keringő endothelialis progenitor sejtek (EPC) élettani körülmények között serkentik az angiogenezist, elősegítik a vaszkuláris repair mechanizmusokat és az endothelsejtek vazodilatátor funkcióját (110). Koncentrációjuk praeclampsiaiban csökken, ami hozzájárulhat a kórkép anyai tünetegyüttesének a kialakulásához (127). Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a szisztémás endothelsejt diszfunkció patogenezisében egyéb keringő faktorok, úgymint a tumor nekrosis faktor (TNF)- α , syncytiotrophoblast mikrovezikulumok, antifoszfolipid és antiendothelialis antitestek, illetve lipoproteinek is részt vesznek praeclampsiaiban (128).

1.2.6. Az immunreguláció zavara praeclampsiaiban

A terhesség kiviseléséhez szükséges immunregulációban a helper T sejtek közül a Th1, Th2 és Th17, valamint a regulátoros T sejtek vesznek részt. A helper T sejtek különböző citokinek termelésével szabályozzák a citotoxikus T sejtek és a B limfociták antigén-specifikus effektor válaszát. A Th1 sejtek a celluláris immunválaszt segítik elő, és Th1-típusú citokineket termelnek (pl. IL-2, IFN- γ). A Th2 sejtek a humorális immunitásban játszanak fontos szerepet Th2-típusú citokinek szekréciójával (pl. IL-4, IL-5, IL-10 és IL-13). A Th17 sejtek hatásukat IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 és más pro-inflammatorikus citokinek termelése révén fejtik ki. Élettani terhességben Th2 dominancia figyelhető meg a humorális immunitás túlsúlyával (129).

A regulátoros T (Treg) sejtek a decidua legfontosabb szabályozó sejtjei, jelentős szerepük van a terhesség fenntartásában. Háromféle módon fejtenek ki immunregulátoros hatást. Az első a sejt-sejt interakció, melynek hatására csökken a T sejtek proliferációja, valamint a citotoxikus T sejtek és az NK sejtek aktivitása. Ebben a membránhoz kötött TGF- β , Lag-3 és galektin-1 játszik fontos szerepet. A második mechanizmus esetében a regulátoros T sejtek által termelt TGF- β és IL-10 gátolja a T sejt aktivációt. A harmadik mechanizmus során pedig a regulátoros T sejtek felszínén kifejeződött CTLA-4 a dendritikus sejtek és a makrofágok indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) expresszióját indukálja. Az IDO enzim a triptofán katabolizmusa révén a citotoxikus T sejtek és az NK sejtek aktivitását csökkenti (130).

Praeclampsziában 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 praeclampsziában 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 (131). Saito munkacsoportja egy másik tanulmányban a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) megnövekedett IL-2, IFN- γ és TNF- α termelését, valamint a vérnyomás átlagértéke és a Th1-típusú citokinek koncentrációja közötti pozitív korrelációt figyelte meg praeclampsziában (132). A Th1-típusú immunitás túlsúlyát praeclampsziában a perifériás vér T (helper és citotoxikus) és NK sejtjeiben intracelluláris citokinek mérésével foglalkozó más tanulmányok, valamint praeclampsziás terhesek perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek citokin szekréciójának meghatározása is megerősítette (133-136).

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 praeclampsziás terhesek perifériás vérében, mint egészséges terhes nőkében (137-140). Továbbá a regulátoros T sejtek funkcionális aktivitásának csökkenését is megfigyelték praeclampsziában (141, 142). Sasaki és munkatársainak eredményei szerint a regulátoros T sejtek prevalenciája nemcsak a perifériás vérben, hanem a deciduában is alacsonyabb praeclampsziában, mint szövődménymentes terhességben (137). Ugyanakkor olyan tanulmányokat is közöltek, amelyekben nem találtak szignifikáns különbséget a

praeclampsias és egészséges terhesek perifériás vérében található regulátoros T sejtek gyakoriságában (143, 144).

1.2.7. Maternális praeclampsia

A praeclampsia kialakulhat a placentáció zavarának hiányában is. A kórkép nem vezethető vissza egyetlen kóroki tényezőre, hanem egy multifaktoriális kórereditű megbetegedés. Ness és Roberts patogenetikai szempontból a praeclampsia két formáját különböztetette meg: a placentáris és a maternális praeclampsia. A placentáris praeclampsia oka a placentáris perfúzió zavara, míg a maternális praeclampsia esetén az anya korábban jelenlevő betegsége (krónikus hipertónia, diabetes, vesebetegség, autoimmun betegség, obesitas) eredményezi a kórkép kialakulását (145). A két forma azonban nem különíthető el élesen, a klinikumban a praeclampsia számos esetben kevert formában jelentkezik, és éppen ezek a kórkép legsúlyosabb megjelenésű esetei. A placentáris perfúzió zavara gyakran csak anyai tényezők együttes jelenlétében vezet a kórkép kialakulásához, illetve a mikrovaskuláris rendszert érintő anyai hajlamosító megbetegedés (pl. krónikus hipertónia, diabetes, autoimmun betegség) is okozhatja a placentáris perfúzió zavarát (10).

Redman és Sargent hipotézise szerint a maternális praeclampsia esetében a kórkép kialakulására hajlamosító anyai betegséget (pl. krónikus hipertónia, diabetes, autoimmun betegség, obesitas) egy krónikus enyhe fokú szisztémás gyulladás jellemzi, mely miatt a normális méhlepényből származó gyulladásos stimulus is elég a generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakció és a praeclampsia anyai tünetegyüttesének a létrejöttéhez (146). Ez az elmélet magyarázhatja a kórkép terhesség alatti anyai fertőzések (húgyúti fertőzés, periodontális megbetegedés) esetében tapasztalt gyakoribb előfordulását is.

A praeclampsia hajlamosító anyai megbetegedések (krónikus hipertónia, diabetes, obesitas) a metabolikus szindróma összetevői és egyben a kardiovaszkuláris betegségek (koszorúér-betegség, stroke) kockázati tényezői is. A kórelőzményben szereplő praeclampsia fokozza a kardiovaszkuláris és metabolikus megbetegedések kockázatát. A terhesség egy kardiovaszkuláris és metabolikus stressz tesztnek is tekinthető. A praeclampsia előfordulása terhesség alatt felhívhatja a figyelmet a kardiovaszkuláris és metabolikus betegségek kialakulásának fokozott kockázatára évekkel-évtizedekkel később, és ezzel elsődleges prevencióra és szűrésre is lehetőséget ad (147).

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 nekrozis 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 praeeclampszában.

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 (148, 149). A praeclampsia 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 praeclampsziás résztvevő normotóniássá vált a szülést követő 12. hétig. A praeclampsziát 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 praeclampsziáról 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 praeclampsziáról 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 (150).

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai 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.

Az egyes vizsgálatokban részt vevő terhes és nem terhes nők számát és klinikai adatait az Eredmények című fejezetben ismertetem.

3.2. A biológiai minták levétele, előkészítése és tárolása

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

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) lítium-heparinos kémcsőbe (BD Vacutainer) levett friss vérből sűrűség-grádiens centrifugálással (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Svédország; 27 perc, 400 *g*, 22 °C) izoláltuk. A sejteket foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldattal kétszer átmostuk, majd RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 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 alepény 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 szérumsFIt-1 és PlGF koncentráció meghatározása

A szérumsFIt-1 és biológiailag aktív PlGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 05109523 és 05144671) útján határoztuk meg Cobas e 411-es analizátoron (Roche, Mannheim, Németország).

A szérumsFIt-1 koncentráció meghatározásának lépései:

A módszer a szendvics-elven alapul. A vizsgálat teljes időtartama: 18 perc.

- 1. inkubáció: A mintában (20 µl) az sFIt-1-specifikus monoklonális biotinilált antitest és a ruténium komplexszel jelölt sFIt-1-specifikus monoklonális antitest reakciója során immunkomplex jön létre.
- 2. inkubáció: A sztreptavidinnel fedett mikroszemcsék hozzáadása után a biotin és a sztreptavidin között kialakuló kölcsönhatás következtében a komplex a szilárd fázishoz kötődik.
- A berendezés a reakcióelegyet a mérőküvetába szívja, ahol a (mágnesezhető) mikroszemcséket az elektróda a felszínén mágneses úton befogja. A kötetlen anyagok ezután a ProCell-lel együtt távoznak a rendszerből. Az elektródára kapcsolt feszültség kemilumineszcens fénykibocsátást indukál, amit egy fotosokszorozó mér.
- Az eredményeket a készülék a kalibrációs görbe alapján határozza meg, amelyet készülék-specifikusan, 2-pontos kalibrációval és a reagens-vonalkódból leolvasott mestergörbe felhasználásával generál.

A szérumsPlGF koncentráció meghatározásának lépései:

Alapja a szendvics-elv. A vizsgálat teljes időtartama: 18 perc.

- 1. inkubáció: A minta (50 µl), a PlGF-specifikus biotinilált monoklonális antitest és a ruténium komplexszel jelölt PlGF-specifikus monoklonális antitest reakciója során immunkomplex jön létre.

A további lépések megegyeznek a szérumsFIt-1 meghatározásánál leírtakkal.

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 (Alere, Ballybrit, Galway, Írország) történt a gyártó utasításainak megfelelően. A vizsgálat a plazma PlGF szint fluoreszcens anyaggal jelölt monoklonális antitesttel történő meghatározásán alapul és egyszer használatos teszt kazettával

történik. A mérés menete: 250 µl szobahőmérsékletű vérplazmát pipettázunk a kazetta mintaablakába, majd behelyezzük a mérőkészülékbe (Alere Triage MeterPro), és a kijelzőn 15 percen belül leolvassuk a pg/ml-ben megadott értéket. A kazetta beépített pozitív és negatív kontrollt is tartalmaz, mely biztosítja a kapott kvantitatív PlGF eredmények hitelességét. 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 (Peptides International, Louisville, Kentucky, USA) hasításából eredő fluoreszcencia kinetikus mérésével történt (151). A citrátos plazmamintákból reakció pufferrel (5 mM Bis-Tris, 25 mM CaCl₂, 0,005% Tween 20, pH 6,0) 1:20-as hígítást készítettünk, majd 5 µM FRET-S-VWF73 szubsztrát oldattal összemértük (20 µl mindkét oldatból). 37 °C-on 1 órán keresztül két percenként, 340 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszon kinetikus fluorimetriás mérést végeztünk. A kapott fluoreszcencia értékeket az idő függvényében ábrázoltuk, lineáris regresszióval meghatároztuk a meredekséget. Tíz egészséges véradó poolozott citrátos plazmájából készült hígítási sorozat meredekségi értékeit a hígítás százalékanak függvényében ábrázoltuk. Az így készített standard görbe (100%: hígítás nélküli normál plazma, 0%: vak, reakció puffer) segítségével határoztuk meg az ismeretlen plazmák aktivitását. Az eredményeket a poolozott egészséges véradó plazma aktivitásának 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 (Dakopatts, Glostrup, Dánia) segítségével. Mikrotiter lemezeket (Immunoplate Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dánia) 1:800 arányban nátrium-hidrogénkarbonát pufferben hígított (pH 9,6) humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitestekkel fedtünk. Egy éjszakán át tartó 4 °C-os inkubálás és mosás (TBS-T: Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat, 0,05% Tween-20 tartalommal) után a lemezeket a hozzáadott 1:500 arányban hígított plazmamintákkal 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ismételt mosás (TBS-T) után torma peroxidázzal konjugált humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitestekkel 1 órán át inkubáltuk a lemezeket, majd orto-feniléndiamin hozzáadása után

492 nm-es hullámhosszon mértük meg az optikai denzitást. 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. Az elektroforézist alacsony felbontású (0,8%-os) agaróz gélen (Seakem HGT, Lonza, Basel, Svájc) végeztük 6 órán keresztül 20 mA/gél áramerősséggel 18 °C hőmérsékleten, Tris-borát puffer alkalmazásával. A fehérjéket elektroblot módszerrel vittük át a polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA). A nagy molekulatömegű von Willebrand faktor multimerek transzferét 1 mM β -merkaptotetanollal 10 percig történő kezeléssel (merkaptolízis) segítettük elő a blottolás előtt (152). A von Willebrand faktort torma peroxidázzal jelölt humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitest (DakoCytomation, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin (DAB) szubsztrát segítségével vizualizáltuk. A kvantitatív multimer analízist GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornia, USA) denzitométeren QuantityOne szoftver (Bio-Rad Laboratories) alkalmazásával végeztük, és az eredményt a nagy multimerek (>20 mer) százalékos arányában adtuk meg (153).

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 nekrosis faktor (TNF)- α , interferon- γ -indukált protein (IP)-10, monocita kemotaktikus protein (MCP)-1, intercelluláris adhézis molekula (ICAM)-1 és vaszkuláris sejtadhézis molekula (VCAM)-1 szérum szintjeit multiplex szuszpenziós array útján (Bio-Plex, Cat. No. X500317TGY és XF0000ZGAI) Bio-Plex 200 analizátor segítségével mértük meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA). A szérum IL-17A, transzformáló növekedési faktor (TGF)- β 1, leptin és a plazma oszteopontin szintjeit ELISA módszerrel határoztuk meg (eBioscience, San Diego, Kalifornia, USA, Cat. No. BMS2017HS; DRG International, Mountainside, New Jersey, USA, Cat. No. EIA-1864, EIA-2395, EIA-3116), a gyártó utasításainak megfelelően.

A multiplex citokin meghatározás lépései:

A vizsgálatokat diluenssel (Bio-Plex Human Serum Diluent) négyszeresre hígított szérummintákból végeztük.

1. A színcódolású analit-specifikus mikrorészecske-koncentrátumokat, reagenseket, mintákat és standardokat a leírás szerint előkészítettük. A lemezt 100 µl mosópuffer hozzáadásával előre megnedvesítettük, majd eltávolítottuk a folyadékot a mérőhely alján levő szűrőn át, a mikrolemezhez tervezett vákuumosztóval.
2. 50 µl hígított mikrorészecske keveréket adtunk mindegyik mérőhelyre.
3. 50 µl standardot vagy hígított mintát adtunk az adott mérőhelyre. 3 órán keresztül mikrolemezráción inkubáltuk.
4. A lemez háromszori mosását követően (minden mintahelyet 100 µl mosópufferrel mostunk) 50 µl hígított Biotin Antitest koktélt adtunk mindegyik mérőhelyre, majd a lemezt rázókészüléken inkubáltuk 1 órán át.
5. A háromszori mosást megismételtük, majd 50 µl hígított sztreptavidin-fikoeritrin konjugátumot (Streptavidin-PE) adtunk mindegyik mintahelyre. 30 percen át rázón inkubáltuk.
6. A mosást háromszor megismételtük és végül 100 µl mosópuffert adtunk mindegyik mintahelyre, majd 2 percig inkubáltuk.
7. Bio-Plex 200 analizátor felhasználásával az eredményt 90 percen belül olvastuk le. A mérés során a készülék kétféle lézert használ: az egyik lézer mikrorészecske-specifikus, amely meghatározza, hogy melyik analitot vizsgáljuk, a másik lézer a fikoeritrin által adott szignál erősségét jelzi, amely egyenesen arányos a megkötött analit mennyiségével. Az egyes minták citokin koncentrációját a Bio-Plex Manager™ szoftver a standard hígítási sor alapján számította ki.

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

A Hsp70 (HSPA1A) szérumszintjét az R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA, Cat. No. DYC1663E) ELISA kitjével határoztuk meg. A mérés során az egér anti-humán Hsp70 monoklonális antitesttel kezelt (100 µl/lyuk; 2 µg/ml; bikarbonát pufferben (pH 9,5) egy éjszakán át 4 °C-on) ELISA lemezt háromszori mosás (PBS (foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat), 0,1% Tween 20) és a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása (200 µl PBS, 0,5% zselatin, 0,1% Tween 20, 1 órán át, szobahőmérsékleten) után hígítatlan vizsgálati szérummintával inkubáltuk (100 µl/lyuk; 2 órán át, szobahőmérsékleten). Újabb mosási ciklust követően biotinnal jelzett nyúl anti-humán Hsp70 monoklonális antitesttel (100 µl/lyuk; 0,5 µg/ml; PBS-zselatinban, 1,5 órán át, szobahőn) és sztreptavidin-torma peroxidáz komplexszel (mosás után; 1:200; PBS-zselatinban, 20 percig, szobahőn) detektáltuk a

lemezhez kötődött Hsp70 mennyiségét. Standardként rekombináns humán Hsp70 hígítási sorát használtuk (0-10 ng/ml). A lemezeket mosást követően 100 µl orto-feniléndiamin (OPD, Sigma-Aldrich) szubsztráttal hívtuk elő, az optikai denzitást 490 nm-en (referencia 620 nm) mértük.

3.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása

Az anti-Hsp70 (HSPA1A) IgG antitestek szérumszintjét ELISA módszerrel mértük meg. A mikrotiter lemezeket 0,1 µg/lyuk rekombináns humán Hsp70 antigénnel (StressGen, Victoria, Kanada, SPP-755) fedtük bikarbonát pufferben (pH 9,6, 100 µl/lyuk, 4 °C-on egy éjszakán át). Mosás és a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása (PBS, 0,5% zselatin, 1 órán át, szobahőmérsékleten) után 1:100 arányban hígított szérummintával 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezeket (100 µl/lyuk; PBS, 0,5% zselatin, 0,05% Tween 20 oldatban). Mosást követően γ-lánc-specifikus, peroxidázzal konjugált, nyúlban termelt anti-humán IgG antitestekkel (Sigma-Aldrich) jelöltük az anti-Hsp70 antitestek kötődését (100 µl, 1:6000 hígítás PBS-zselatin-Tween 20 oldatban, 1 óra inkubálás szobahőmérsékleten). Ismételt mosást követően kecskében termelt, peroxidázzal konjugált nyúl IgG elleni antitestet (Sigma-Aldrich) adtunk a lemezekhez a jelölés felerősítésére. A lemezeket mosást követően orto-feniléndiamin szubsztráttal hívtuk elő, az optikai denzitást 490 nm-en (referencia 620 nm) mértük. Az antitest koncentrációt önkényes egység/ml-ben (Arbitrary Unit – AU/ml) adtuk meg, melyet anti-Hsp70 antitesteket magas koncentrációban tartalmazó humán szérum hígítási sorából készített standard görbe alapján számoltunk ki.

Az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 IgG antitestek szérumszintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A lemezeket rekombináns humán Hsp60 (StressGen, SPP-740) vagy rekombináns *Mycobacterium bovis* Hsp65 (Lionex, Braunschweig, Németország, MA14) antigénnel fedtük (0,1 µg/lyuk). Mosás és blokkolás (PBS, 0,5% zselatin) után 1:500 arányban hígított szérummintával 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezeket (100 µl/lyuk; PBS, 0,5% zselatin, 0,05% Tween 20 oldatban). A lemezekhez kötődött anti-Hsp60/65 antitestek mennyiségét peroxidázzal konjugált, γ-lánc-specifikus anti-humán IgG (Sigma-Aldrich) és orto-feniléndiamin hozzáadásával detektáltuk. A lemezek leolvasása és az antitest koncentrációkat tükröző optikai denzitások önkényes egység/ml-be történő átszámolása ugyanazzal a módszerrel történt, mint a Hsp70 elleni antitestek mérésénél.

3.12. A komplementrendszer vizsgálata

A C1rC1sC1-INH komplex plazmaszintjét ELISA módszerrel mértük meg. Mikrotiter lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 1:500 hígítású, nyúlban termelt anti-humán C1-INH ellenanyaggal (Dako, Glostrup, Dánia) fedtünk, 16 órán át, 4 °C-on. Mosást (PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,4) követően a lemezt 1% marha szérumból (BSA) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk, majd 1:200 hígítású EDTA-s plazmamintákkal és standarddal (hőaggregált IgG-vel aktivált normál humán szérumból, 1:500-1:32000 felező hígítási sora) inkubáltuk 1 órán át. Detektáló ellenanyagként 1:500 hígítású, kecskében termelt anti-humán C1s ellenanyagot (Atlantic Antibodies, Stillwater, Minnesota, USA) alkalmaztunk, majd másodlagos ellenanyagként 1:1000 hígítású, nyúlban termelt, peroxidázzal konjugált anti-kecske IgG ellenanyagot (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). A reakcióhoz ABTS (azino-bisz-etilbenzotiazolin-szulfonsav) szubsztrátot (Sigma-Aldrich) használtunk, és 0,2 M oxálsavval állítottuk le azt. Az optikai denzitás értékeket 405 és 492 nm-en olvastuk le. A minták C1rC1sC1-INH tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 ml hígítatlan, hőaggregált IgG-vel aktivált normál humán szérumból C1rC1sC1-INH tartalmának).

A C3bBbP aktivációs komplex plazmaszintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. Mikrotiter lemezt (Nunc) 1:1000 hígítású, kecskében termelt anti-humán properdin-faktor B ellenanyaggal (Incstar Corporation, Stillwater, Minnesota, USA) fedtünk, 16 órán át, 4 °C-on. Mosást (PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,4) követően a lemezt 1% BSA-t tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk, majd 1:10 hígítású EDTA-s plazmamintákkal és standarddal (zimoszánnal aktivált normál humán szérumból, 1:100-1:12800 hígítási sora) inkubáltuk 1 órán át. Detektáló ellenanyagként 1:2000 hígítású, biotinnal konjugált, nyúlban termelt anti-humán C3c (Dako) ellenanyagot alkalmaztunk, majd másodlagos ellenanyagként 1:1000 hígítású sztreptavidin-peroxidázt (Jackson ImmunoResearch). A reakcióhoz orto-feniléndiamin szubsztrátot használtunk, és 0,5 M kénsavval állítottuk le azt. Az optikai denzitás értékeket 492 és 620 nm-en olvastuk le. A minták C3bBbP tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 ml hígítatlan, zimoszánnal aktivált normál humán szérumból C3bBbP tartalmának).

Az MBL (mannóz-kötő lektin)-MASP-2 (MBL-asszociált szerin proteáz 2) komplex aktiválhatóságának mértékét Petersen és munkatársai C4-depozíción alapuló módszere alapján határoztuk meg (154), kisebb módosításokkal. Mikrotiter ELISA lemezeket (Nunc) 1 mg/ml *Saccharomyces cerevisiae* eredetű mannánnal fedtünk (Sigma-Aldrich, M7504) fedőpufferben (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6), 1 órán át, 37 °C-on. A lemezt háromszor mostuk blokkoló pufferrel (20mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1% Tween 20, pH 7,4),

majd 2 órán át, 4 °C-on blokkoltuk. Háromszor mostuk a lemezt mosópufferrel (20mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% Tween 20, pH 7,4), majd az MBL-MASP-2 komplexek kikötése érdekében 1 órán át, 4 °C-on inkubáltuk a hígító pufferben (40mM HEPES, 2 M NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7,4) 1:1 arányban hígított szérummintákkal (50 µl). Standardként normál humán szérum keverék (25-50-75-100%) felező hígítási sorát alkalmaztuk. Ezt követően kétszer magas ionerejű (20mM HEPES, 1M NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% Tween 20, pH 7,4), majd háromszor alacsony ionerejű mosópufferrel (20mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% Tween 20, pH 7,4) mostuk a lemezt, és C4 pufferben (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7,4) 0,02 mg/ml humán szérumból tisztított C4 fehérjével inkubáltuk 1 órán át, 37 °C-on. Háromszori blokkoló pufferes mosást követően 1:1000 hígítású, kecskében termelt anti-humán C4 ellenanyaggal (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, USA) inkubáltuk a lemezt 1 órán át, szobahőmérsékleten. Háromszori blokkoló pufferes mosást követően torna peroxidázzal jelölt 1:8000 hígítású kecske IgG elleni antitestet (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Három mosási lépést követően OPD szubsztrátot használtunk, majd 5 perc elteltével 0,5 M H₂SO₄ oldattal állítottuk le a színreakciót. Az optikai denzitás értékeket 492 és 620 nm-en olvastuk le. 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 (San Diego, Kalifornia, USA, Cat. No. A008, A015, A029), míg a fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjét a Hycult Biotech cég ELISA kitjeivel (Uden, Hollandia, Cat. No. HK336 and HK340) 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 (Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 20764930). A humán CRP monoklonális anti-CRP antitestekkel fedett latex szemcsékhez agglutinálódott. A precipitátumot 552 nm-en turbidimetriával határoztuk meg.

3.14. A vérplazma szabad magzati DNS mennyiségének meghatározása

Fiú újszülöttek esetén az anyai plazmából szilícium-dioxid adszorpciós 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 DNS-t 400 µl EDTA-val antikoagulált plazmából vontuk ki High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Németország) segítségével, a gyártó előírásai alapján. A DNS-t 50 µl elúciós puffer oldattal mostuk ki, amelyből 1 µl-t használtunk mintaként a PCR reakcióhoz. A SYBR Green valós idejű PCR analízishez a LightCycler 1.0 készüléket alkalmaztuk (Roche, Mannheim, Németország). A keringésben található fiú magzati DNS kimutatásához az *SRY* gén következő primereit használtuk: előre 5'-GGC AAC GTC CAG GAT AGA GTG A-3', hátra 5'-TGC TGA TCT CTG AGT TTC GCA TT-3'. A 10 µl térfogatú PCR reakcióelegy 1 µl DNS-t, 1-1 µl 2,5 pmol/l primert, 1 µl DNA Master SYBR Green I mixet (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit: Taq polimeráz, dNTP, MgCl₂) és 6 µl nukleázmentes vizet tartalmazott. A polimeráz láncreakció a következő program szerint zajlott: kezdő denaturáció 95 °C-on 8 percig, amit 40 ciklus denaturáció (95 °C-on 5 másodpercig), annealing (60 °C-on 10 másodpercig) és láncszintézis (72 °C-on 15 másodpercig) követett, majd 4 °C-ra történő hűtés zárt le. 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 (155). A vizsgálat a 2-tiobarbitursav malondialdehiddel történő nukleofil hozzáadásán alapult savas kémhatáson (pH 2,0) és magas hőmérsékleten (100 °C). A kalibrációt a malondialdehid forrásaként 1,1,3,3-tetraethoxy-propán (Fluka, Buchs, Svájc) alkalmazásával végeztük. A plazma fibronectin koncentrációkat nefelometria (Dade Behring, Marburg, Németország) segítségével határoztuk meg a gyártói leírásnak megfelelően.

3.16. A limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata

A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg. Felolvasztást követően az izolált mononukleáris sejteket kétszer PBS oldatban mostuk, és az életképességüket tripánkék festék kizárással ellenőriztük (>90%). A nem-specifikus kötőhelyeket 10% egér szérummal blokkoltuk (10 percig, szobahőmérsékleten). A sejteket fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt anti-humán CD3 és fikoeritrin-cianin 5-tel (PC5) jelölt anti-humán CD56 vagy FITC-jelölt anti-humán CD8 és PC5-jelölt anti-humán CD4 monoklonális egér antitestekkel (BD Pharmingen, San Diego, Kalifornia, USA) inkubáltuk 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosást követően a

vörösvérsejteket 1,5 ml 1X FACS Lysing Solution (BD Biosciences) oldattal lizáltuk, 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Centrifugálást és a felülúszó eltávolítását követően 500 µl 1X FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences) oldattal inkubáltuk a sejteket 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően a permeabilizált sejteket fikoeritrinnel (PE) jelölt egér anti-humán VEGF-A monoklonális antitesttel (R&D Systems) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. A nem-specifikus kötődés kimutatására PE-jelölt, izotípus-azonos egér immunglobulin (Ig) G_{2A} antitestet (BD Pharmingen) használtunk kontrollként. Kétszeri mosást követően a sejteket 1% paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban szuszpendáltuk. A mérést FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük, és az eredményeket CellQuest Pro szoftver segítségével értékeltük ki. A limfociták sejtpopulációját a Forward Scatter és a Side Scatter karakterisztika alapján különítettük el a mononukleáris sejtek közül.

3.17. A limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata

A perifériás vér limfocitáinak intracelluláris galektin-1 expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg. Felolvasztást követően az izolált mononukleáris sejteket kétszer PBS oldatban mostuk, és az életképességüket tripánkék festék kizárással ellenőriztük (>90%). A nem-specifikus kötőhelyeket 10% egér szérummal blokkoltuk (10 percig, szobahőmérsékleten). A sejteket FITC-jelölt anti-humán CD3 és PC5-jelölt anti-humán CD56 vagy FITC-jelölt anti-humán CD8 és PC5-jelölt anti-humán CD4 monoklonális egér antitestekkel (BD Pharmingen) inkubáltuk 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosást követően a vörösvérsejteket 1,5 ml 1X FACS Lysing Solution (BD Biosciences) oldattal lizáltuk, 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Centrifugálást és a felülúszó eltávolítását követően 500 µl 1X FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences) oldattal inkubáltuk a sejteket 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően a permeabilizált sejteket házilag biotinilált (Biotin Labeling Kit-NH₂, Dojindo Laboratories, Tabaru, Kumamoto, Japán) egér anti-humán galektin-1 monoklonális antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, USA) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. A nem-specifikus kötődés kimutatására házilag biotinilált, izotípus-azonos egér IgG₁ antitestet (R&D Systems) használtunk kontrollként. A nem kötődött biotinilált antitestek kimosását követően a sejteket PE-jelölt sztreptavidinnal (Immunotech, Marseille, Franciaország) inkubáltuk 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően a sejteket 1% paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban szuszpendáltuk. A mérést FACSCalibur áramlási citométeren végeztük, és az eredményeket CellQuest Pro szoftver segítségével értékeltük ki.

3.18. A limfociták intracelluláris granulizin expressziójának vizsgálata

A perifériás vérben található limfociták intracelluláris granulizin expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg. Felolvasztást követően az izolált mononukleáris sejteket kétszer PBS oldatban mostuk, és az életképességüket tripánkék festék kizárással ellenőriztük (>90%). A nem-specifikus kötőhelyeket 10% egér szérummal blokkoltuk (10 percig, szobahőmérsékleten). A sejteket FITC-jelölt anti-humán CD8 és PC5-jelölt anti-humán CD56 monoklonális egér antitestekkel (BD Pharmingen) inkubáltuk 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosást követően a vörösvérsejteket 1,5 ml 1X FACS Lysing Solution (BD Biosciences) oldattal lizáltuk, 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Centrifugálást és a felülúszó eltávolítását követően 500 µl 1X FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences) oldattal inkubáltuk a sejteket 10 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően a permeabilizált sejteket biotinilált kecske anti-humán granulizin antitesttel (R&D Systems) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. A nem-specifikus kötődés kimutatására biotinilált, izotípus-azonos kecske IgG antitestet (R&D Systems) használtunk kontrollként. A nem kötődött biotinilált antitestek kimosását követően a sejteket PE-jelölt sztreptavidinnal (Immunotech) inkubáltuk 15 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Kétszeri mosást követően a sejteket 1% paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban szuszpendáltuk. A mérést FACSCalibur áramlási citométeren végeztük, és az eredményeket CellQuest Pro szoftver segítségével értékeltük ki.

3.19. 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 sejteit 10 ng/ml forbol-mirisztát-acetáttal (PMA, Sigma-Aldrich) és 1 µg/ml ionomicinnel (Sigma-Aldrich) stimuláltuk 10 µg/ml brefeldin A (BFA, Sigma-Aldrich) jelenlétében 4 órán át, 37 °C-on 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférán. A sejteket ezt követően fikoeritrin-cianin 7 (PE-Cy7)-jelölt CD4, allofikocianin-cianin 7 (APC-Cy7)-jelölt CD8 monoklonális antitestekkel (BD Pharmingen), valamint peridinin-klorofill (PerCP)-jelölt CD56 monoklonális antitesttel (BioLegend, San Diego, Kalifornia, USA) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosást követően FACS Lysing Solution (BD Biosciences), majd annak eltávolítását követően FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences) oldatot adtunk a sejtekhez. A permeabilizált sejteket PE-jelölt IL-17A monoklonális antitesttel (eBioscience) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten.

PE-jelölt, izotípus-azonos egér IgG₁ antitestet (eBioscience) használtunk kontrollként. Mosást követően a mérést BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük, és az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

A sejtfelszíni kemokin receptor markerek és a regulátoros T sejtek kimutatására a perifériás vér mononukleáris sejtjeit PE-Cy7-jelölt CD4, FITC-jelölt CD25, APC-jelölt CXCR3 monoklonális antitestekkel (BD Pharmingen), valamint PerCP-jelölt CCR4 monoklonális antitesttel (BioLegend) inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4 °C-on. A CXCR3 markert a Th1, a CCR4 markert a Th2 sejtek kimutatására használtuk. Mosást követően a sejteket Fixation/Permeabilization oldattal fixáltuk, majd Permeabilization Buffer oldattal kezeltük a gyártó utasításának megfelelően (eBioscience). A permeabilizált sejteket PE-jelölt FoxP3 monoklonális antitesttel (eBioscience) inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4 °C-on. PE-jelölt, izotípus-azonos egér IgG₁ antitestet (eBioscience) használtunk kontrollként. Mosást követően a mérést BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük. Az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

3.20. A konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciájának vizsgálata

A perifériás vérben található konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciáját áramlási citometriával határoztuk meg. A perifériás vérből izolált mononukleáris sejteket PE-Cy7-jelölt CD4 és APC-jelölt CD25 monoklonális antitestekkel (BD Pharmingen) inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4 °C-on. Mosást követően a sejteket Fixation/Permeabilization oldattal fixáltuk, majd Permeabilization Buffer oldattal kezeltük a gyártó utasításának megfelelően (eBioscience). A permeabilizált sejteket PE-jelölt FoxP3 monoklonális antitesttel (eBioscience) inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4 °C-on. PE-jelölt, izotípus-azonos egér IgG₁ antitestet (eBioscience) használtunk kontrollként. Mosást követően a mérést BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük. Az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

3.21. A regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának vizsgálata

A perifériás vérben található regulátoros T sejtek alcsoportjainak prevalenciáját áramlási citometriával határoztuk meg. A perifériás vér mononukleáris sejtjeit PE-Cy7-jelölt CD4, APC-jelölt CD25, APC-Cy7-jelölt CD279 és FITC-jelölt CD45RA monoklonális antitestekkel (BioLegend) inkubáltuk 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten. Mosást követően a sejteket Fixation/Permeabilization oldattal fixáltuk, majd Permeabilization Buffer

oldattal kezeltük a gyártó utasításának megfelelően (eBioscience). A permeabilizált sejteket PE-jelölt FoxP3 és PerCP-jelölt Helios monoklonális antitestekkel inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4 °C-on. Izotípus-azonos egér IgG₁ antitesteket használtunk kontrollként. Mosást követően a mérést BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) végeztük. Az eredményeket FACSDiVa szoftver segítségével értékeltük ki.

3.22. 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. Homogenizátor alkalmazásával 10 ml lizáló pufferben (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 25 µg/ml PMSF, 2,5 µg/ml Leupeptin, 2,5 µg/ml Aprotinin, 625 µM nátrium-pirofoszfát, 1mM β-glicerofoszfát, 0,1% Triton) 1 g placentaszövetet daráltunk, majd homogenizáltunk háromszor 15 másodpercig. A homogenátumot 800 g-vel 15 percig, 4 °C-on centrifugáltuk, majd a pelletet eltávolítottuk. A felülúszót -80 °C-on tároltuk és négy héten belül felhasználtuk. Az FAAH (AT1983a, egér monoklonális antitest, Abgent Inc., San Diego, Kalifornia, USA), CB1 (EB06945 kecske poliklonális anti-CB1 antitest, Everest Biotech, Upper Heyford, Egyesült Királyság) és CB2 (EB06946 kecske poliklonális anti-CB2 antitest, Everest Biotech) expressziók humán placentában történő meghatározásához 60 µg-ot használtunk fel a kivont fehérjékből a Western blot analízishez.

A mintákat 100 mM ditiotreitolt tartalmazó 2x Laemmli pufferben készítettük elő és vízfürdőben forraltuk 15 percig. A fehérjét (60 µg) SDS-PAGE (9%) gélen választottuk el, majd nedves transzferrel nitrocellulóz membránra vittük fel 90 percig. A nitrocellulóz membránra történt fehérjetranszfer egyenletességét Ponceau S-sel ellenőriztük. Gyengéd öblítést követően a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át blokkoltuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (TBS-T) oldott 10% (m/V) zsírmentes liofilizált szárított tejben, majd egy éjszakán át inkubáltuk CB1, CB2 vagy FAAH elleni antitesttel. Az antitesteket TBS-T-ben oldott 1%-os marha szérum albuminnal hígítottuk (CB1 1:1000, CB2 és FAAH 1:500 arányban). Ezt követően a blotokat TBS-T-ben oldott HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd ECL-Western blot detektáló rendszerrel vizualizáltuk (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Egyesült Királyság). A specifikus sávokat a mintákkal párhuzamosan futtatott egér here homogenátummal és színes molekulásúly markerekkel azonosítottuk. A membránt 60 °C-on

30 percig stripping pufferben (100 mM 2-merkaptoetanol, 2% SDS és 62,5 mM Tris-HCl, pH 7,6) áztattuk a kötött ellenanyag leválasztása céljából, majd mitogén-aktivált protein kináz 1 (MAPK1) antitesttel (1:1000) újrajelöltük és az elsődleges ellenanyaggal mért denzitási értékeket a MAPK1 sáv denzitási értékére normalizáltuk.

A Western blottal kapott denzitási értékeket GELDOC 1.00-UV rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) kvantifikáltuk. A denzitometriás egységben levő specifikus sávok jeleit ugyanazon membrán megfelelő 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) festéshez az anti-CB1 (GTX100219) és anti-CB2 (GTX101357) nyúl poliklonális antitesteket a GeneTextől (Irvine, Kalifornia, USA), az anti-FAAH (AT1983a) egér monoklonális antitestet az Abgenttől szereztük be. A Western blothoz képest történt váltást a CB-antitesteket illetően a régebbi antitestek IHC technológiával való inkompatibilitása indokolta. A placentablokkokból készített, 3 µm vastag metszeteket SuperFrost Ultra Plus Adhesion Slides (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tárgylemezekre vittük fel, majd 1 órán át 56 °C-on, azt követően 24 órán át szobahőmérsékleten szárítottuk felhasználás előtt. Az immunfestést Leica BOND-MAX rendszerrel (Leica Biosystems, St. Louis, Missouri, USA), Bond Polimer Refine Detection kit (Leica Biosystems) felhasználásával végeztük. Az utóbbi tartalmazta a peroxid blokkolót (3% hidrogén-peroxid), poszt-primer polimer penetrációfokozót (Tris-pufferelt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-ben oldott 10% állati szérumban), Poly-HRP anti-egér/nyúl IgG polimert (mindkettőt 8 µg/ml hígításban, Tris-pufferelt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-ben oldott 10% állati szérumban), DAB Part 1-et (66 mM 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid, stabilizáló oldatban), DAB Part B-t (0,05%-os hidrogén-peroxid, stabilizáló oldatban) és hematoxilint (0,02%). A metszeteket háromszor viasztalanítottuk Bond Dewax Solution (Leica Biosystems) oldattal 72 °C-on, majd alkoholsorban rehidráltuk három lépésben, végül pufferoldatban mostuk (Bond Wash Solution, Leica Biosystems). A CB1, CB2 és FAAH antigén előhívást Leica Bond Epitope Retrieval Solution 2 (pH 9,0) oldattal való 20 perces inkubálással végeztük. Az elsődleges antitesteket Bond Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems) oldatban hígítottuk 1:1000 arányban a CB1 és CB2, valamint 1:1200 arányban az FAAH esetében. A metszeteket az előbbi oldatokkal 20 percig inkubáltuk, majd újabb 15 percig a poszt-primer polimerrel. Pufferoldattal és ionmentesített vízzel történő mosást követően peroxid blokkolóval 3 percig inkubálva blokkoltuk a peroxidáz aktivitást. További pufferoldatos és ionmentesített vízzel történt mosást követően

kevert DAB oldatot adtunk a metszetekhez 10 percre, majd ezt követően háromszor mostuk a mintákat ionmentesített vízzel, végül 4 percre inkubáltuk hematoxilinnel. Az előbbieken leírt lépések között Leica Wash Solution 10x Concentrate (hígítási arány 1:9) oldattal mostuk a metszeteket. Pozitív kontrollként humán kisagyi szövetet használtunk.

A metszetekről készült képeket AxioCam ICc 1 kamerával felszerelt Zeiss AxioImager A2 mikroszkóppal (Carl Zeiss Ltd., Thornwood, New York, USA) készítettük 200x-os és 400x-os nagyítás mellett, AxioVision fényképező és képfeldolgozó szoftver segítségével (4.8.2. verzió, Carl Zeiss Ltd.).

3.23. Az anandamid szérumszintjének meghatározása

A szérum anandamid szinteket nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) technikával határoztuk meg. A szérum mintából az analitot belső standard (100 ng/ml D₄-anandamid) hozzáadása után acetonitrillel extraháltuk, majd centrifugáltuk. A tiszta felülúszót bepárooltuk N₂ áramban, majd kezdeti eluensben történő visszaoldás után HPLC-MS módszerrel analizáltuk. A kvantitatív meghatározás ismert koncentrációjú anandamidot tartalmazó szérum mintákból nyert kalibrációs görbe segítségével történt (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml anandamid). A HPLC rendszer egy Jasco X-LC kétfázisú pumpából és egy Jasco autosamplerből állt (JASCO Benelux B.V., De Meern, Utrecht, Hollandia). Az analitikai mérést Finnigan TSQ Quantum Discovery triple quadrupole tömegspektrométer (Thermo Electron Corporation, San Jose, Kalifornia, USA) segítségével végeztük, electrospray ionizációs módszerrel, pozitív ion módban. A kromatográfiás elválasztás Purospher STAR C18 oszlopon (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) történt gradiens elúcióval (mobil fázisok: 0,1% hangyasavat tartalmazó 100 mM ammónium-acetát és 0,1% hangyasavat tartalmazó metanol 300 µl/min áramlási sebességgel).

3.24. 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 10 µl térfogatú PCR reakcióelegy PCR puffert, 2 mmol/l MgCl₂-ot, 0,2 mmol/l dNTP keveréket, 0,4 µmol/l-t mindkét primerből, 1,5 E rekombináns Taq DNS polimerázt (Invitrogen, Budapest,

Magyarország) és 100 ng genomiális DNS-t tartalmazott. A PCR program a következő volt: kezdő denaturálás 94 °C-on 4 percig, amit 40 ciklus denaturálás (94 °C-on 30 másodpercig), annealing (60 °C-on 30 másodpercig) és kiterjesztés (extenzió, 72°C-on 30 másodpercig) követett, majd a programot egy végső extenziós fázis (72°C-on 10 percig) és 4 °C-ra hűtés zárta le. A polimeráz láncreakcióhoz Perkin Elmer 2400 Thermal Cyclor (Norwalk, Connecticut, USA) PCR készüléket használtunk. A PCR terméket, ami az ösztrogén receptor α (ESR1) gén 1-es intronjának egy részét tartalmazta, PvuII és XbaI restrikciós endonukleázzal (Roche, Basel, Svájc) 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.

3.25. A tumor nekrozis 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 (156). 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. A 10 μ l térfogatú PCR reakcióelegy 2 μ l 10x PCR puffert, 2 mmol/l MgCl₂-ot, 0,2 mmol/l dNTP keveréket, 1,5 μ mol/l-t mindkét primerből, 1 E rekombináns HotStar Taq DNS polimerázt (QIAGEN Diagnostics GmbH, Hamburg, Németország) és 100 ng genomiális DNS-t tartalmazott. A PCR program a következő volt: kezdő denaturálás 94 °C-on 15 percig, amit 35 ciklus denaturálás (95 °C-on 10 másodpercig), annealing (57 °C-on 30 másodpercig) és extenzió (72°C-on 30 másodpercig) követett, majd a programot egy végső extenziós fázis (72°C-on 5 percig) és 10 °C-ra hűtés zárta le. A polimeráz láncreakcióhoz AB 2720 Thermal Cyclor (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) PCR készüléket használtunk. Az amplifikált PCR terméket NcoI restrikciós endonukleázzal (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Kanada) 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.

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

A genomiális DNS-t a buffy coat-ból kisózással izoláltuk. A 10 µl térfogatú PCR reakcióelegy 1 µl 10x PCR puffert, 2 mmol/l MgCl₂-ot, 0,2 mmol/l dNTP keveréket, 1 µmol/l-t mindkét primerből, 1 E rekombináns HotStar Taq DNS polimerázt (QIAGEN Diagnostics GmbH) és 100 ng genomiális DNS-t tartalmazott. 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 program a következő volt: kezdő denaturálás 95 °C-on 15 percig, 30 ciklus denaturálás (95 °C-on 30 másodpercig), annealing (55 °C-on 40 másodpercig) és extenzió (72°C-on 30 másodpercig), majd egy végső extenzió 72°C-on 10 percig és 10 °C-ra hűtés egy AB 2720 Thermal Cycler PCR készüléken. A PCR termékeket NcoI és HinfI restrikciós endonukleázzal (Fermentas International Inc.) 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.

3.27. 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 gyorseszt 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 (157). A módszer kis esetszám esetén pontosabb a χ^2 tesztnél. A polimorf lókuszok közötti kapcsoltságot (linkage disequilibrium (LD)) egy permutációs eljárással határoztuk meg az úgynevezett Expectation-Maximization (EM) algoritmus segítségével (158). 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 rekonstruálásával, az Excoffier-Laval-Balding (ELB) algoritmussal becsültük meg (159). 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) (160, 161).

Statisztikai elemzéseinkhez a STATISTICA (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA), az SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS, Chicago, Illinois, USA), a MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium), a GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) és a MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) szoftvereket használtuk fel. A populációgenetikai számításainkat az Arlequin szoftverrel (Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne, Svájc) végeztük. Minden statisztikai analízisünkénél a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Értekezésemben – ha másképpen nem jelölöm – a folytonos változók esetében a mediánt és az interkvartilis terjedelmet (25-75 percentilis), míg a diszkrét változóknál az esetszámot és a relatív gyakoriságot (%) adom meg.

4. Eredmények

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

A vizsgálatba bevont 54 praeeclampsziás, 58 egészséges, szövődménymentes terhes és 52 egészséges nem terhes nő klinikai jellemzőit az 1. táblázatban tüntettem fel. A vizsgálat résztvevőinek laboratóriumi paramétereit a 2. táblázatban mutatom be. A legtöbb vizsgált laboratóriumi paraméterben szignifikáns különbséget figyeltünk meg a három vizsgálati csoport között, kivéve a szérumban glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) aktivitást. A szérumban sFlt-1 és PlGF koncentráció, valamint az sFlt-1/PlGF hányados szignifikánsan magasabb volt egészséges terhes, mint egészséges nem terhes nőkben. Praeeclampsziás terhesekben szignifikánsan magasabb sFlt-1 szintet és sFlt-1/PlGF hányadost, illetve szignifikánsan alacsonyabb szérumban PlGF koncentrációt találtunk, mint egészséges terhesekben. Továbbá a praeeclampsziás terhesek sFlt-1 és PlGF szérumszintje, valamint sFlt-1/PlGF hányadosa szignifikánsan magasabb volt, mint a nem terhes nőké.

Az alcsoport analízis szerint (3. táblázat) a súlyos praeeclampsziás terhesek sFlt-1 szérumszintje szignifikánsan magasabb volt, mint az enyhe praeeclampsziásoké ($p < 0,05$). Azon praeeclampsziás terhesekben, akiknél a tünetek korán jelentkeztek (< 37 . terhességi hét), vagy akiknél magzati növekedési retardáció is társult a kórképhez, szignifikánsan alacsonyabb PlGF szérumban koncentrációt mértünk, mint azokban, akiknél a tünetek a betöltött 37. terhességi héten vagy azután léptek fel, illetve akiknél IUGR nem volt észlelhető ($p < 0,05$ mindkét esetben).

1. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges nem terhes nők (n=52)	Egészséges terhes nők (n=58)	Praeclampsziás terhesek (n=54)
Életkor (év)	28 (25-34)	30 (28-32)	29 (26-33)
BMI vérvételkor (kg/m^2)	20,9 (19,7-23,3)	25,8 (24,2-28,0) ^b	29,8 (27,4-31,9) ^{b,d}
Dohányzók	12 (23,1%)	0 (0%) ^b	3 (5,6%) ^a
Primiparák	n.a.	35 (60,3%)	33 (61,1%)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	110 (110-120)	110 (105-120)	160 (153-180) ^{b,d}
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	80 (70-80)	70 (60-80) ^b	100 (97-110) ^{b,d}
Terhességi kor a kórkép jelentkezésekor (hét)	n.a.	n.a.	36 (36-38)
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	36 (36-37)	37 (36-39)
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	38 (37-39) ^d
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3450 (3150-3700)	3075 (2450-3450) ^d
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	9 (16,7%) ^c

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index

^a $p < 0,05$ versus egészséges nem terhes nők

^b $p < 0,001$ versus egészséges nem terhes nők

^c $p < 0,05$ praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

^d $p < 0,001$ praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

2. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek laboratóriumi paraméterei

	Egészséges nem terhes nők (n=52)	Egészséges terhes nők (n=58)	Praeclampsias terhesek (n=54)
Szérum karbamid szint (mmol/l)	4,3 (3,6-4,8)	2,8 (2,0-3,3) ^b	3,5 (2,7-4,2) ^{a,c}
Szérum kreatinin szint (μmol/l)	67 (61-72)	49 (42-56) ^b	63 (55-72) ^d
Szérum bilirubin szint (μmol/l)	8,7 (6,6-12,4)	5,4 (4,0-6,8) ^b	7,4 (5,8-9,4) ^{a,c}
Szérum GOT aktivitás (E/l)	17 (15-20)	19 (17-21)	19 (15-24)
Szérum GPT aktivitás (E/l)	15 (12-17)	12 (10-15) ^a	15 (11-19) ^c
Szérum CRP szint (mg/l)	0,7 (0,5-1,9)	3,6 (1,7-6,6) ^b	6,8 (2,8-12,1) ^{b,c}
Plazma VWF:Ag szint (%)	69,0 (60,2-84,7)	152,6 (112,7-199,0) ^b	183,0 (139,9-235,6) ^{b,c}
Plazma fibronectin szint (g/l)	n.m.	0,37 (0,31-0,47)	0,56 (0,40-0,82) ^d
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	n.m.	15,36 (8,84-18,61)	18,58 (15,84-20,58) ^c
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/μl)	n.m.	0,002 (0,0-0,172) [†]	0,076 (0,033-0,408) ^{‡,c}
Szérum sFlt-1 szint (pg/ml)	76,3 (67,1-83,6)	3252 (2509-4751) ^b	6814 (3736-12720) ^{b,d}
Szérum PlGF szint (pg/ml)	16,2 (14,0-18,0)	183 (126-307) ^b	98,0 (63,7-146) ^{b,d}
Szérum sFlt-1/PlGF hányados	4,79 (3,82-5,52)	15,6 (8,52-36,6) ^b	70,5 (31,8-144) ^{b,d}

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

n.m.: nem mérve; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: dezoxiribonukleinsav; sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentáris növekedési faktor

[†] n=19

[‡] n=30

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

3. táblázat

Az sFlt-1 és PlGF szérumszintje, valamint az sFlt-1/PlGF hányados a praeclampsias terhesek alcsoportjaiban

	Szérum sFlt-1 szint (pg/ml)	Szérum PlGF szint (pg/ml)	Szérum sFlt-1/PlGF hányados
Enyhe praeclampsia (n=35)	6113 (3697-8481)	98,6 (59,3-146)	58,8 (25,6-134)
Súlyos praeclampsia (n=19)	10269 (5267-15420)	96,9 (70,1-146)	100 (54,5-198)
Praeclampsia IUGR nélkül (n=45)	6689 (3736-12611)	98,9 (68,0-146)	68,6 (31,8-128)
Praeclampsia IUGR-rel (n=9)	8903 (4857-15847)	70,1 (37,6-104)	144 (54,5-422)
Praeclampsia jelentkezése ≥37. hét (n=26)	7044 (4498-12720)	116 (91,8-176)	70,5 (32,9-109)
Praeclampsia jelentkezése <37. hét (n=28)	5631 (3551-11585)	73,3 (41,9-132)	81,6 (24,5-271)

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

A szignifikáns különbségek vastagon szedve

sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentáris növekedési faktor; IUGR: intrauterin növekedési retardáció

Azt is megvizsgáltuk, hogy a tanulmányban részt vevő páciensek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei mutatnak-e összefüggést a szérum sFlt-1 és PlGF szintekkel. Egészséges nem terhes nőkben statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a szérum PlGF koncentráció és a szisztolés vérnyomás között (Spearman $R=-0.38$, $p<0,05$). Az egészséges terhes nők csoportjában a primiparák szérum sFlt-1/PlGF hányadosa szignifikánsan magasabb volt, mint a multiparáké (medián (25-75 percentilis): 18,5 (10,5-43,2) versus 13,2 (5,08-24,7), $p<0,05$). Az egészséges terhes nők szérum sFlt-1 szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a szérum kreatinin szinttel ($R=0,48$, $p<0,05$), valamint a plazma VWF:Ag ($R=0,42$, $p<0,05$) és fibronectin ($R=0,50$, $p<0,001$) szintekkel. Szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg egészséges terhes nők szérum PlGF szintje és az újszülöttjeik születési súlya között ($R=0,30$, $p<0,05$), míg a PlGF és CRP koncentrációik inverz módon korreláltak egymással ($R=-0,32$, $p<0,05$). Ahogy azt a 4. táblázat is mutatja, a praeclampsias terhesek csoportjában szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérum sFlt-1 szint és a szisztolés, diasztolés vérnyomás, a karbamid és a kreatinin szérumszintek, valamint a plazma VWF:Ag, fibronectin és szabad magzati DNS szintek között. Továbbá a

praeclampsziás terhesek szérumban PlGF koncentrációja szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a tünetek jelentkezésekor és a szüléskori terhességi korról, illetve az újszülöttek születési súlyával, míg szignifikáns fordított korrelációban állt a szérumban karbamid, kreatinin és a plazma fibronectin szintekkel. Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei, valamint a szérumban sFlt-1 és PlGF szintek között egyik vizsgálati csoportban sem találtunk.

4. táblázat

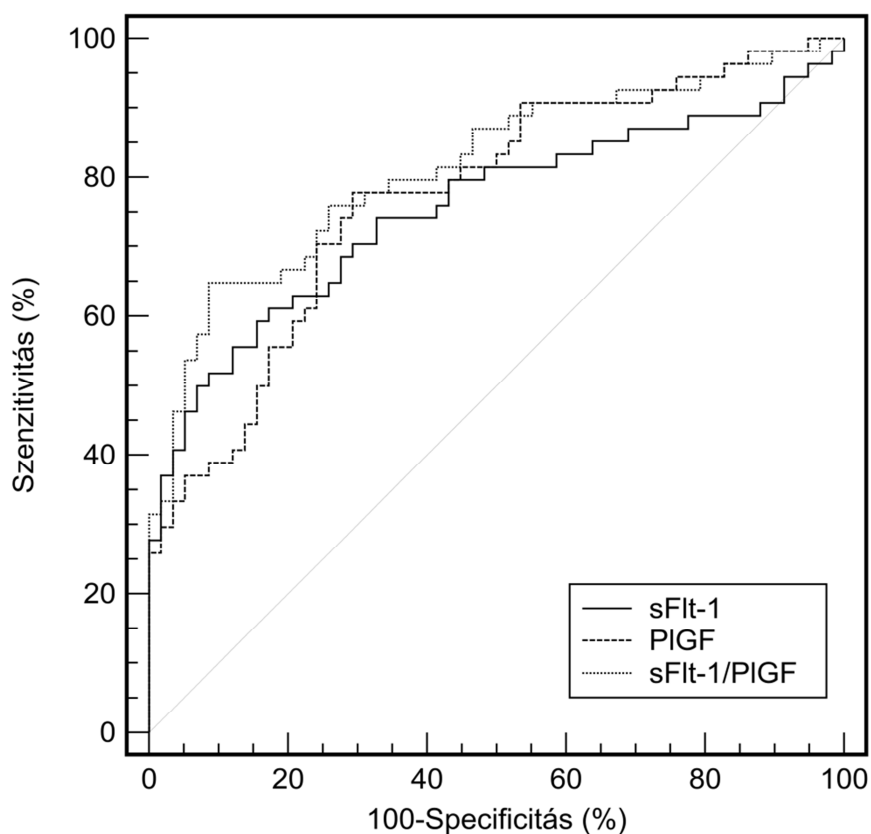
Korrelációs együtthatók a praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paraméterei és a szérumban sFlt-1, PlGF szintek, valamint az sFlt-1/PlGF hányados között

	Szérumban sFlt-1 szint	Szérumban PlGF szint	Szérumban sFlt-1/PlGF hányados
Életkor	-0,01	-0,08	0,02
BMI vérvételkor	-0,22	0,28	-0,29
Szisztolés vérnyomás	0,31	-0,23	0,35
Diasztolés vérnyomás	0,35	-0,07	0,30
Terhességi kor a kórkép jelentkezésekor	-0,07	0,30	-0,21
Terhességi kor vérvételkor	-0,07	0,28	-0,18
Terhességi kor szüléskor	-0,25	0,40	-0,36
Újszülött születési súlya	-0,16	0,41	-0,30
Szérumban karbamid szint	0,52	-0,48	0,58
Szérumban kreatinin szint	0,57	-0,30	0,55
Szérumban bilirubin szint	-0,11	0,22	-0,20
Szérumban GOT aktivitás	0,27	-0,05	0,21
Szérumban GPT aktivitás	0,24	-0,01	0,19
Szérumban CRP szint	-0,25	0,09	-0,22
Plazma VWF:Ag szint	0,46	-0,10	0,35
Plazma fibronectin szint	0,61	-0,30	0,55
Plazma malondialdehid szint	0,02	-0,09	0,01
Plazma szabad magzati DNS szint	0,47	-0,29	0,45

A szignifikáns korrelációk vastagon szedve

sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentáris növekedési faktor; BMI: testtömeg index; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: deoxiribonukleinsav

A Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe segítségével meghatároztuk az sFlt-1 és a PlGF koncentráció és hányadosuk cut-off értékeit a praeclampsziás terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Ezen cut-off pontok szenzitivitása és specificitása a következő volt: magas sFlt-1 szint (>4165 pg/ml): 74,1% és 67,2%, alacsony PlGF szint (<146 pg/ml): 77,8% és 70,7%, illetve magas sFlt-1/PlGF hányados ($>31,2$): 75,9% és 74,1%. Továbbá összehasonlítottuk a szérumban sFlt-1 és PlGF koncentráció és hányadosuk diagnosztikus pontosságát praeclampsziában. Ahogy a 2. ábra is mutatja, az sFlt-1/PlGF hányados ROC görbéje alatti terület szignifikánsan nagyobb volt, mint az sFlt-1 és PlGF szinteké (AUC 95%-os konfidencia intervallummal az sFlt-1/PlGF hányados, sFlt-1 és PlGF szintek esetén rendre: 0,81 (0,73-0,88) versus 0,75 (0,66-0,83) és 0,77 (0,68-0,85); $p < 0,05$ mindkét összehasonlításban).



2. ábra

A szérumban szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1, folyamatos vonal), placentáris növekedési faktor (PlGF, szaggatott vonal) szintek és hányadosuk (sFlt-1/PlGF hányados, pontozott vonal) Receiver Operating Characteristic (ROC) görbéje a praeclampsziás és egészséges terhes nők elkülönítésére

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

Összesen 130 terhes nő (27 egészséges terhes kontroll, 103 terhességi hipertóniás) esetében határoztuk meg a PlGF plazmaszintjét a 35. terhességi hét előtt, a gyártó javaslatának megfelelően. Hetvennégy gravidának fejeződött be a terhessége a betöltött 37. terhességi hét előtt, 3 esetben ennek oka a terhességi hipertóniától független volt. A vizsgálatban részt vevő terhesek klinikai jellemzőit az 5. táblázatban mutatom be. A praeclampsiás terhesek többségében a kórkép korai kezdetű és súlyos formáját figyeltük meg, ami a terhesség 37. hét előtti lezárását tette szükségessé. A 6. táblázat a pozitív PlGF teszteredményt adó esetek számát tartalmazza a diagnózis és a terhesség időtartama szerinti csoportosításban. A pozitív teszteredmények aránya praeclampsiában és HELLP-szindrómában volt a legnagyobb. A 3. ábrán és a 7. táblázatban a PlGF plazmaszintjét tüntettem fel a diagnózis függvényében. A plazma PlGF koncentráció a terhességi hipertóniák minden formájában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint szövődménymentes terhességben. Azon terhesek esetében, akiknél a terhességet a 37. hét előtt kényszerültünk lezárni, 90,5%-ban kaptunk pozitív PlGF teszteredményt a terhességi kor szerinti 5 percentilis határérték mellett, és az arány még nagyobb volt, ha a 3 hipertóniától független okból történt koraszülést kizártuk (6. táblázat). A terhesség 35 hétnél rövidebb időtartamát a pozitív PlGF teszt az esetek 93,7%-ában jelezte előre. A 4. ábra és a 8. táblázat a plazma PlGF koncentrációt mutatja be a terhesség időtartamának függvényében. A plazma PlGF koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt, ha a terhességet a 35. hét előtt vagy a 35. és 37. hét között kellett lezárni, a betöltött 37. hétig vagy annál tovább tartó terhességekkel összehasonlítva. Az 5. ábra a terhesség időtartamának Kaplan-Meier görbéit mutatja be hipertóniás terhesekben a PlGF teszteredmény függvényében. Jól látható, hogy a terhesség időtartama sokkal rövidebb volt pozitív PlGF teszteredmény esetén, akár az 5 percentilis, akár a mérési tartomány alsó határát jelentő 12 pg/ml-es vágóértéket alkalmaztuk. A 9. táblázat az egyváltozós és többváltozós Cox-regresszió eredményeit tartalmazza. Ahogy a hazard ratio-k mutatják, a pozitív PlGF teszteredmény a terhesség időtartamának szignifikáns prediktora a vérvételkori terhességi korra és proteinuriás hipertónia formákra történő adjusztálást követően is.

5. táblázat

Egészséges és hipertóniás terhes nők klinikai jellemzői

	Egészséges terhes (n=27)	GHT (n=18)	CHT (n=25)	PE (n=23)	HELLP (n=20)	SIPE (n=17)
Életkor (év)	31 (29-34)	34 (29-35)	34 (30-36)	33 (30-37)	30 (28-33)	34 (32-36)
Terhesség előtti BMI (kg/m ²)	21,4 (19,4-24)	25,9 (23,1-30,8)**	31,4 (26,1-35,9)**	25,6 (22,4-29,6)*	23,9 (22,2-33,5)*	24,4 (21,9-30)*
Primiparák (%)	8 (29,6)	12 (66,7)*	13 (52)	12 (52,2)	16 (80)**	8 (47,1)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	110 (109-120)	154 (146-158)**	143 (140-147)**	169 (160-178)**	170 (165-172)**	164 (151-170)**
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	70 (66-75)	96 (94-100)**	89 (80-94)**	109 (100-114)**	110 (95-114)**	104 (96-112)**
Terhességi kor a kórkép jelentkezésekor (hét)	n.a.	28 (26-33)	n.a.	30 (27-32)	30 (28-32)	30 (28-31)
Terhességi kor vérvételkor (hét)	31 (29-33)	33 (31-34)	33 (30-34)	31 (28-33)	31 (28-32)	31 (28-32)
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	38 (36-39)	37 (34-38)**	31 (28-34)**	31 (28-32)**	32 (30-36)**
Vérvétel és szülés között eltelt idő (nap)	55 (40-70)	29 (21-51)*	21 (4-45)**	1 (0-3)**	0 (0-1)**	8 (3-25)**
Koraszülés (%)	3 (11,1)	7 (38,9)	11 (44)*	22 (95,7)**	20 (100)**	14 (82,4)**
Újszülött születési súlya (gramm)	3270 (3100-3560)	3280 (2150-3860)	2710 (2130-3370)*	1330 (990-1740)**	1265 (940-1575)**	1750 (1100-2560)**
Intrauterin növekedési retardáció (%)	0 (0)	3 (16,7)	2 (8)	10 (43,5)**	6 (30)*	5 (29,4)*
Korai kezdetű PE (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	21 (91,3)**	17 (85)**	16 (94,1)**
Súlyos PE (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (95,7)**	20 (100)**	11 (64,7)**

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

n.a.: nem alkalmazható; GHT: gesztációs hipertónia; CHT: krónikus hipertónia; PE: praeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeclampsia; BMI: testtömeg index

* $p < 0,05$ versus egészséges terhes nők

** $p < 0,001$ versus egészséges terhes nők

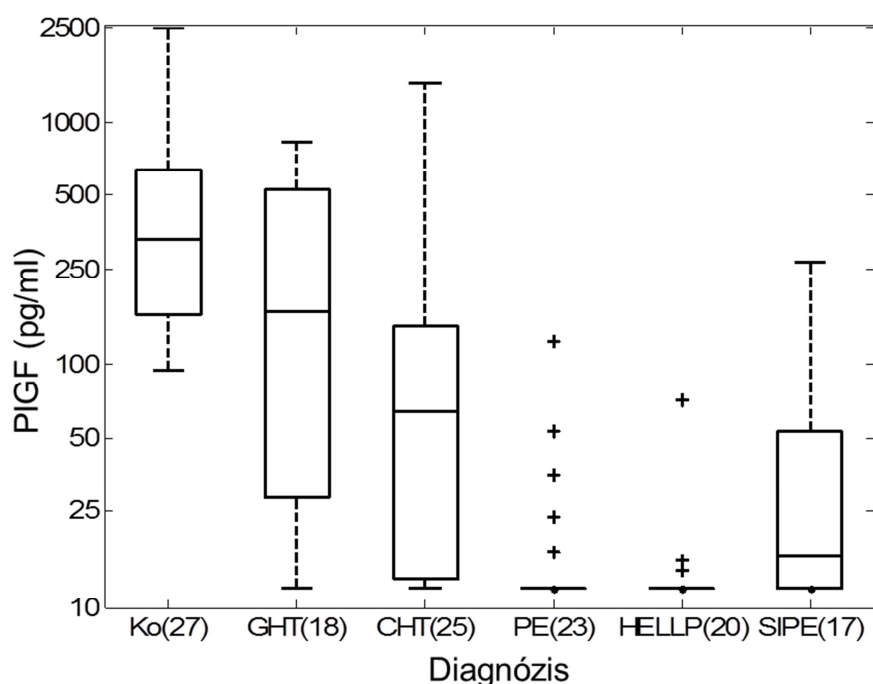
6. táblázat

A PlGF gyorseszteszt szenzitivitása a betegcsoport és a terhesség időtartama szerint

Csoport	n	PlGF szint a terhességi kornak megfelelő 5 percentilis alatt				PlGF szint ≤ 12 pg/ml			
		n+	Szenzitivitás (%)	95% LCI	95% UCI	n+	Szenzitivitás (%)	95% LCI	95% UCI
Kontroll	27	1	3,7	0,1	19,0	0	0	0	12,8
GHT	18	8	44,4	21,5	69,2	3	16,7	3,6	41,4
CHT	25	15	60,0	38,7	78,9	5	20,0	6,8	40,7
PE	23	22	95,7	78,1	99,9	18	78,3	56,3	92,5
HELLP	20	19	95,0	75,1	99,9	17	85,0	62,1	96,8
SIPE	17	14	82,4	56,6	96,2	8	47,1	23,0	72,2
LP<35+0	63	59	93,7	84,5	98,2	48	76,2	63,8	86,0
LP 35-37	11	8	72,7	39,0	94,0	1	9,1	0,2	41,3
LP>36+6	29	11	37,9	20,7	57,7	2	6,9	0,8	22,8
LP<37	74	67	90,5	81,5	96,1	49	66,2	54,3	76,8
LP<37*	71	67	94,4	86,2	98,4	49	69,0	56,9	79,5

n: esetszám; n+: pozitív PlGF teszteredmény száma; 95% LCI: 95%-os konfidencia intervallum alsó határa; 95% UCI: 95%-os konfidencia intervallum felső határa; GHT: gesztációs hipertónia; CHT: krónikus hipertónia; PE: praeeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeeclampsia; LP: a terhesség időtartama (hét+nap)

* 3 terhest kizártunk, akiknél a koraszülés oka a hipertóniától független volt (2 esetben idő előtti burokrepedés, 1 esetben magzati bradycardia)



3. ábra

A PlGF plazmaszintje a diagnózis függvényében

Ko: egészséges terhes (kontroll); GHT: gesztációs hipertónia; CHT: krónikus hipertónia; PE: praeeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeeclampsia

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány; Whisker: tartomány a kilógó értékek nélkül

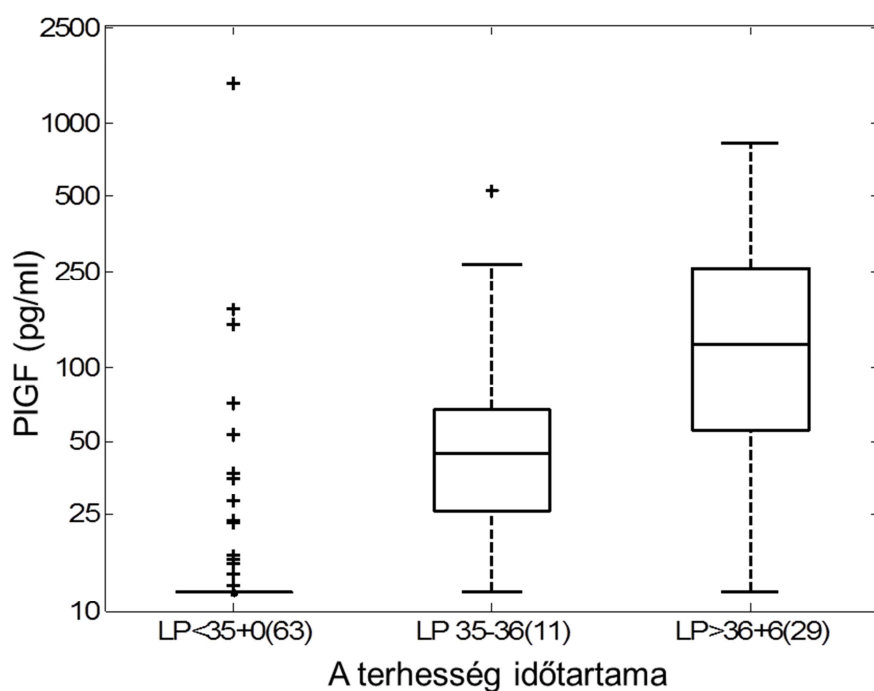
7. táblázat

A PlGF plazmaszintje a diagnózis szerint

Csoport	n	Medián	25%	75%	p érték*
Kontroll	27	331	163	633	n.a.
GHT	18	168	28	527	0,0199
CHT	25	64	13	145	<0,0001
PE	23	12	12	12	<0,0001
HELLP	20	12	12	12	<0,0001
SIPE	17	16	12	53	<0,0001

Ko: egészséges terhes (kontroll); GHT: gesztációs hipertónia; CHT: krónikus hipertónia; PE: praeeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeeclampsia; n.a.: nem alkalmazható

* p érték versus egészséges terhes nők (kontroll)



4. ábra

A PlGF plazmaszintje a terhesség időtartamának függvényében hipertóniás terhesekben (n=103)

LP: a terhesség időtartama (hét+nap)

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány; Whisker: tartomány a kilógó értékek nélkül

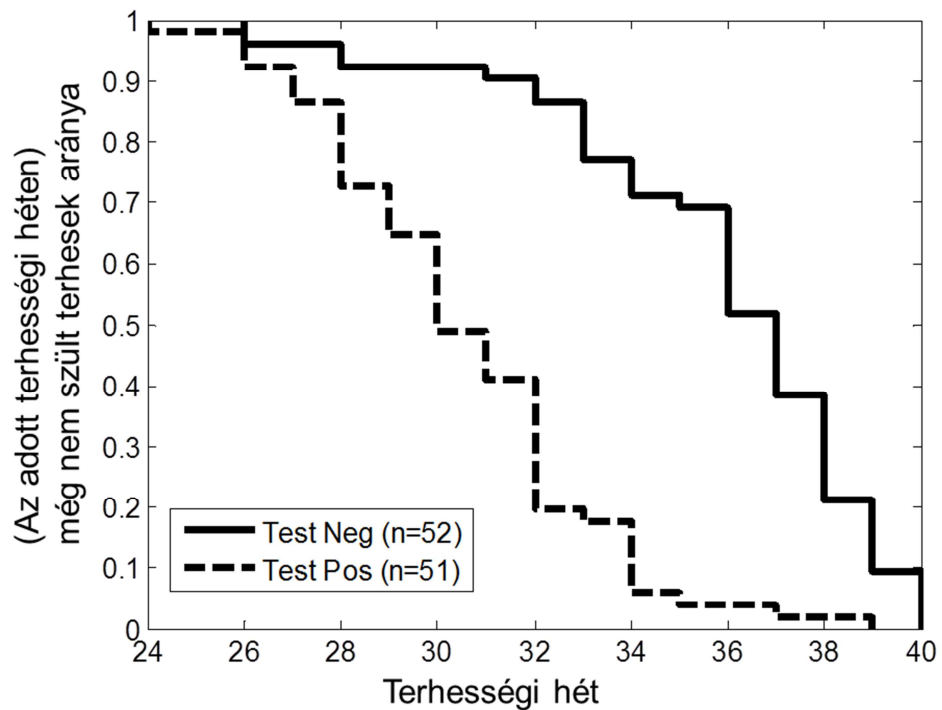
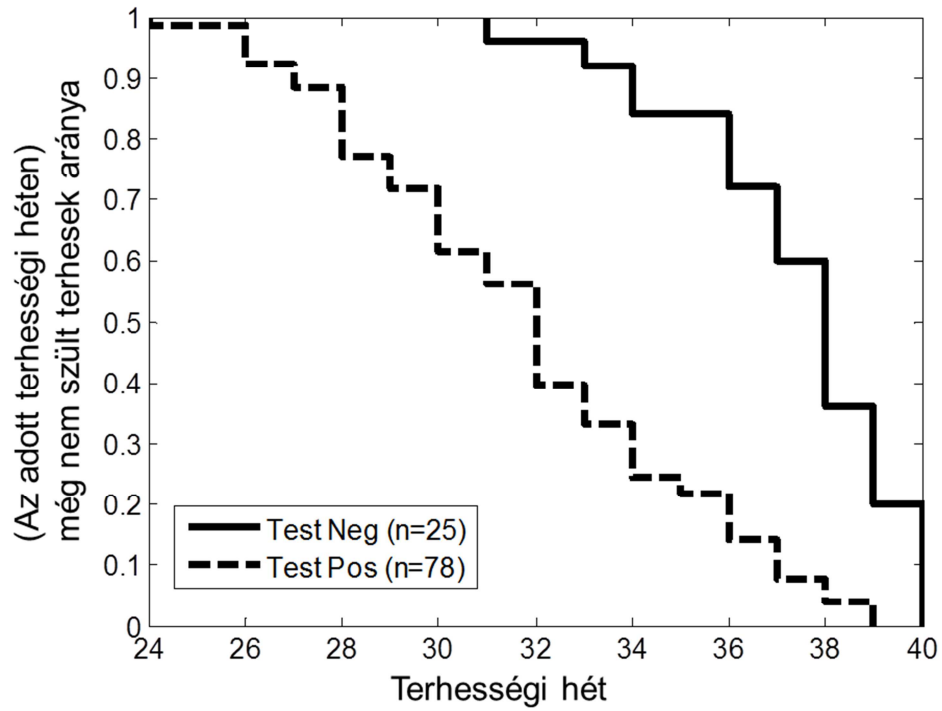
8. táblázat

A PlGF plazmaszintje a terhesség időtartama szerint hipertóniás terhesekben (n=103)

Csoport	n	Medián	25%	75%	p érték*
LP<35+0	63	12	12	12	<0,0001
LP 35-36	11	44	26	67	0,0455
LP>36+6	29	126	55	259	n.a.

LP: a terhesség időtartama (hét+nap); n.a.: nem alkalmazható

* p érték versus LP>36+6



5. ábra

A terhesség időtartamának Kaplan-Meier görbéi hipertóniás terhesekben a PlGF teszteredmény függvényében (fent: vágóérték a terhességi kornak megfelelő 5 percentilis, lent: vágóérték 12 pg/ml)

9. táblázat

A pozitív PlGF teszteredmény hazard ratio-i a terhesség időtartamának előrejelzésére hipertóniás terhesekben (n=103) egyváltozós és többváltozós Cox-regressziós modellben

Egyváltozós Cox-regressziós modell (PlGF)						
	PlGF szint 5 percentilis alatt			PlGF szint ≤ 12 pg/ml		
Változó	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI
Pozitív teszt	3,65	2,18	6,10	4,41	2,81	6,93
Többváltozós Cox-regressziós modell (PlGF és vérértelkori terhességi kor)						
Változó	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI
Pozitív teszt	4,63	2,71	7,89	5,79	3,48	9,62
Terhességi kor	0,83	0,77	0,90	0,84	0,78	0,91
Többváltozós Cox-regressziós modell (PlGF, vérértelkori terhességi kor, és PE, HELLP, SIPE diagnózis)						
Változó	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI	Hazard ratio	95%LCI	95%UCI
Pozitív teszt	3,43	1,97	5,98	3,91	2,23	6,86
Terhességi kor	0,84	0,77	0,91	0,83	0,76	0,90
PE,HELLP,SIPE	3,83	2,26	6,49	3,49	1,98	6,15

95% LCI: 95%-os konfidencia intervallum alsó határa; 95% UCI: 95%-os konfidencia intervallum felső határa; PE: praeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeclampsia

$p < 0,0001$ mindegyik hazard ratio-re a táblázatban

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

Tanulmányunkba összesen 89 hipertóniás terhes nőt vontunk be, akik az előző pontban bemutatott 103 magas vérnyomásban szenvedő terhes közül lettek kiválogatva a magzati flowmetria leletének elérhetősége alapján. Klinikai jellemzőiket a 10. táblázat ismerteti. Kóros flowmetriás leletről akkor beszéltünk, ha az arteria umbilicalison vagy a magzati aorta descendensen diasztolés blokkot vagy reverse flow-t észleltünk, illetve ha a magzati keringés centralizációját figyeltük meg. A PlGF teszt eredményét 3 kategóriába soroltuk: normális ($\text{PlGF} \geq 100$ pg/ml), alacsony ($12 \text{ pg/ml} < \text{PlGF} < 100$ pg/ml) vagy nagyon alacsony ($\text{PlGF} \leq 12$ pg/ml). Koraszülés 61 esetben történt, míg intrauterin növekedési retardáció 22 esetben fordult elő. A 11. táblázat a PlGF teszt és a magzati flowmetria eredményét mutatja be a kimenetel (koraszülés, IUGR) és a diagnózis függvényében. Mind a 20 kóros flowmetriás lelettel rendelkező terhesnek alacsony volt a plazma PlGF szintje (< 100 pg/ml), tehát a magzati flowmetria és a PlGF meghatározás magas konkordanciát mutatott ($p = 0,0023$). A 12. táblázat a PlGF teszteredményeket ismerteti normális és kóros magzati flowmetria esetén.

Azon terhes nők közül, akiknél koraszülés történt, kóros flowmetria mellett 20-ból 20 esetben, míg normális flowmetria mellett 41-ből 36 esetben volt alacsony vagy nagyon alacsony a PlGF plazmaszintje. Intrauterin növekedési retardációban 22/22 esetben volt alacsony vagy nagyon alacsony a plazma PlGF koncentráció, míg 10/22 esetben észleltünk kóros flowmetriás leletet. A 69 normális flowmetriás eredménnyel rendelkező terhes nőben a pozitív PlGF teszteredmény szignifikáns összefüggést mutatott a kedvezőtlen magzati kimenetellel ($p < 0,0001$ koraszülésre és $p = 0,0069$ IUGR-re). Huszonnégy terhesnél észleltünk kóros CTG leletet, akik közül 21 esetben volt alacsony vagy nagyon alacsony a plazma PlGF szint. Oligohydramnion 27 esetben fordult elő, 20 esetben alacsony vagy nagyon alacsony PlGF szinttel társult. Azon terhes nők közül, akiknél koraszülés történt, kóros CTG lelet mellett 20-ból 19 esetben, míg normális CTG lelet mellett 41-ből 37 esetben volt alacsony vagy nagyon alacsony a plazma PlGF koncentráció. Koraszülés esetén oligohydramnion mellett 19/21 esetben, míg normális magzatvízmennyiség mellett 37/40 esetben találtunk alacsony vagy nagyon alacsony PlGF szintet. Azon 41 hipertóniás terhes nő csoportjában, akiknél koraszülés történt, de a magzati flowmetria normális eredményt adott, kóros CTG lelet mellett 11-ből 10 esetben, míg oligohydramnion mellett 13-ból 11 esetben észleltünk alacsony vagy nagyon alacsony plazma PlGF szintet. Intrauterin növekedési retardáció esetén 10 terhesnél figyeltünk meg kóros CTG leletet és 10 terhesnél találtunk oligohydramniont.

10. táblázat

Hipertóniás terhes nők klinikai jellemzői

Diagnózis	Összes (n=89)	GHT (n=17)	CHT (n=24)	PE (n=19)	HELLP (n=12)	SIPE (n=17)
Életkor (év)	33 (30-36)	34 (33-35)	33 (30-37)	33 (27-37)	30 (29-33)	34 (32-36)
Terhesség előtti BMI (kg/m ²)	26,2 (23,1-33,1)	26,2 (23,1-30,8)	30 (25,9-36,2)	25,6 (22,4-29,7)	29,8 (23,7-35,5)	24,4 (21,9-30)
Primiparák (%)	51 (57,3)	11 (64,7)	12 (50)	11 (57,9)	9 (75)	8 (47,1)
Dohányzók (%)	7 (7,9)	0 (0)	2 (8,3)	1 (5,3)	2 (16,7)	2 (11,8)
Kórelőzményben PE (%)	12 (13,5)	1 (5,9)	3 (12,5)	3 (15,8)	2 (16,7)	3 (17,6)
Terhességi kor vérvételkor (hét)	32 (28-33)	33 (31-34)	33 (31-34)	30 (28-33)	29 (27-32)	31 (28-32)
Terhességi kor szüléskor (hét)	34 (30-37)	38 (36-39)	37 (34-38)	31 (28-34)	29 (27-32)	32 (30-36)
Vérvétel és szülés között eltelt idő (nap)	8 (1-29)	29 (24-51)	20 (4-43)	1 (0-3)	1 (0-2)	8 (3-25)
Újszülött születési súlya (gramm)	1900 (1150-3100)	3330 (2690-3860)	2700 (2105-3360)	1220 (990-1770)	1125 (845-1420)	1750 (1100-2560)
Újszülött születési hossza (cm)	45 (39-52)	51 (48-55)	51 (45-53)	40 (37-45)	39 (36-44)	45 (40-51)
Koraszülés (%)	61 (68,5)	6 (35,3)	11 (45,8)	18 (94,7)	12 (100)	14 (82,4)
IUGR (%)	22 (24,7)	3 (17,6)	2 (8,3)	8 (42,1)	4 (33,3)	5 (29,4)
Korai kezdetű PE (%)	44 (49,4)	0 (0)	0 (0)	17 (89,5)	11 (91,7)	16 (94,1)
Súlyos PE (%)	41 (46,1)	0 (0)	0 (0)	18 (94,7)	12 (100)	11 (64,7)
Császármetszés (%)	78 (87,6)	12 (70,6)	19 (79,2)	19 (100)	12 (100)	16 (94,1)

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

GHT: gesztációs hipertónia; CHT: krónikus hipertónia; PE: praeeclampsia; HELLP: HELLP-szindróma; SIPE: ráakódásos praeeclampsia; BMI: testtömeg index; IUGR: intrauterin növekedési retardáció

11. táblázat

A PlGF teszt és a magzati flowmetria eredménye a kimenetel és a diagnózis függvényében

	Normális PlGF		Alacsony PlGF		Nagyon alacsony PlGF	
Magzati flowmetria	Normális	Kóros	Normális	Kóros	Normális	Kóros
n	22	0	23	3	24	17
%	24,7	0,0	25,8	3,4	27,0	19,1
Koraszülés (%)	5 (22,7)		14 (60,9)	3 (100,0)	22 (91,7)	17 (100,0)
IUGR (%)	0 (0,0)		3 (13,0)	3 (100,0)	9 (37,5)	7 (41,2)
CHT (%)	8 (36,4)		11 (47,8)	0 (0,0)	2 (8,3)	3 (17,6)
GHT (%)	10 (45,5)		3 (13,0)	1 (33,3)	2 (8,3)	1 (5,9)
HELLP (%)	0 (0,0)		2 (8,7)	0 (0,0)	6 (25,0)	4 (23,5)
PE (%)	1 (4,5)		2 (8,7)	1 (33,3)	10 (41,7)	5 (29,4)
SIPE (%)	3 (13,6)		5 (21,7)	1 (33,3)	4 (16,7)	4 (23,5)

A PlGF teszt eredményét 3 kategóriába soroltuk: normális (PlGF ≥ 100 pg/ml), alacsony (12 pg/ml < PlGF < 100 pg/ml) és nagyon alacsony (PlGF ≤ 12 pg/ml)

IUGR: intrauterin növekedési retardáció; CHT: krónikus hipertónia; GHT: gesztációs hipertónia; HELLP: HELLP-szindróma; PE: praeclampsia; SIPE: ráakódásos praeclampsia

12. táblázat

Kedvezőtlen magzati kimenetel a magzati flowmetria és a PlGF teszteredmény függvényében

	Kóros flowmetria			Normális flowmetria		
PlGF	Nagyon alacsony	Alacsony	Normális	Nagyon alacsony	Alacsony	Normális
n	17	3	0	24	23	22
%	19,1	3,4	0,0	27,0	25,8	24,7
Koraszülés (%)	17 (100,0)	3 (100,0)		22 (91,7)	14 (60,9)	5 (22,7)
p érték				<0,0001		
IUGR (%)	7 (41,2)	3 (100,0)		9 (37,5)	3 (13,0)	0 (0,0)
p érték				0,0069		

A PlGF teszt eredményét 3 kategóriába soroltuk: normális (PlGF ≥ 100 pg/ml), alacsony (12 pg/ml < PlGF < 100 pg/ml) és nagyon alacsony (PlGF ≤ 12 pg/ml)

IUGR: intrauterin növekedési retardáció

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

A vizsgálatba bevont 67 praeclampsziás, 70 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nő klinikai jellemzőit és mért laboratóriumi paramétereit a 13. táblázat szemlélteti. Súlyos praeclampsia 23 esetben, a kórkép korai kezdetű (<34. hét) formája 5 betegnél fordult elő. A plazma ADAMTS13 aktivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget a 3 vizsgálati csoport között. A von Willebrand faktor antigén plazmaszintje szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes és nem terhes nőkben. Az eredmények nem változtak meg azt követően sem, hogy életkorra, BMI-re és vérévelkori terhességi korra kovariancia analízissel (ANCOVA) adjusztáltunk. A praeclampsziás csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a plazma ADAMTS13 aktivitásában és von Willebrand faktor antigén szintjében az enyhe és súlyos praeclampsziás esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között. Meghatároztuk továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezetét 5 praeclampsziás, 5 egészséges terhes és 5 egészséges nem terhes nőben, akiket életkorra, terhességi korra és dohányzási státuszra illesztettünk. Ahogy a 6. ábra is mutatja, a von Willebrand faktor multimer szerkezete intakt volt mindegyik vizsgálati csoportban. A nagy multimerek százalékos arányában nem mutatkozott szignifikáns különbség a praeclampsziás, egészséges terhes és egészséges nem terhes nők között (medián (tartomány): 24,7 (18,5-33,7) %, 27,3 (22,2-30,2) % és 25,5 (20,2-28,8) %, rendre; $p=0,45$).

13. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=70)	Praeclampsias terhesek (n=67)
Életkor (év)	28 (23-35)	30 (28-32)	29 (26-33)
BMI vérvételkor (kg/m ²)	20,8 (19,6-22,9)	25,9 (24,2-27,7) ^b	30,0 (27,7-33,3) ^{b,d}
Dohányzók	14 (23,7%)	0 (0%) ^b	3 (4,5%) ^a
Primiparák	n.a.	45 (64,3%)	43 (64,2%)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	115 (110-120)	110 (105-120) ^a	160 (154-180) ^{b,d}
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	80 (70-80)	70 (60-80) ^b	100 (97-110) ^{b,d}
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	35 (30-36)	38 (36-39) ^d
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	38 (37-40) ^c
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3500 (3200-3800)	3200 (2450-3600) ^d
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	11 (16,4%) ^d
Trombocitaszám (sejt/μl)	194 (170-225)	192 (168-221)	214 (186-254) ^{a,c}
Szérum karbamid szint (mmol/l)	4,1 (3,5-4,8)	2,7 (2,1-3,2) ^b	3,4 (2,7-4,1) ^{a,d}
Szérum kreatinin szint (μmol/l)	66 (61-72)	47 (41-51) ^b	63 (55-70) ^d
Szérum bilirubin szint (μmol/l)	9,3 (6,6-12,4)	5,1 (3,8-6,6) ^b	7,4 (5,8-9,3) ^{a,d}
Szérum GOT aktivitás (E/l)	17 (15-20)	19 (16-21)	19 (15-24)
Szérum GPT aktivitás (E/l)	14 (12-17)	12 (10-16)	15 (11-21) ^c
Szérum LDH aktivitás (E/l)	154 (128-170)	159 (131-174)	192 (155-225) ^{b,d}
Szérum CRP szint (mg/l)	0,7 (0,5-1,8)	3,6 (1,7-7,3) ^b	6,7 (3,0-12,1) ^{b,c}
Plazma ADAMTS13 aktivitás (%)	91,6 (78,5-104,4)	96,3 (85,6-116,2)	98,8 (76,5-112,8)
Plazma VWF:Ag szint (%)	70,0 (60,2-87,3)	129,3 (105,1-182,8) ^b	187,1 (145,6-243,1) ^{b,d}

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

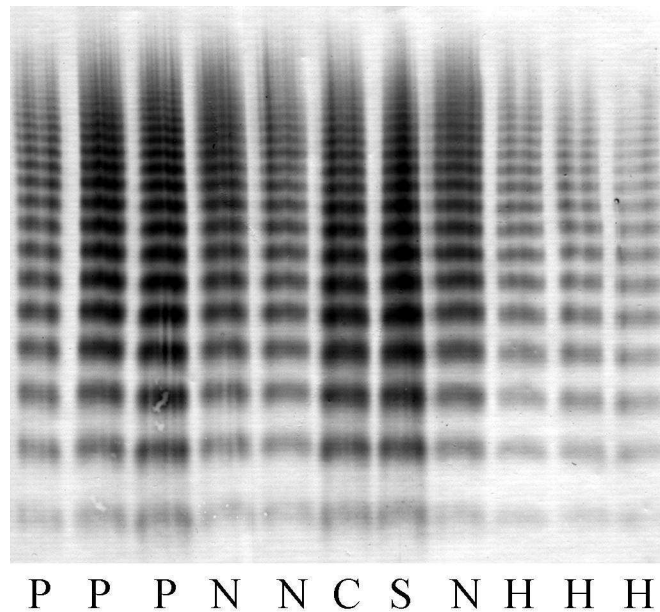
n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; LDH: laktát-dehidrogenáz; CRP: C-reaktív protein; ADAMTS13: A Disintegrin-like And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif, member 13; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők



6. ábra

A von Willebrand faktor multimer szerkezetének reprezentatív mintái egészséges nem terhes nőkben (H), egészséges terhes nőkben (N) és praeclampsziás terhesekben (P) (C: 5 egészséges véradó friss poolozott plazmája; S: Dade Behring Standard Human Plasma)

4.5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampsziában

Tanulmányunkba 44 praeclampsziás és 44 életkorra és terhességi korra illesztett egészséges terhes nőt vontunk be. Klinikai jellemzőiket a 14. táblázat, mért laboratóriumi paramétereiket a 15. táblázat ismerteti. A praeclampsziás terhesek szérum C-reaktív protein, plazma von Willebrand faktor antigén, fibronectin, malondialdehid és szabad magzati DNS szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges terheseké. Az oszteopontin plazma koncentrációjában azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a 2 vizsgálati csoport között. Azt is elemeztük, hogy a vizsgálatban részt vevő páciensek klinikai jellemzői és mért laboratóriumi paramétereik mutatnak-e összefüggést a plazma oszteopontin szintekkel. Ahogy a 7. ábra szemlélteti, praeclampsziás terhesekben szignifikáns pozitív lineáris összefüggést figyeltünk meg a plazma oszteopontin és fibronectin szintek között (Spearman $R=0,38$, $p<0,05$), többszörös lineáris regresszióval BMI-re történt adjusztálást követően is (standardizált regressziós együttható (β)= $0,41$, $p<0,05$). Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétereik, valamint a plazma oszteopontin szintek között egyik vizsgálati csoportunkban sem találtunk. Ezt követően a plazma fibronectin szint alapján praeclampsziás csoportunkat 2 alcsoportra osztottuk. Ahogy a 8. ábra mutatja, azon

praeclampsziás terhesek oszteopontin plazmaszintje, akik plazma fibronectin szintje a felső kvartilisbe esett ($\geq 0,82$ g/l), szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges terheseké, illetve azon praeclampsziás terhes nőké, akik fibronectin szintje a 75 percentilis érték alatt volt ($< 0,82$ g/l). Ebben az alcsoportban a praeclampsia súlyos formája gyakrabban fordult elő (13-ból 9 (69,2%) versus 31-ből 10 (32,3%) esetben, $p < 0,05$), és a diasztolés vérnyomás is szignifikánsan magasabb volt (medián (25-75 percentilis): 110 (100-120) versus 100 (98-110) Hgmm, $p < 0,05$), mint azon praeclampsziás terhesekben, akik fibronectin szintje a 75 percentilis érték alatt volt.

14. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=44)	Praeclampsziás terhesek (n=44)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	30,5 (28-32,5)	29 (26-32,5)	NS
BMI vérvételkor (kg/m^2)	26,1 (24,3-28,2)	29,9 (25,7-34,0)	$< 0,05$
Dohányzók	0 (0%)	3 (6,8%)	NS
Primiparák	27 (61,4%)	28 (63,6%)	NS
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	112,5 (110-120)	169,5 (160-180)	$< 0,001$
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (60-80)	100 (100-110)	$< 0,001$
Terhességi kor vérvételkor (hét)	36 (36-37)	37 (35,5-38)	NS
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	38 (36-38)	$< 0,001$
Újszülött születési súlya (gramm)	3450 (3025-3550)	2900 (2225-3350)	$< 0,001$
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	11 (25,0%)	$< 0,001$

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index

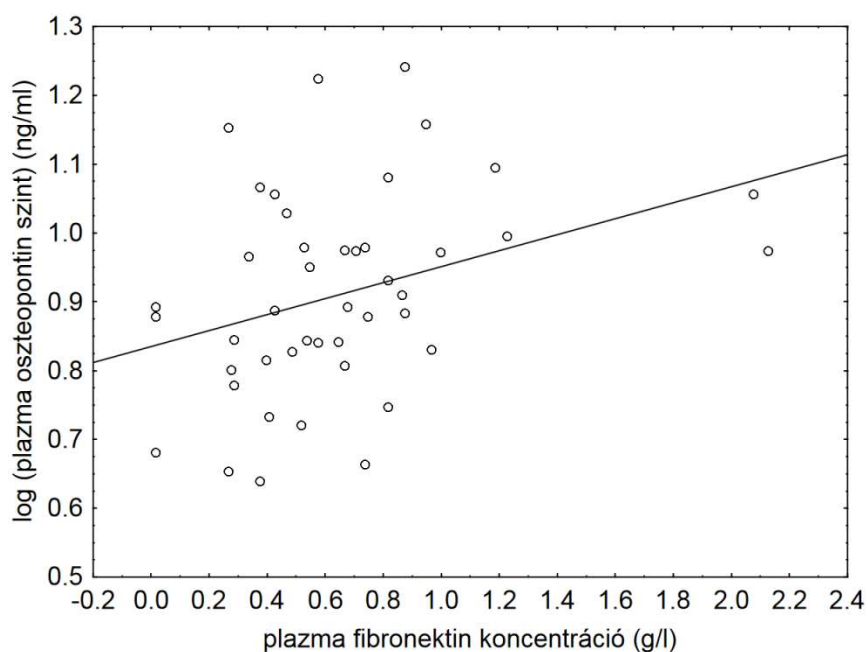
15. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek laboratóriumi paraméterei

	Egészséges terhes nők (n=44)	Praeclampsziás terhesek (n=44)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Szérum CRP szint (mg/l)	3,59 (1,68-7,40)	6,11 (1,92-12,12)	<0,05
Plazma VWF:Ag szint (%)	148,4 (106,6-199,0)	183,0 (128,7-242,8)	<0,05
Plazma fibronectin szint (g/l)	0,36 (0,32-0,47)	0,58 (0,39-0,82)	<0,001
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	13,13 (8,38-18,61)	18,17 (14,98-20,31)	<0,05
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/μl)	0,005 (0,0-0,178) [†]	0,065 (0,034-0,267) [‡]	<0,05
Plazma oszteopontin szint (ng/ml)	7,40 (6,51-8,80)	7,77 (6,60-9,67)	NS

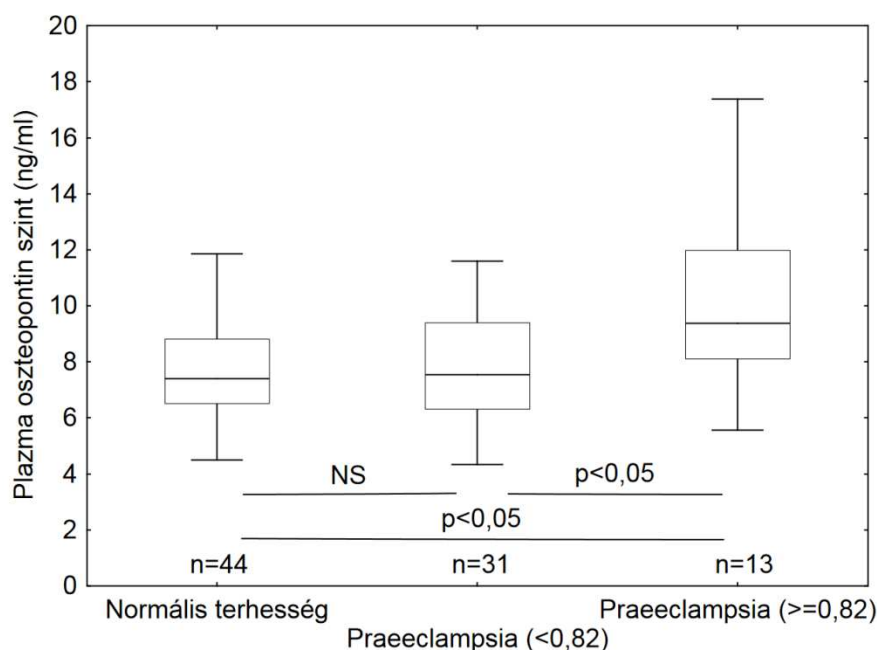
Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

NS: nem szignifikáns; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén;

DNS: deoxiribonukleinsav; [†] n=12; [‡] n=24

7. ábra

Praeclampsziás terhesek plazma oszteopontin szintje (logaritmikus értékek) a plazma fibronectin koncentráció függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=0,38$, standardizált regressziós együttható (β)=0,41, $p<0,05$ mindkettőre)



8. ábra

Plazma oszteopontin koncentráció praeeclampsziás terhesekben fibronectin plazmaszinttel a felső kvartilisben ($\geq 0,82$ g/l, n=13), a 75 percentilis alatt ($< 0,82$ g/l, n=31) és egészséges terhes nőkben (n=44)

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány; Whisker: tartomány a kilógó értékek nélkül

NS: nem szignifikáns

4.6. A szérumszintű citokin profil vizsgálata praeeclampsziában

A tanulmányunkba bevont 60 praeeclampsziás, 60 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nő klinikai jellemzőit a 16. táblázat szemlélteti. Intrauterin növekedési retardáció egészséges terhes nőknél nem volt megfigyelhető, míg a praeeclampsziás csoportban 11 esetben fordult elő. Huszonegy terhesnél alakult ki súlyos praeeclampsia és 5 betegnél a kórkép korai kezdetű (< 34 . hét) formáját észleltük. A vizsgálatban részt vevő páciensek laboratóriumi paramétereit a 17. táblázat tartalmazza. A szérumszintű glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) aktivitás kivételével a többi paraméterben szignifikáns különbséget találtunk a 3 vizsgálati csoport között. A keringésben található citokinek, kemokinek és adhézions molekulák koncentrációját a 18. táblázat ismerteti. Az IL-1 β és a TGF- β 1 szérumszintjétől eltekintve vizsgálati csoportjaink között az összes mért gyulladásos paraméterben szignifikáns különbség mutatkozott. Tekintettel arra, hogy a multiplex

szuszpenziós array technológia dinamikus tartománya széles, és így nem alkalmas nagyon alacsony koncentrációk kimutatására, az IL-17A szérumszintjét nagy szenzitivitású ELISA módszerrel határoztuk meg. Ahogy a 18. táblázat mutatja, a szérum IL-17A koncentráció szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges nem terhes és terhes nőkben. Továbbá a mérhető IL-17A koncentrációval rendelkező páciensek aránya is nagyobb volt a praeclampsziás csoportban, mint az egészséges nem terhes és terhes nők között.

16. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás terhesek (n=60)
Életkor (év)	28 (23-35)	30 (28-32)	29 (26-32)
BMI vérvételkor (kg/m ²)	20,8 (19,6-22,9)	25,8 (24,3-27,9) ^b	29,9 (26,9-33,3) ^{b,d}
Dohányzók	14 (23,7%)	0 (0%) ^b	3 (5,0%) ^a
Primiparák	n.a.	37 (61,7%)	38 (63,3%)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	115 (110-120)	110 (107-120)	162 (155-180) ^{b,d}
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	80 (70-80)	70 (60-80) ^b	100 (97-110) ^{b,d}
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	36 (36-37)	37 (36-39)
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	38 (37-39) ^d
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3450 (3150-3700)	3125 (2450-3475) ^d
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	11 (18,3%) ^d

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

17. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek laboratóriumi paraméterei

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsias terhesek (n=60)
Szérum karbamid szint (mmol/l)	4,1 (3,5-4,8)	2,8 (2,0-3,3) ^b	3,5 (2,7-4,2) ^{a,c}
Szérum kreatinin szint (μmol/l)	66 (61-72)	49 (42-56) ^b	63 (55-71) ^d
Szérum bilirubin szint (μmol/l)	9,3 (6,6-12,4)	5,4 (4,0-6,8) ^b	7,3 (5,7-8,9) ^{a,c}
Szérum GOT aktivitás (E/l)	17 (15-20)	19 (17-21)	19 (15-25)
Szérum GPT aktivitás (E/l)	14 (12-17)	12 (10-15) ^a	16 (11-23) ^c
Szérum LDH aktivitás (E/l)	154 (128-170)	158 (138-169)	192 (153-225) ^{b,d}
Szérum CRP szint (mg/l)	0,7 (0,5-1,8)	3,6 (1,7-6,6) ^b	6,8 (2,7-12,1) ^{b,c}
Plazma VWF:Ag szint (%)	70,0 (60,2-87,3)	152,6 (112,7-199,0) ^b	184,8 (139,9-243,1) ^{b,c}
Plazma fibronectin szint (g/l)	n.m.	0,37 (0,31-0,47)	0,58 (0,41-0,82) ^d
Plazma malondialdehyd szint (nmol/ml)	n.m.	15,4 (8,8-18,6)	18,3 (15,6-20,4) ^c
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/μl)	n.m.	0,002 (0,0-0,172) [†]	0,082 (0,033-0,292) ^{‡,c}

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

n.m.: nem mérve; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; LDH: laktát-dehidrogenáz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: deoxiribonukleinsav

[†] n=19

[‡] n=33

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

18. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek szérumban citokin, kemokin és adhéziónak molekulák koncentrációi (pg/ml)

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsias terhesek (n=60)
IL-1 β	24,5 (23,0-28,0)	27,0 (23,0-31,5)	28,0 (23,0-34,0)
IL-1ra	8,0 (6,7-11,0)	6,0 (5,0-7,0) ^b	18,0 (11,0-27,5) ^{b,d}
IL-2	5,0 (4,2-6,0)	4,0 (4,0-5,0) ^a	7,5 (5,5-12,0) ^{b,d}
IL-4	3,0 (2,0-3,0)	2,0 (2,0-2,0) ^b	3,0 (3,0-4,0) ^{b,d}
IL-6	6,0 (5,0-8,0)	7,0 (5,0-9,0)	15,5 (12,0-32,0) ^{b,d}
IL-8	23,0 (18,2-37,5)	24,5 (16,0-68,5)	78,0 (35,0-273) ^{b,d}
IL-10	43,7 (32,7-60,5)	15,7 (14,0-19,0) ^b	23,0 (18,0-35,0) ^{b,d}
IL-12p40	119 (109-140)	136 (118-168) ^a	185 (153-215) ^{b,d}
IL-12p70	12,0 (9,0-15,0)	5,0 (4,0-5,0) ^b	6,0 (5,0-8,0) ^{b,d}
IL-18	38,7 (33,0-46,5)	56,0 (44,0-73,7) ^b	73,5 (55,0-87,0) ^{b,c}
IFN- γ	4,0 (3,0-4,0)	3,0 (2,0-3,0) ^b	5,0 (4,0-6,0) ^{b,d}
TNF- α	2,0 (2,0-3,0)	2,0 (1,0-2,0) ^a	2,0 (2,0-3,0) ^d
TGF- β 1	342 (285-388)	364 (307-413)	383 (331-418)
IP-10	198 (142-327)	327 (222-442) ^b	688 (434-928) ^{b,d}
MCP-1	153 (87,5-233)	79,5 (52,5-110) ^b	189 (120-283) ^d
ICAM-1	6638 (6143-7205)	6789 (6201-7672)	8132 (7413-8808) ^{b,d}
VCAM-1	6151 (5767-6564)	6157 (5633-6617)	7386 (6913-7709) ^{b,d}
IL-17A	0 (0-0) [†]	0 (0-0)	0,47 (0-0,53) ^{‡,b,d}
Mérhető IL-17A szint	5 (8,9%) [†]	3 (5,0%)	32 (54,2%) ^{‡,b,d}

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

IL: interleukin; IL-1ra: IL-1 receptor antagonista; IFN: interferon; TNF: tumor nekrosis faktor; TGF: transzformáló növekedési faktor; IP: interferon- γ -indukált protein; MCP: monocita kemotaktikus protein; ICAM: intercelluláris adhéziónak molekula; VCAM: vaszkuláris sejtadhéziónak molekula

[†] n=56

[‡] n=59

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

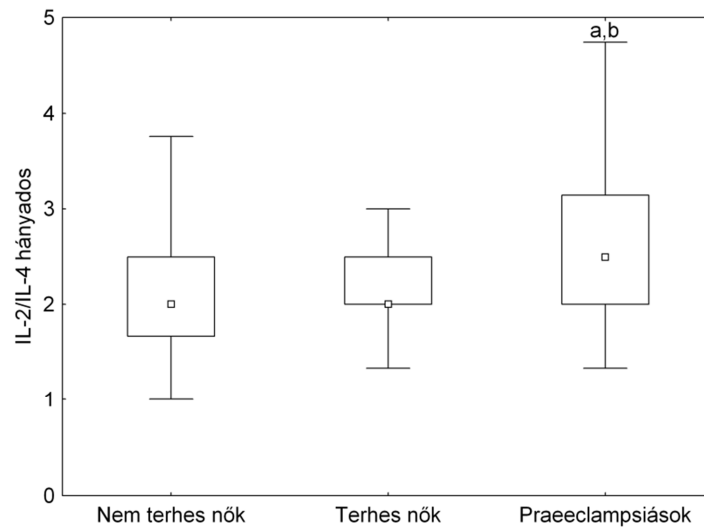
^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

Az IL-2 és IL-4, valamint az IFN- γ és IL-4 hányadosában nem találtunk szignifikáns különbséget egészséges nem terhes és terhes nők között, míg ezek az arányok praeclampsias terhesekben egészséges terhes nőkhöz képest szignifikánsan magasabbak voltak (9. és 10. ábra). Az IL-18/IL-12p70 arány szignifikánsan magasabb, míg az IL-12p70/IL-12p40 hányados szignifikánsan alacsonyabb volt egészséges terhes, mint nem terhes nőkben, azonban praeclampsias és egészséges terhes nők között nem mutattak szignifikáns különbséget.

A praeclampsias csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a vizsgált citokinek, kemokinek és adhézis molekulák szérumszintjében az enyhe és súlyos praeclampsias esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

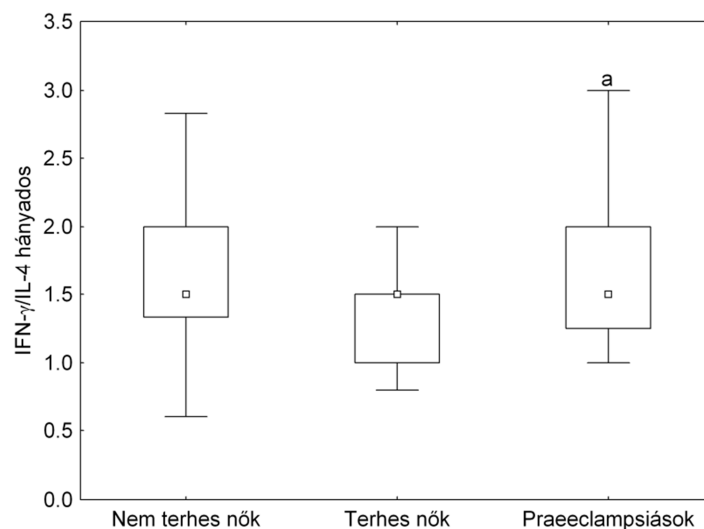
Azt is megvizsgáltuk, hogy a citokinek, kemokinek és adhézis molekulák szérumszintje milyen összefüggést mutat a tanulmányban részt vevő páciensek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel. Egészséges nem terhes nőkben a szérum IL-6 és TNF- α koncentráció szignifikánsan korrelált a CRP szinttel (Spearman $R=0,28$ és $0,29$, $p<0,05$). Az egészséges terhes nők csoportjában statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk az IL-2 és IFN- γ koncentráció, valamint a szüléskori terhességi kor között ($R=-0,27$ és $-0,29$, $p<0,05$). Egészséges terhes nők IL-6 és CRP szintje között szignifikáns pozitív korreláció ($R=0,45$, $p<0,05$), míg TGF- $\beta 1$ és malondialdehid koncentrációja között negatív korreláció volt megfigyelhető ($R=-0,38$, $p<0,05$). Egészséges terhes nők szérum IP-10 szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a szérum kreatinin ($R=0,53$, $p<0,05$), valamint a plazma VWF:Ag ($R=0,54$, $p<0,001$) és fibronektin ($R=0,42$, $p<0,05$) koncentrációkkal, míg a születési súllyal inverz korrelációban állt ($R=-0,38$, $p<0,05$). Továbbá az egészséges terhesek szérum MCP-1 koncentrációja és szérum kreatinin ($R=0,39$, $p<0,05$), illetve plazma fibronektin ($R=0,48$, $p<0,001$) szintje között pozitív korreláció adódott. A praeclampsias terhesek gyulladásos változói és klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paramétereik közötti szignifikáns korrelációkat a 19. táblázat ismerteti.



9. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek IL (interleukin)-2/IL-4 hányadosa

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül; ^a $p < 0.001$ versus egészséges nem terhes nők; ^b $p < 0.05$ versus egészséges terhes nők



10. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek IFN (interferon)- γ /IL (interleukin)-4 hányadosa

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül; ^a $p < 0.05$ versus egészséges terhes nők

19. táblázat

A praeclampsias terhesek szérumban citokin, kemokin és adhéziónak molekulák koncentrációi és klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paraméterei közötti szignifikáns korrelációk

	Korrelációs együttható	Statisztikai szignifikancia (p érték)
IP-10 & karbamid szint	0,26	<0,05
IP-10 & kreatinin szint	0,43	<0,05
IP-10 & GOT aktivitás	0,46	<0,001
IP-10 & GPT aktivitás	0,38	<0,05
IP-10 & LDH aktivitás	0,38	<0,05
IP-10 & VWF:Ag szint	0,35	<0,05
IP-10 & fibronectin szint	0,37	<0,05
MCP-1 & szisztolés vérnyomás	0,27	<0,05
MCP-1 & CRP szint	0,27	<0,05
MCP-1 & malondialdehid szint	0,27	<0,05
ICAM-1 & bilirubin szint	0,32	<0,05
ICAM-1 & GOT aktivitás	0,32	<0,05
ICAM-1 & LDH aktivitás	0,37	<0,05
ICAM-1 & CRP szint	0,30	<0,05
ICAM-1 & malondialdehid szint	0,31	<0,05
VCAM-1 & karbamid szint	0,30	<0,05
VCAM-1 & kreatinin szint	0,44	<0,001
VCAM-1 & GOT aktivitás	0,40	<0,05
VCAM-1 & LDH aktivitás	0,56	<0,001
VCAM-1 & fibronectin szint	0,41	<0,05

IP: interferon- γ -indukált protein; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; LDH: laktát-dehidrogenáz; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; MCP: monocita kemotaktikus protein; CRP: C-reaktív protein; ICAM: intercelluláris adhéziónak molekulák; VCAM: vaszkuláris sejtadhéziónak molekulák

Tanulmányunk résztvevői közül megmértük 54 praeclampsias, 58 egészséges terhes és 52 egészséges nem terhes nő szérumban sFlt-1 és PlGF koncentrációját elektrokemilumineszcens immunoassay útján. Az eredményeket a 4.1. pontban ismertettem. A ROC görbe segítségével meghatároztuk a szérumban IL-17A koncentráció (>0 pg/ml; szenzitivitás: 54,2%, specificitás: 95,0%) és az sFlt-1/PlGF hányados (>31,2; szenzitivitás: 75,9%, specificitás: 74,1%) cut-off értékeit a praeclampsias terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Többszörös logisztikus regressziós analízissel a mérhető IL-17A koncentráció és az emelkedett sFlt-1/PlGF hányados a praeclampsia egymástól független

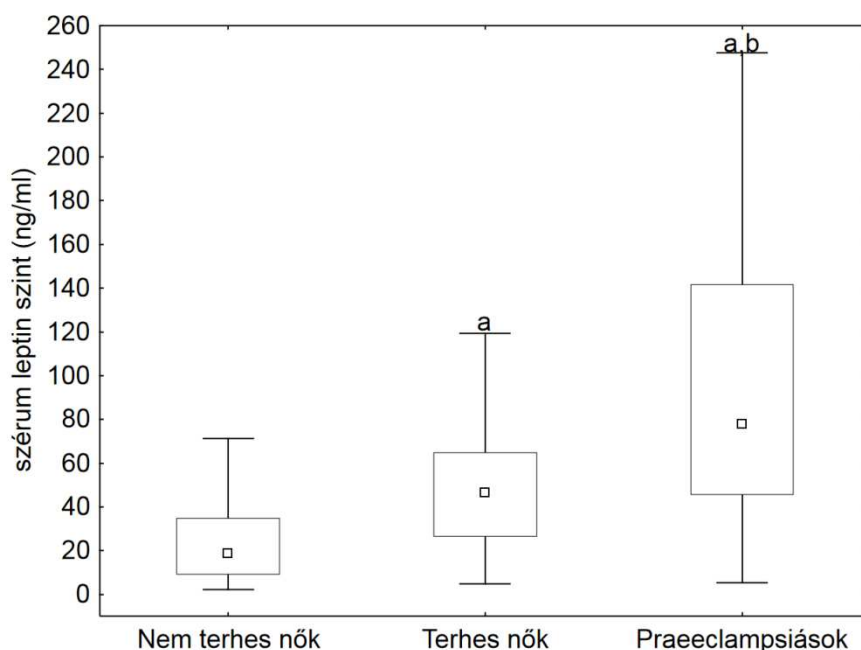
kockázati tényezőjének bizonyult (OR (95% CI) rendre: 23,2 (5,63-95,6) és 9,39 (3,29-26,8), $p < 0,0001$ mindkettőre). Azon terhes nőknek, akiknek IL-17A szintje mérhető és az sFlt-1/PlGF hányadosa emelkedett volt, lényegesen nagyobb esélye volt praeclampsziára, mint azoknak, akiknek csak az sFlt-1/PlGF hányadosa volt emelkedett, vagy csak az IL-17A szintje volt a vágóérték (0 pg/ml) felett (OR (95% CI) rendre: 286 (15,4-5307), $p < 0,0001$ versus 7,31 (2,45-21,8), $p < 0,001$ és 13,0 (2,54-66,4), $p < 0,05$).

4.7. A szérumban leptin koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhézions molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampsziában

A vizsgálatban részt vevő 60 praeclampsziás, 60 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nő megegyezik a 4.6. pontban bemutatottakkal. Klinikai jellemzőiket a 16. táblázat, laboratóriumi paramétereiket a 17. és 18. táblázat tartalmazza. Ötvennégy praeclampsziás, 58 egészséges terhes és 52 egészséges nem terhes nőben az sFlt-1 és PlGF szérumszintjét is meghatároztuk (2. táblázat). Ahogy a 11. ábra szemlélteti, a szérumban leptin koncentráció szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás és egészséges terhesekben, mint egészséges nem terhes nőkben. Továbbá a praeclampsziás terhesek szérumban leptin szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges terhes nőké. A különbségek szignifikánsak maradtak azt követően is, hogy kovariancia analízissel BMI-re adjusztáltunk.

A praeclampsziás csoporton belül nem találtunk szignifikáns különbséget a leptin szérumszintjében az enyhe és súlyos praeclampsziás esetek, a korai és késői kezdetű praeclampszia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

Egészséges nem terhes nőkben a leptin szérumszintje szignifikáns korrelációt mutatott a BMI-vel és a CRP szérumszintjével (Spearman $R=0,59$, $p < 0,001$ és $0,39$, $p < 0,05$). Egészséges terhes nőkben szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérumban leptin koncentráció és a BMI ($R=0,49$, $p < 0,001$), a szisztolés vérnyomás ($R=0,38$, $p < 0,05$), valamint a CRP ($R=0,46$, $p < 0,05$), IL-6 ($R=0,35$, $p < 0,05$) és az IP-10 ($R=0,31$, $p < 0,05$) szérumszintje között. Továbbá egészséges terhes nők szérumban leptin koncentrációja inverz korrelációban állt az újszülöttek születési súlyával ($R=-0,36$, $p < 0,05$). A praeclampsziás csoportban szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a szérumban leptin és IP-10 koncentráció között ($R=0,36$, $p < 0,05$). Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétereit, valamint a leptin szérumszintje között egyik vizsgálati csoportunkban sem találtunk.



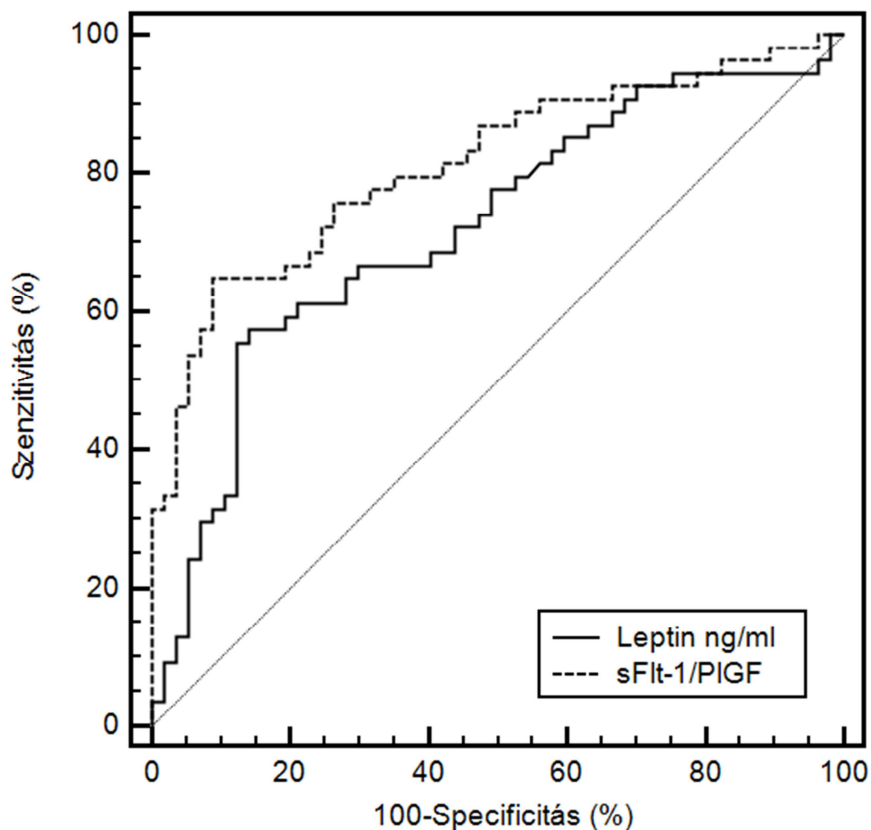
11. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeeclampsziás terhesek szérum leptin koncentrációja

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül; ^a $p < 0.001$ versus egészséges nem terhes nők; ^b $p < 0.001$ praeeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

A ROC görbe (12. ábra) segítségével meghatároztuk a szérum leptin koncentráció ($>74,3$ ng/ml; szenzitivitás: 57,6%, specificitás: 84,7%) és az sFlt-1/PlGF hányados ($>31,2$; szenzitivitás: 75,9%, specificitás: 74,1%) cut-off értékeit a praeeclampsziás terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Többszörös logisztikus regressziós analízissel az emelkedett leptin koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados a praeeclampsia egymástól független kockázati tényezőjének bizonyult (OR (95% CI) rendre: 9,16 (3,16-26,5) és 8,89 (3,34-23,7), $p < 0.001$ mindkettőre; BMI-re történő adjusztálást követően: 5,03 (1,48-17,1), $p < 0,05$ és 11,3 (3,24-39,2), $p < 0,001$). Azon terhes nőknek, akiknek mind a szérum leptin szintje, mind az sFlt-1/PlGF hányadosa emelkedett volt, lényegesen nagyobb esélye volt praeeclampsziára, mint azoknak, akiknek csak vagy az sFlt-1/PlGF hányadosa, vagy a leptin koncentrációja volt emelkedett (OR (95% CI) rendre: 80,5 (14,4-450), $p < 0,001$ versus 9,0 (2,80-29,0), $p < 0,001$ és 9,33 (2,27-38,4), $p < 0,05$), még a BMI-re többszörös logisztikus regressziós analízissel történő

illesztést követően is (adjusztált OR (95% CI) rendre: 65,9 (9,47-459), $p < 0,001$ versus 6,91 (1,55-30,7), $p < 0,05$ és 1,42 (0,15-13,0), $p > 0,05$).



12. ábra

A szérumban lelt leptin koncentráció (folyamatos vonal) és szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1/placentáris növekedési faktor hányados (sFlt-1/PlGF, szaggatott vonal) Receiver Operating Characteristic (ROC) görbéje a praeclampsias és egészséges terhes nők elkülönítésére

4.8. A Hsp70 (HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsias terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel

Tanulmányunkba 67 praeclampsias és 70 egészséges terhes nőt vontunk be. A beteganyag a 4.4. pontban ismertetett tanulmány egészséges terhes és praeclampsias csoportjával azonos. Klinikai jellemzőiket és laboratóriumi paramétereiket a 20. táblázatban foglaltam össze. A Hsp70 szérumszintje szignifikánsan magasabb volt praeclampsias terhesekben, mint egészséges terhes nőkben. A praeclampsias csoportban a szérumban Hsp70 koncentráció szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a szérumban CRP szinttel (Spearman $R=0,32$, $p=0,010$), a szérumban GOT ($R=0,32$, $p=0,008$) és LDH ($R=0,50$, $p<0,001$) aktivitással,

valamint a plazma malondialdehid szinttel ($R=0,25$, $p=0,043$). A szórás diagramokat a 13. ábra mutatja be. Más összefüggést a praeclampsias terhesek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei, valamint szérums Hsp70 koncentrációja között nem találtunk.

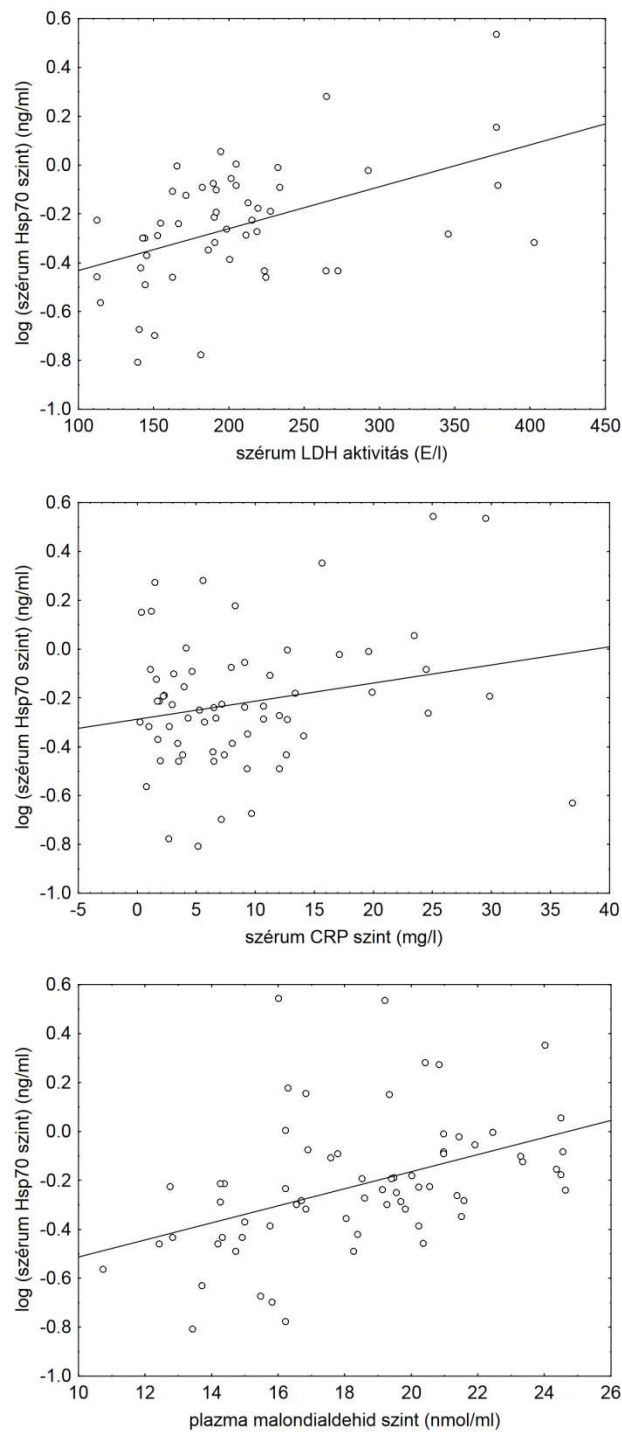
20. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei

	Egészséges terhes nők (n=70)	Praeclampsias terhesek (n=67)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	30 (17-44)	29 (19-42)	NS
BMI vérvételkor (kg/m^2)	25,9 (19,0-42,0)	30,0 (20,6-38,3)	<0,001
Dohányzók	0 (0%)	3 (4,5%)	NS
Primiparák	45 (64,3%)	43 (64,2%)	NS
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (80-138)	160 (135-220)	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (55-86)	100 (90-131)	<0,001
Terhességi kor vérvételkor (hét)	35 (20-40)	38 (30-41)	<0,001
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (35-41)	38 (33-41)	<0,05
Újszülött születési súlya (gramm)	3500 (2650-4400)	3200 (1400-4200)	<0,001
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	11 (16,4%)	<0,001
Szérums karbamid szint (mmol/l)	2,7 (1,7-4,8)	3,4 (0,8-6,5)	<0,001
Szérums kreatinin szint ($\mu\text{mol/l}$)	47 (34-79)	63 (36-95)	<0,001
Szérums bilirubin szint ($\mu\text{mol/l}$)	5,1 (1,8-15,2)	7,4 (2,1-20,9)	<0,001
Szérums GOT aktivitás (E/l)	19 (10-38)	19 (10-148)	NS
Szérums GPT aktivitás (E/l)	12 (7-32)	15 (6-233)	<0,05
Szérums LDH aktivitás (E/l)	159 (93-211)	192 (113-403)	<0,001
Szérums CRP szint (mg/l)	3,6 (0,5-28,0)	6,7 (0,3-36,9)	<0,05
Plazma VWF:Ag szint (%)	129,3 (47,8-297,1)	187,1 (43,3-423,0)	<0,001
Plazma fibronektin szint (g/l)	0,33 (0,14-0,84)	0,58 (0,02-2,13)	<0,001
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/ μl)	0,001 (0,0-0,845) [†]	0,086 (0,002-3,200) [‡]	<0,001
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	14,74 (6,19-36,52)	18,62 (10,75-24,65)	<0,001
Szérums Hsp70 szint (ng/ml)	0,28 (0,03-0,59)	0,58 (0,15-3,47)	<0,001

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (tartomány), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; LDH: laktát-dehidrogenáz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: dezoxiribonukleinsav; Hsp70: 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje; [†] n=25; [‡] n=36



13. ábra

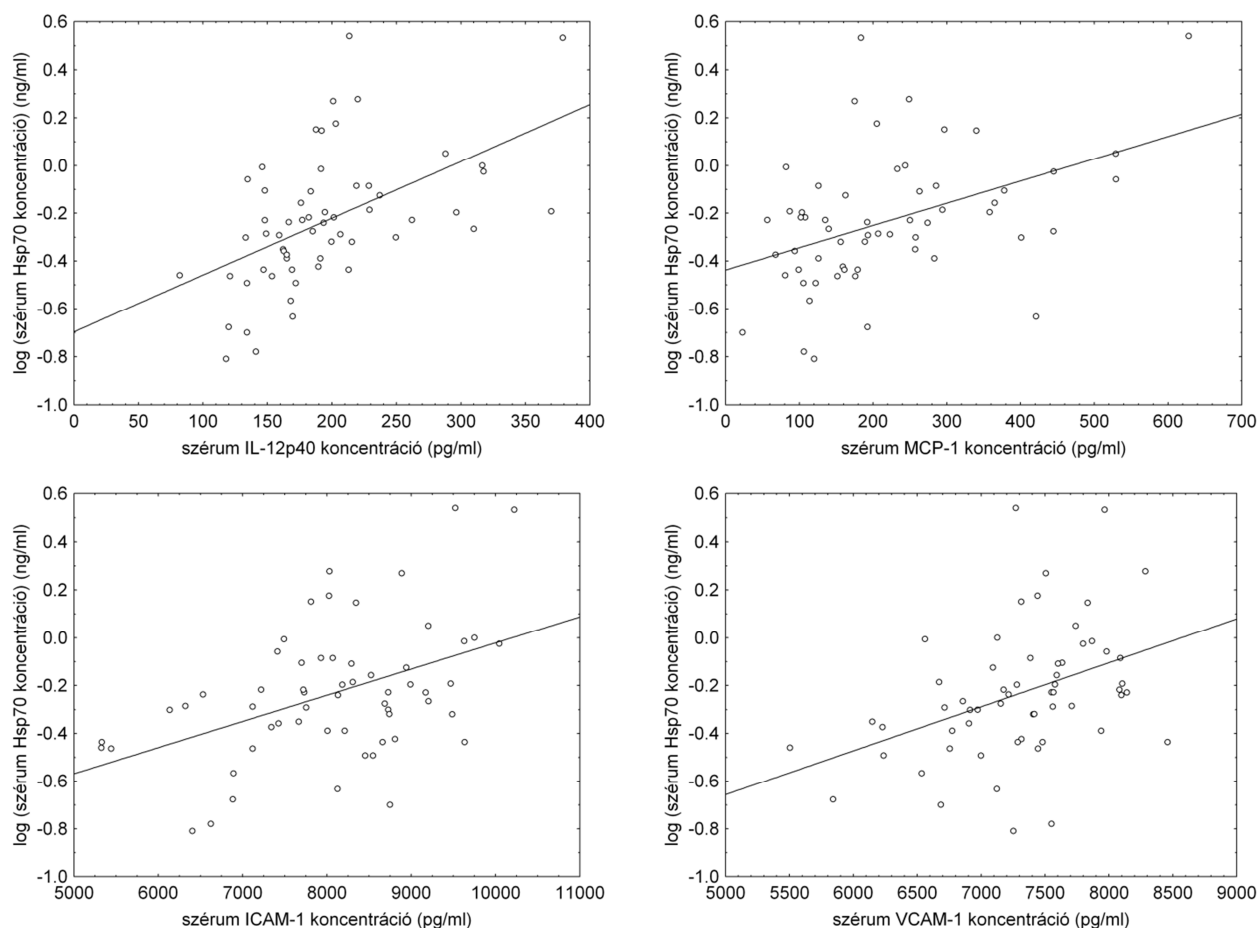
Praeeklampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70) szérumszintje (logaritmikus értékek) a szérum laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás (Spearman $R=0,50$, $p<0,001$), C-reaktív protein (CRP) szint ($R=0,32$, $p=0,010$) és a plazma malondialdehid szint ($R=0,25$, $p=0,043$) függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenesek feltüntetésével

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

A tanulmányban részt vevő 60 praeeclampsziás és 60 egészséges terhes nő megegyezik a 4.6. pontban bemutatottakkal. Klinikai jellemzőiket a 16. táblázat, laboratóriumi paramétereiket a 17. és 18. táblázat ismerteti. Ötvennégy praeeclampsziás és 58 egészséges terhes nőben az sFlt-1 és PlGF szérumszintjét is meghatároztuk (2. táblázat). A Hsp70 szérumszintje szignifikánsan magasabb volt praeeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben (medián (25-75 percentilis): 0,58 (0,39-0,81) versus 0,28 (0,21-0,31) ng/ml, $p < 0,001$).

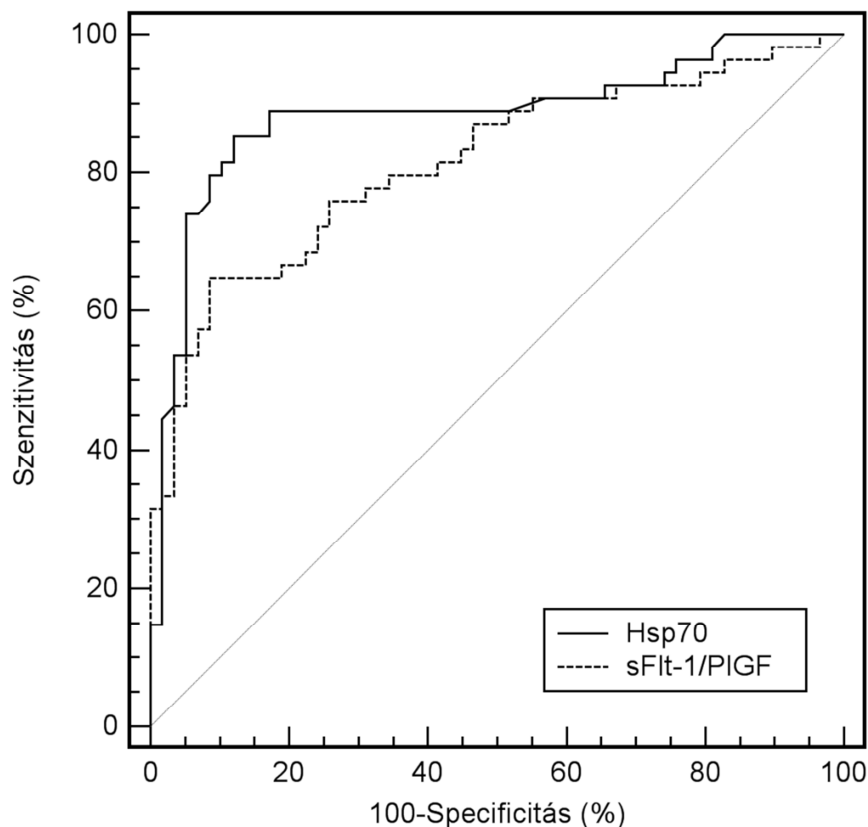
A praeeclampsziás csoportban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a Hsp70 szérumszintje és a szérumban IL-12p40 ($R=0,59$, $p < 0,001$), MCP-1 ($R=0,43$, $p < 0,001$), ICAM-1 ($R=0,39$, $p=0,0020$) és VCAM-1 ($R=0,46$, $p < 0,001$) koncentráció között. Az összefüggések az életkorra és a vérvételkor terheségi korra többszörös lineáris regressziós analízissel történő illesztést követően is szignifikánsak maradtak (standardizált regressziós együttható (β), IL-12p40: 0,52, $p < 0,001$; MCP-1: 0,45, $p < 0,001$; ICAM-1: 0,45, $p < 0,001$; VCAM-1: 0,42, $p=0,0022$). A szórás diagramokat a 14. ábra mutatja be. Más összefüggést a Hsp70 szérumszintje és a mért laboratóriumi paraméterek között nem figyeltünk meg.

A ROC görbe segítségével (15. ábra) meghatároztuk a szérumban Hsp70 koncentráció ($>0,34$ ng/ml; szenzitivitás: 86,7%, specificitás: 86,7%) és az sFlt-1/PlGF hányados ($>31,2$; szenzitivitás: 75,9%, specificitás: 74,1%) cut-off értékeit a praeeclampsziás terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Azon terhes nőknek, akiknek mind a szérumban Hsp70 koncentrációja, mind az sFlt-1/PlGF hányadosa emelkedett volt, lényegesen nagyobb esélye volt praeeclampsziára, mint azoknak, akiknek csak vagy a Hsp70 szérumszintje, vagy az sFlt-1/PlGF hányadosa volt emelkedett (OR (95% CI) rendre: 72,4 (17,4-300), $p < 0,001$ versus 8,14 (1,82-36,5), $p < 0,05$ és 0,42 (0,05-3,72), $p > 0,05$), még az életkorra és a vérvételkor terheségi korra többszörös logisztikus regressziós analízissel történő illesztést követően is (adjusztált OR (95% CI) rendre: 82,6 (17,9-381), $p < 0,001$ versus 7,80 (1,53-39,7), $p < 0,05$ és 0,38 (0,04-3,44), $p > 0,05$).



14. ábra

Praeclampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70) szérumszintje (logaritmikus értékek) az interleukin (IL)-12p40 (Spearman $R=0,59$, $p<0,001$), monocita kemotaktikus protein (MCP)-1 ($R=0,43$, $p<0,001$), intercelluláris adhéziós molekula (ICAM)-1 ($R=0,39$, $p=0,0020$) és vaszkuláris sejtadhéziós molekula (VCAM)-1 ($R=0,46$, $p<0,001$) szérum koncentrációjának függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenesek feltüntetésével



15. ábra

A szérumban 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje koncentráció (Hsp70, folyamatos vonal) és szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1/placentáris növekedési faktor hányados (sFlt-1/PIGF, szaggatott vonal) Receiver Operating Characteristic (ROC) görbéje a praeclampsia és egészséges terhes nők elkülönítésére

4.10. A hő sokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampsia-ban

Tanulmányunkba 93 praeclampsia és 127 egészséges terhes nőt vontunk be. Klinikai jellemzőiket és laboratóriumi paramétereiket a 21. táblázatban mutatom be. Súlyos praeclampsia 46 esetben, a kórkép korai kezdetű formája 19 betegnél fordult elő. Az anti-Hsp60, anti-Hsp65 és anti-Hsp70 antitestek kimutathatóak voltak az összes vizsgálatba bevont páciens szérummintájában. Az egészséges és praeclampsia terhesek között nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált antitestek szérumszintjében, még azt követően sem, hogy életkorra, BMI-re és vérérvételkorai terhességi korra kovariancia analízissel adjusztáltunk. A praeclampsia csoporton belül nem volt szignifikáns különbség az anti-Hsp60, anti-Hsp65 és anti Hsp70 antitestek szérumszintjében az enyhe és súlyos praeclampsia esetek, a korai és

késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között. A szérumszint anti-Hsp60 antitest koncentráció szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az anti-Hsp65 antitest szérumszintjével mind egészséges, mind praeclampsias terhesekben (Spearman $R=0,55$ és $0,59$, $p<0,001$ mindkettőre). Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei, valamint a vizsgált antitestek szérumszintje között egyik vizsgálati csoportunkban sem találtunk.

21. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei

	Egészséges terhes nők (n=127)	Praeclampsias terhesek (n=93)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	28 (25-31)	28 (25-32)	NS
BMI vérvételkor (kg/m^2)	26,0 (23,7-28,0)	29,4 (26,3-32,0)	<0,001
Dohányzók	2 (1,6%)	5 (5,4%)	NS
Primiparák	77 (60,6%)	59 (63,4%)	NS
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (105-120)	170 (160-180)	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (60-80)	104 (100-115)	<0,001
Terhességi kor vérvételkor (hét)	35 (31-37)	37 (35-39)	<0,05
Terhességi kor szüléskor (hét)	40 (39-40)	38 (35-39)	<0,001
Újszülött születési súlya (gramm)	3300 (3100-3800)	2900 (1980-3450)	<0,001
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	21 (22,6%)	<0,001
Szérumszint CRP szint (mg/l)	3,38 (1,69-7,27)	6,71 (2,76-12,69)	<0,001
Plazma VWF:Ag szint (%)	129,3 (105,1-182,8) [†]	187,1 (145,6-243,1) [‡]	<0,001
Plazma fibronektin szint (g/l)	0,33 (0,27-0,40) [†]	0,58 (0,41-0,79) [‡]	<0,001
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	14,74 (9,20-18,98) [†]	18,62 (15,84-20,99) [‡]	<0,001
Szérumszint Hsp70 szint (ng/ml)	0,31 (0,27-0,39)	0,55 (0,42-0,80)	<0,001
Szérumszint anti-Hsp60 szint (AU/ml)	34,7 (20,4-55,6)	33,6 (20,9-52,2)	NS
Szérumszint anti-Hsp65 szint (AU/ml)	9,6 (5,9-15,8)	8,6 (5,4-13,7)	NS
Szérumszint anti-Hsp70 szint (AU/ml)	229 (149-391)	206 (163-294)	NS

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; Hsp: hő sokkfehérje; AU: arbitrary unit (önkényes egység); [†] n=70;

[‡] n=67

4.11. A komplementrendszer vizsgálata praeclampsziában

A tanulmányban részt vevő 60 praeclampsziás, 60 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nő megegyezik a 4.6. pontban ismertetettekkel. Klinikai jellemzőiket a 16. táblázat, laboratóriumi paramétereiket a 17. táblázat tartalmazza. Ötvennégy praeclampsziás, 58 egészséges terhes és 52 egészséges nem terhes nőben az sFlt-1 és PlGF szérumszintjét is meghatároztuk (2. táblázat). A komplement aktivációs markerek, valamint a fikolin-2 és fikolin-3 keringésben mért szintjét a 22. táblázatban mutatom be. A plazma C3bBbP, C4d, C3a, SC5b9 koncentráció, valamint a szérum MBL-MASP2 aktivitás szignifikánsan magasabb, míg a plazma fikolin-2 koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt egészséges terhes, mint egészséges nem terhes nőkben. Praeclampsziás terhesekben szignifikánsan magasabb plazma C1rC1sC1-INH, C3bBbP, C4d, C3a és SC5b9 koncentrációt, valamint szignifikánsan alacsonyabb fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintet találtunk, mint egészséges terhes nőkben. Továbbá a praeclampsziás terhesek C1rC1sC1-INH, C3bBbP, C4d, C3a és SC5b9 plazmaszintje és szérum MBL-MASP2 aktivitása szignifikánsan magasabb, míg fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges nem terhes nőké. Tekintettel arra, hogy pácienseink egy részében szérum MBL-MASP2 aktivitást nem tudtunk kimutatni, az MBL-MASP2 komplex aktivitását alacsony, normális és magas alcsoportokra osztottuk az egészséges nem terhes csoport átlag és 1 SD értéke alapján. Ahogy a 16. ábra szemlélteti, a magas MBL-MASP2 aktivitással rendelkező páciensek aránya szignifikánsan magasabb volt a praeclampsziás és egészséges terhes nők csoportjában, mint egészséges nem terhes nők körében, azonban a két terhes csoport között a különbség nem volt szignifikáns.

Az alcsoport analízis szerint azon praeclampsziás terhesekben, akiknél magzati növekedési retardáció is társult a kórképhez, szignifikánsan magasabb plazma SC5b9 koncentrációt mértünk, mint azokban, akiknél IUGR nem volt észlelhető (medián (25-75 percentilis): 112,3 (59,1-147,5) versus 69,9 (46,7-107,8) ng/ml, $p < 0,05$).

22. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek komplement aktivációs markereinek keringésben mért szintje, valamint plazma fikolin-2 és fikolin-3 koncentrációja

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsias terhesek (n=60)
Plazma C1rC1sC1-INH szint (E/ml)	7,9 (5,0-11,6)	5,8 (3,4-10,3)	9,8 (6,1-13,2) ^{a,d}
Plazma C3bBbP szint (E/ml)	3,4 (2,3-5,2)	16,8 (8,3-35,8) ^b	156,6 (103,2-194,5) ^{b,d}
Szérum MBL-MASP2 aktivitás (%)	92,1 (6,8-113,1) [†]	126,6 (81,2-142,7) ^b	113,9 (0-140,3) ^b
Plazma C4d szint (µg/ml)	0,04 (0,02-0,06)	0,11 (0,08-0,15) ^b	0,16 (0,10-0,21) ^{b,c}
Plazma C3a szint (ng/ml)	85,5 (29,7-173,8)	751,6 (194,6-1660) ^b	1358 (854,8-2142) ^{b,c}
Plazma SC5b9 szint (ng/ml)	32,5 (20,5-52,8)	59,9 (42,1-86,6) ^b	75,9 (50,8-116,3) ^{b,c}
Plazma fikolin-2 szint (µg/ml)	5,5 (3,9-9,4)	3,4 (2,4-4,4) ^b	2,2 (1,6-3,0) ^{b,d}
Plazma fikolin-3 szint (µg/ml)	25,7 (20,4-29,6)	24,2 (19,1-31,3)	20,5 (14,9-25,7) ^{a,c}

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

C1-INH: C1-inhibitor; P: properdin; MBL: mannóz-kötő lektin; MASP2: MBL-asszociált szerin proteáz 2

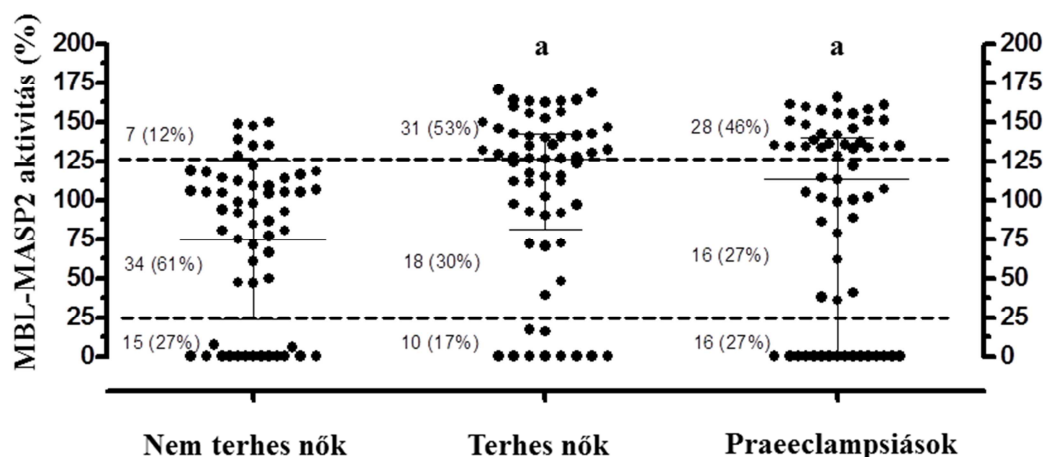
[†] n=56

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők



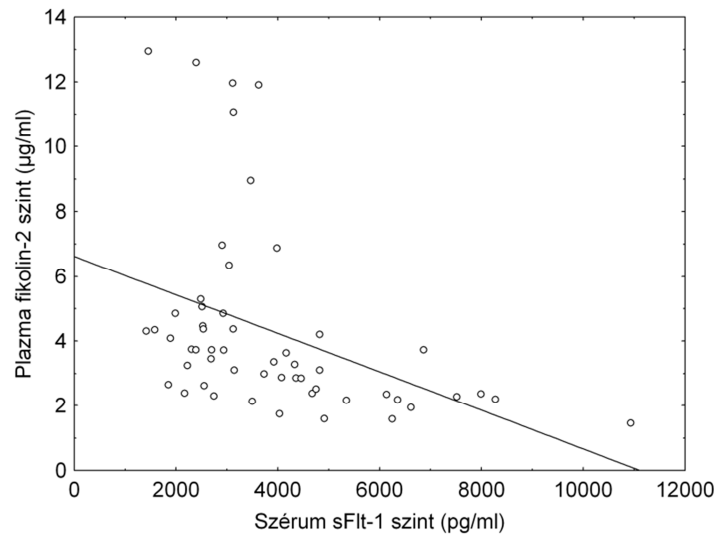
16. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek szérumban MBL (mannóz-kötő lektin)-MASP2 (MBL-asszociált szerin proteáz 2) aktivitása

A szaggatott vonalak az egészséges nem terhes csoport átlaga alatti és feletti 1 SD értéket jelölik, mely alapján az MBL-MASP2 komplex aktivitását alacsony, normális és magas alcsoportokra osztottuk

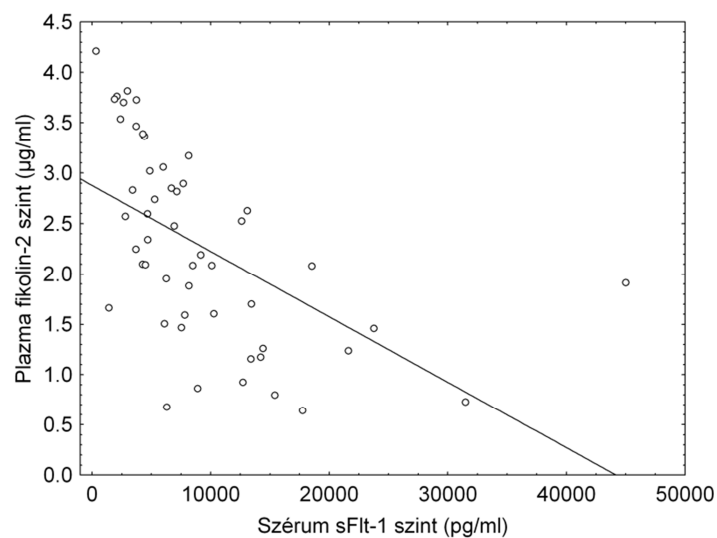
^a $p < 0,001$ versus egészséges nem terhes nők

Egészséges terhes nőkben a plazma fikolin-2 és a szérumban PlGF koncentráció között statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt (Spearman $R=0,33$, $p < 0,05$), míg a plazma fikolin-2 és a szérumban sFlt-1 szint között szignifikáns inverz korrelációt figyeltünk meg ($R=-0,59$, $p < 0,001$; 17. ábra). A praeclampsziás csoportban a fikolin-2 plazmaszintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a PlGF szérumszintjével ($R=0,34$, $p < 0,05$), míg szignifikáns inverz korrelációban állt a szérumban sFlt-1 ($R=-0,72$, $p < 0,001$; 18. ábra), karbamid ($R=-0,36$, $p < 0,05$) és kreatinin ($R=-0,38$, $p < 0,05$) szintekkel, a szérumban LDH aktivitással ($R=-0,32$, $p < 0,05$), valamint a plazma VWF:Ag ($R=-0,34$, $p < 0,05$), fibronektin ($R=-0,50$, $p < 0,001$) és szabad magzati DNS ($R=-0,41$, $p < 0,05$) koncentrációkkal. Azonban többszörös lineáris regressziós analízissel a szérumban sFlt-1 szintre történő illesztés után csak a fikolin-2 és kreatinin koncentrációk közötti összefüggés maradt szignifikáns (standardizált regressziós együttható (β)= $-0,41$, $p < 0,05$). A plazma fikolin-2 és fikolin-3 koncentráció nem mutatott összefüggést a komplement aktivációs markerek keringésben mért szintjével.



17. ábra

Egészséges terhes nők plazma fikolin-2 koncentrációja a szérumban oldható fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) szint függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0,59$, $p<0,001$)



18. ábra

Praeclampsziás terhesek plazma fikolin-2 koncentrációja a szérumban oldható fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) szint függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0,72$, $p<0,001$)

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

A vizsgálatban részt vevő 24 praeclampsziás és 30 egészséges terhes nő klinikai jellemzőit a 23. táblázatban mutatom be. Intrauterin növekedési retardáció egészséges terhes nőknél nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsziás csoportban 11 esetben fordult elő. Tizenöt terhesnél alakult ki súlyos praeclampsia és 9 betegnél a kórkép korai kezdetű (<34. hét) formáját észleltük. A VEGF-A-t expresszáló limfociták prevalenciáját a 19. ábra szemlélteti. Ahogy az ábrán is látható, szövődménymentes terhességben 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 praeclampsziában. A különbségek azt követően is szignifikánsak maradtak, hogy életkorra, primiparitásra, BMI-re és vérévételkorai terhességi korra kovariancia analízissel adjusztáltunk. A praeclampsziás csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a VEGF-A-t expresszáló limfociták prevalenciájában az enyhe és súlyos praeclampsziás esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

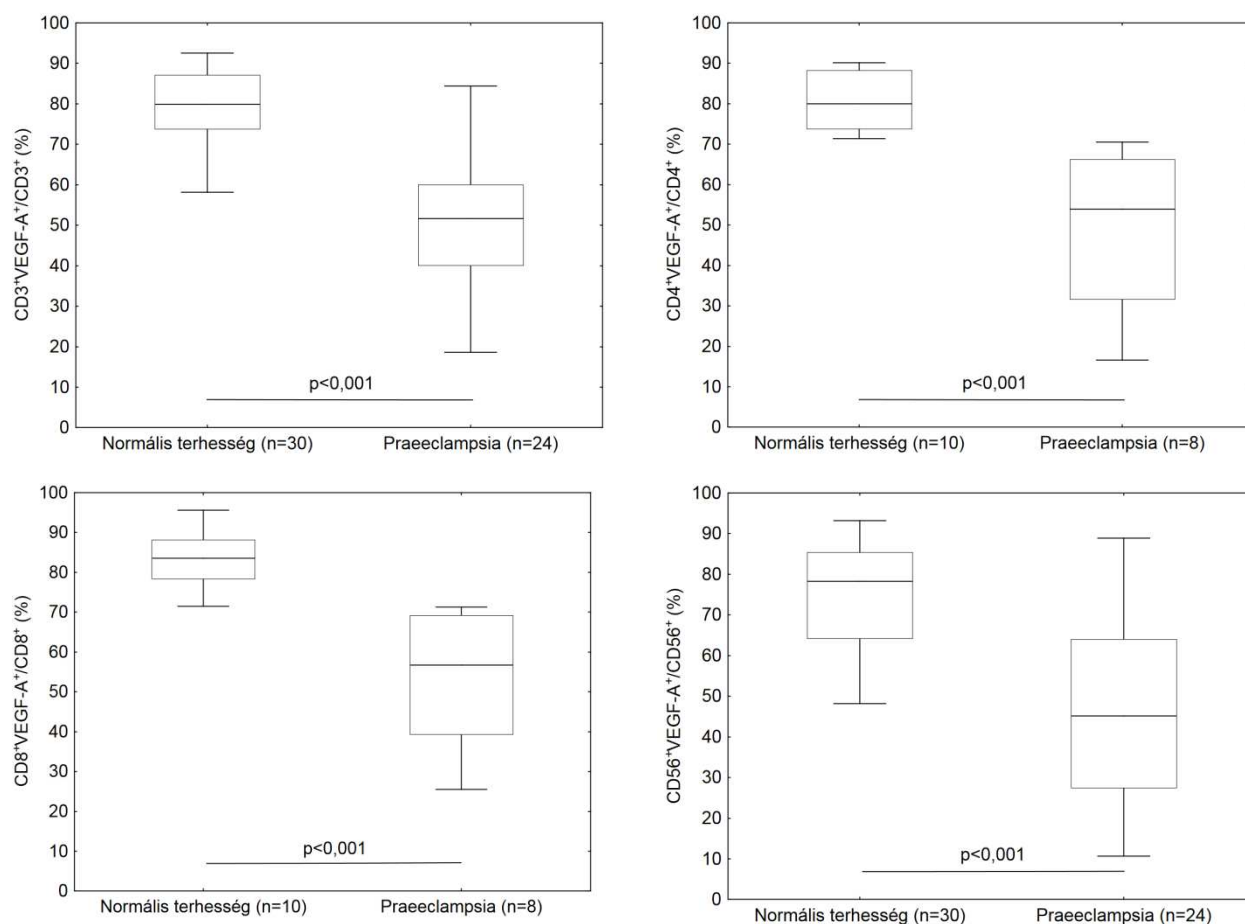
23. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=30)	Praeclampsziás terhesek (n=24)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	30 (26-32)	30 (27,5-36,5)	NS
BMI vérévételkor (kg/m^2)	26,5 (24,5-29,8)	30,0 (26,4-32,6)	<0,05
Dohányzók	1 (3,3%)	1 (4,2%)	NS
Primiparák	12 (40,0%)	19 (79,2%)	<0,05
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	120 (115-127)	164 (150-180)	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	78 (70-80)	104,5 (100-110)	<0,001
Terhességi kor vérévételkor (hét)	37 (34-38)	35 (33-37,5)	NS
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	35,5 (33-38,5)	<0,001
Újszülött születési súlya (gramm)	3255 (3150-3740)	2295 (1615-2905)	<0,001
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	11 (45,8%)	<0,001

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index



19. ábra

Vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (VEGF-A)-t expresszáló CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ és CD56⁺ limfociták prevalenciája egészséges terhes nőkben és praeclampsziás terhesekben
Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül

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

Tanulmányunkba 23 praeclampsziás, 29 egészséges terhes és 21 egészséges nem terhes nőt vontunk be. Klinikai jellemzőiket a 24. táblázat ismerteti. Súlyos praeclampsia 15 esetben, a kórkép korai kezdetű formája 9 betegnél fordult elő. A galektin-1-et expresszáló limfociták prevalenciáját a 20. ábrán mutatom be. Egészséges terhes nőkben a T (helper és citotoxikus) és NK sejtek többsége, míg nem terhes nőkben csak egy kis hányada mutatott intracelluláris galektin-1 expressziót. Praeclampsziában a galektin-1-pozitív T (helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökkent szövődménymentes terhességgel összehasonlítva. A különbségek a két terhes csoport között

azt követően is szignifikánsak maradtak, hogy életkorra, primiparitásra, BMI-re és vérévételkor terheségi korra kovariancia analízissel adjusztáltunk. A praeclampsias csoporton belül nem találtunk szignifikáns különbséget a galektin-1-et expresszáló limfociták prevalenciájában az enyhe és súlyos praeclampsias esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsias, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

24. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges nem terhes nők (n=21)	Egészséges terhes nők (n=29)	Praeclampsias terhesek (n=23)
Életkor (év)	29 (27-34)	30 (26-32)	30 (27-35)
BMI vérévételkor (kg/m ²)	22,3 (20,8-24,5)	26,7 (24,8-29,8) ^b	30,4 (25,6-33,1) ^{b,c}
Dohányzók	6 (28,6%)	1 (3,4%) ^a	1 (4,3%) ^a
Primiparák	n.a.	12 (41,4%)	18 (78,3%) ^c
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	111 (108-120)	120 (112-128)	160 (150-180) ^{b,d}
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (70-80)	79 (70-80)	101 (100-110) ^{b,d}
Terheségi kor vérévételkor (hét)	n.a.	37 (34-38)	35 (33-37)
Terheségi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	35 (33-38) ^d
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3240 (3150-3740)	2260 (1490-2690) ^d
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	11 (47,8%) ^d

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

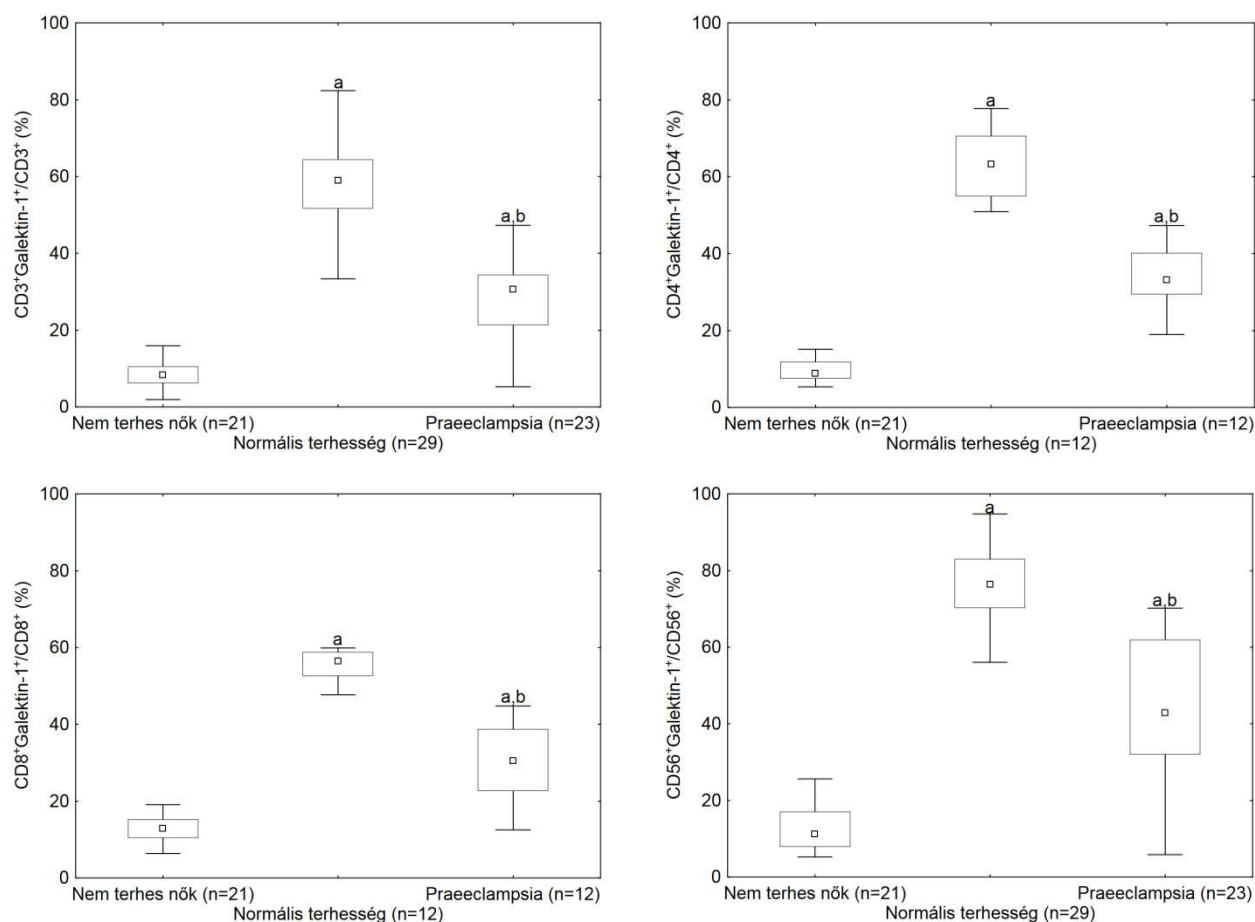
n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index

^a p<0,05 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0,05 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők

^d p<0,001 praeclampsias terhesek versus egészséges terhes nők



20. ábra

Galektin-1-et expresszáló CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ és CD56⁺ limfociták prevalenciája egészséges nem terhes és terhes nőkben, valamint praeclampsziás terhesekben

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül

^a p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

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

A vizsgálatba bevont 22 praeclampsziás és 29 egészséges terhes nő klinikai jellemzőit a 25. táblázatban ismertetem. Súlyos praeclampsia 14, a kórkép korai kezdetű formája 8 betegnél fordult elő. A granulizint expresszáló limfociták prevalenciáját a 21. ábra mutatja. Szövődménymentes terhességben a perifériás vérben található NK sejtek többsége, míg a citotoxikus T sejteknek csak egy kis hányada mutatott intracelluláris granulizin expressziót. Praeclampsziában a granulizin-termelő citotoxikus T sejtek aránya a perifériás vérben

kifejezetten megemelkedett, míg a granulizin-pozitív NK sejteké változatlan maradt. Az eredmények nem módosultak azt követően sem, hogy kovariancia analízissel életkorra, primiparitásra, BMI-re és vérvételkori terhességi korra adjusztáltunk. A praeclampsias alcsoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget a granulizint expresszáló citotoxikus T és NK sejtek prevalenciájában. Az egészséges terhes nők életkora szignifikáns inverz korrelációt mutatott a granulizin-pozitív NK sejtek arányával (Spearman $R=-0,44$, $p<0,05$). Továbbá az egészséges terhes nők csoportjában szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a BMI és a granulizin-termelő citotoxikus T és NK sejtek aránya között ($R=0,43$, $p<0,05$ mindkettőre). Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és a granulizint expresszáló limfociták gyakorisága között egyik vizsgálati csoportunkban sem találtunk.

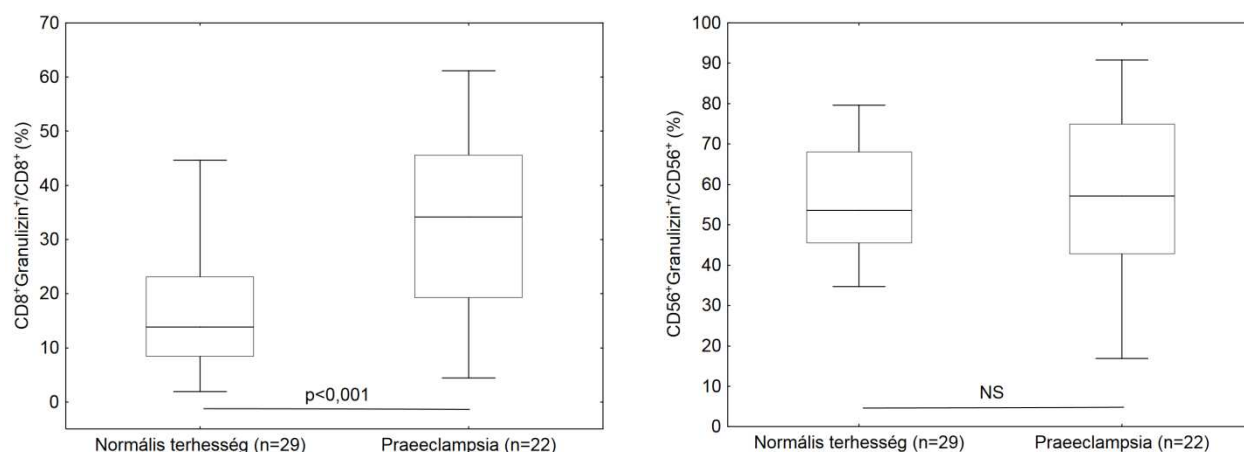
25. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=29)	Praeclampsias terhesek (n=22)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	30 (26-32)	29,5 (27-38)	NS
BMI vérvételkor (kg/m^2)	26,7 (24,8-29,8)	30,0 (27,2-33,1)	$<0,05$
Dohányzók	1 (3,4%)	1 (4,5%)	NS
Primiparák	11 (37,9%)	17 (77,3%)	$<0,05$
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	120 (115-127)	168 (150-180)	$<0,001$
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	78 (70-80)	108 (100-110)	$<0,001$
Terhességi kor vérvételkor (hét)	37 (35-38)	35 (33-37)	NS
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	35,5 (33-38)	$<0,001$
Újszülött születési súlya (gramm)	3270 (3150-3740)	2295 (1740-2690)	$<0,001$
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	10 (45,5%)	$<0,001$

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index



21. ábra

Granulizint expresszáló CD8⁺ és CD56⁺ limfociták prevalenciája egészséges terhes nőkben és praeclampsias terhesekben

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül

NS: nem szignifikáns

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

Tanulmányunkba 20 praeclampsziás és 22 egészséges terhes nőt vontunk be. Klinikai jellemzőiket a 26. táblázat tartalmazza. Az IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciáját a 27. táblázatban és a 22. ábrán ismertetem. A CXCR3⁺ CD4 sejtek prevalenciája szignifikánsan magasabb volt praeclampsziában, míg a CCR4⁺ CD4 sejteké nem mutatott szignifikáns különbséget. A CXCR3⁺/CCR4⁺ CD4 sejt arány is szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben. A Th17 sejtek aránya szignifikánsan magasabb, míg a CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ regulátoros T sejteké szignifikánsan alacsonyabb volt praeclampsziában szövődménymentes terhességgel összehasonlítva. Következésképpen a Th17/regulátoros T sejt arány is szignifikánsan magasabb volt praeclampsziában. Továbbá az IL-17A⁺ CD8 és NK sejtek prevalenciája is szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben. Az IL-17A-termelő limfociták és a CXCR3⁺ és CCR4⁺ CD4 sejtek prevalenciája között azonban nem találtunk kapcsolatot egyik vizsgálati csoportunkban sem. A praeclampsziás csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az IL-17A-termelő limfociták

prevalenciájában az enyhe és súlyos praeclampsias esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

26. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=22)	Praeclampsias terhesek (n=20)
Életkor (év)	33,5 (30-36)	32,5 (27,5-34)
Dohányzók	0 (0%)	2 (10%)
Primiparák	11 (50%)	13 (65%)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (106-114)	160 (149-180)*
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	68 (60-70)	100 (99-110)*
Terhességi kor vérvételkor (hét)	36 (34-37)	36 (30-38)
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	37 (31-39)*
Újszülött születési súlya (gramm)	3200 (3020-3640)	2825 (1365-3450)*
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	3 (15%)
Korai kezdetű praeclampsia	-	8 (40%)
Súlyos praeclampsia	-	12 (60%)

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

* $p < 0,05$

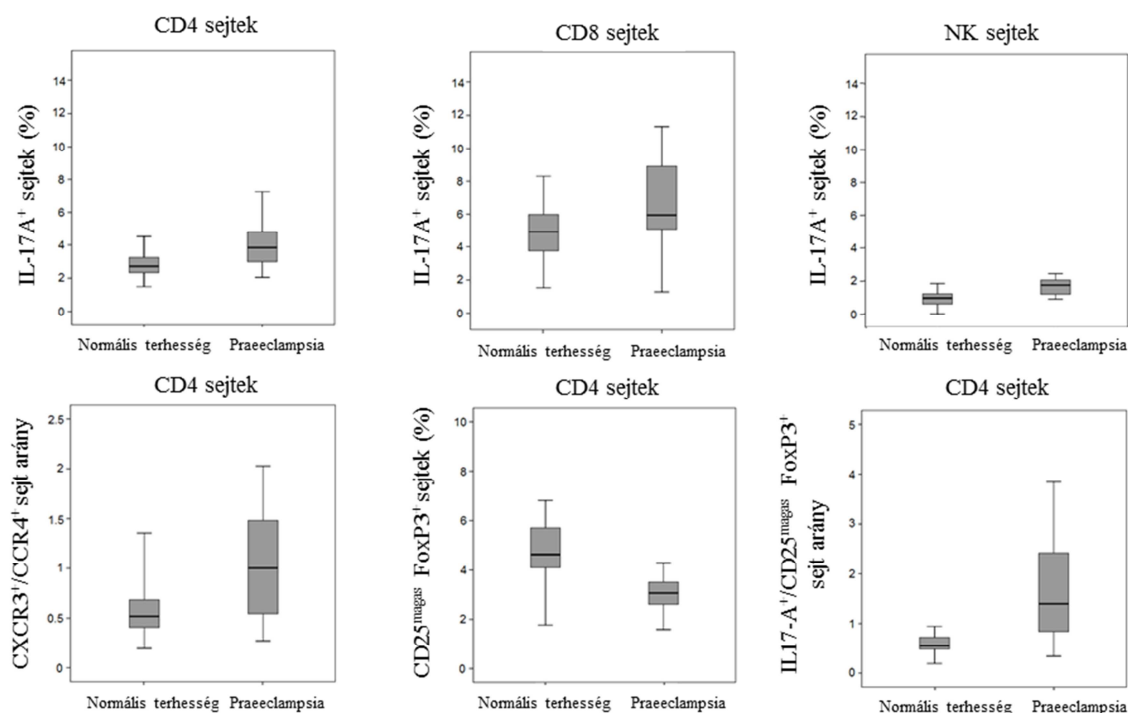
27. táblázat

Az IL-17A-termelő limfociták, Th1, Th2 és regulátoros T sejtek prevalenciája egészséges terhes nőkben és praeclampsias terhesekben

	Egészséges terhes nők (n=22)	Praeclampsias terhesek (n=20)	Statistikai szignifikancia (p érték)
CD4 sejtek			
CXCR3 ⁺ (%)	6,87 (5,60-8,81)	10,75 (7,49-15,90)	0,002
CCR4 ⁺ (%)	11,45 (10,33-16,25)	11,80 (9,66-14,85)	NS
CXCR3 ⁺ /CCR4 ⁺	0,51 (0,40-0,64)	1,00 (0,56-1,44)	<0,001
IL-17A ⁺ (%)	2,81 (2,34-3,17)	3,84 (2,99-4,73)	0,004
CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺ (%)	4,66 (4,17-5,72)	3,07 (2,62-3,45)	0,002
IL-17A ⁺ /CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺	0,55 (0,50-0,70)	1,40 (0,87-2,40)	<0,001
CD8 sejtek			
IL-17A ⁺ (%)	5,04 (3,78-6,11)	6,10 (5,18-8,95)	0,019
NK sejtek			
IL-17A ⁺ (%)	0,96 (0,63-1,17)	1,74 (1,21-2,01)	<0,001

Az adatokat mediánként (25-75 percentilis) adtam meg

NS: nem szignifikáns



22. ábra

Az IL-17A-termelő limfociták prevalenciája, a CXCR3⁺ és CCR4⁺ CD4 sejtek aránya, a CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ regulátoros T sejtek prevalenciája és a Th17 és regulátoros T sejtek aránya egészséges terhes nőkben és praeclampsziás terhesekben

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány
p<0,05 mindegyik összehasonlításra

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

A vizsgálatba bevont 20 praeclampsziás, 20 egészséges terhes és 12 egészséges nem terhes nő klinikai jellemzőit a 28. táblázat ismerteti. Súlyos praeclampszia 9, a kórkép korai kezdetű formája 11 betegnél fordult elő. A konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek prevalenciáját a 23. ábrán mutatom be. A konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ regulátoros T sejtek gyakorisága alacsonyabb volt nem terhes nőkben, mint egészséges terhesekben, és magasabb volt egészséges terhes nőkben, mint praeclampsziás terhesekben (2,99 (2,41-3,48) % versus 5,02 (4,20-5,46) % versus 2,97 (2,23-3,40) %, p<0,001). A nem konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejtek gyakorisága szintén magasabb volt

egészséges terhesekben, mint nem terhes nőkben és praeclampsziás terhesekben (1,46 (1,17-1,76) % versus 2,41 (2,06-2,65) % versus 1,60 (1,05-1,80) %, $p<0,001$). A $CD4^+$ sejteken belül a konvencionális $CD4^+ CD25^{\text{magas}} FoxP3^+$ és nem konvencionális $CD4^+ CD25^- FoxP3^+$ regulátoros T sejtek arányában az egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek között megfigyelt különbségek azt követően is szignifikánsak maradtak, hogy kovariancia analízissel a vérvételkori terhességi korra adjusztáltunk. A praeclampsziás alcsoportok között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a vizsgált sejttípusok gyakoriságában. A $CD4^+ CD25^{\text{magas}} FoxP3^+$ és $CD4^+ CD25^- FoxP3^+$ sejtek egymáshoz viszonyított arányában nem volt szignifikáns különbség egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek között.

28. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges nem terhes nők (n=12)	Egészséges terhes nők (n=20)	Praeclampsziás terhesek (n=20)
Életkor (év)	34,5 (30,5-35,5)	32 (27-34)	32,5 (30-34,5)
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	23,9 (21,4-27,0)	22,4 (20,4-27,5)	25,5 (21,5-32,6)
Dohányzók	3 (25,0%)	0 (0%) ^a	2 (10,0%)
Primiparák	n.a.	13 (65,0%)	12 (60,0%)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (100-110)	110 (110-120)	150 (140-160) ^{b,d}
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	65 (60-70)	70 (60-77)	100 (93-100) ^{b,d}
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	37 (36-38)	33,5 (31-37)
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	38 (38-39)	34,5 (32-38) ^c
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3335 (3290-3570)	1710 (1445-2885) ^d
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	7 (35,0%) ^c

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

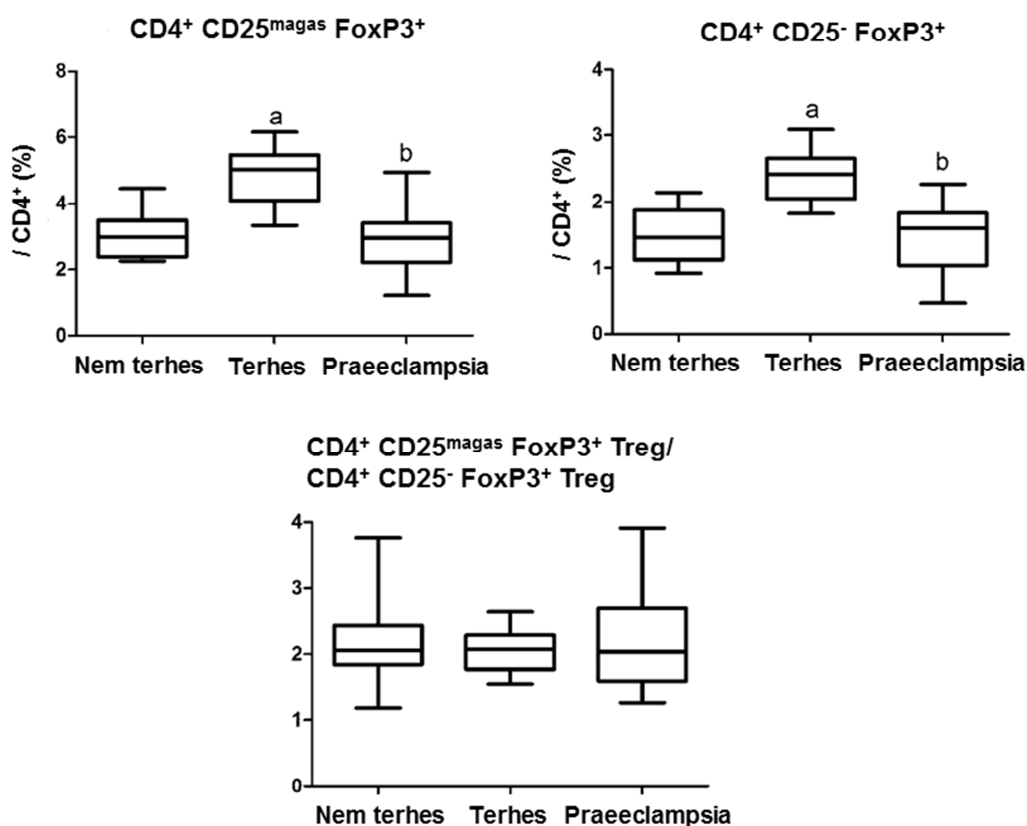
n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index

^a $p<0,05$ versus egészséges nem terhes nők

^b $p<0,001$ versus egészséges nem terhes nők

^c $p<0,05$ praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

^d $p<0,001$ praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők



23. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás terhesek perifériás vérében található CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ és CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejtek (Treg) gyakorisága, illetve a CD25^{magas} FoxP3⁺ és CD25⁻ FoxP3⁺ regulátoros T sejt-alcsoportok aránya

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány

^a p<0,001 versus egészséges nem terhes nők

^b p<0,001 praeclampsziás terhesek versus egészséges terhes nők

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

A vizsgálatba bevont 19 praeclampsziás és 21 egészséges terhes nő klinikai jellemzőit a 29. táblázat mutatja be. A regulátoros T sejtek alcsoportjainak prevalenciáját a 30. táblázat ismerteti. A CD4⁺ sejteken belül a CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ regulátoros T sejtek prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben. A CD4⁺ sejteken belül a FoxP3⁺⁺ CD45RA⁻ effektor regulátoros T sejtek prevalenciája alacsonyabb volt praeclampsziában, míg a FoxP3⁺ CD45RA⁺ naiv regulátoros T sejteké nem

mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között. A naiv regulátoros T sejtek arányát a regulátoros T sejteken belül vizsgálva azonban szignifikáns emelkedést figyeltünk meg praeclampsziában. Az aktivált CD4⁺ T sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt praeclampsziában, mint szövődménymentes terhességben. A regulátoros T sejteken belül a CD279⁺ kimerült regulátoros T sejtek prevalenciája szignifikánsan magasabb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben. A többi regulátoros T sejtcsoport prevalenciájában (Helios⁺ effektor, Helios⁺ naiv, thymicus, extrathymicus) nem találtunk szignifikáns különbséget a két vizsgálati csoport között.

29. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=21)	Praeclampsziás terhesek (n=19)
Életkor (év)	32 (28-33)	33 (28-34)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	115 (100-125)	160 (140-180)*
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (55-80)	95 (85-120)*
Terhességi kor vérvételkor (hét)	36 (35-37)	34 (31-37)
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (37-41)	35 (31-38)*
Újszülött születési súlya (gramm)	3340 (2870-3650)	2770 (2100-3450)*
Korai kezdetű praeclampsia	-	5 (26,3%)
Súlyos praeclampsia	-	7 (36,8%)

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

* p<0,05

30. táblázat

A regulátoros T sejtek alcsoportjainak prevalenciája egészséges terhes nőkben és praeeclampsias terhesekben

Alcsoport	Marker	Normális terhesség (n=21)	Praeeclampsia (n=19)	p érték
Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺ /CD4 ⁺	4,63 (4,22-5,56) %	3,69 (3,32-4,09) %	0,0003
Effektor Treg	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺⁺ CD45RA ⁻ /CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	30,5 (17,7-40,2) %	17,1 (9,88-25,6) %	0,0022
Naiv Treg	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	57,3 (30,9-77,8) %	75,2 (46,0-87,9) %	0,0014
Effektor Treg	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺⁺ CD45RA ⁻ /CD4 ⁺	2,44 (1,02-6,78) %	0,87 (0,45-1,22) %	0,0098
Naiv Treg	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺	4,58 (2,35-7,89) %	3,76 (2,11-5,67) %	NS
Aktivált T	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD45RA ⁻ /CD4 ⁺	2,56 (0,55-7,02) %	4,30 (1,78-7,85) %	0,0456
Helios+ effektor	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺⁺ CD45RA ⁻ Helios ⁺ /CD4 ⁺ FoxP3 ⁺⁺ CD45RA ⁻	72,0 (49,1-96,8) %	73,1 (50,2-92,3) %	NS
Helios+ naiv	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD45RA ⁺ Helios ⁺ /CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD45RA ⁺	56,9 (40,5-67,7) %	63,0 (37,2-75,3) %	NS
Thymicus Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺ Helios ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺	60,5 (39,9-87,2) %	60,2 (28,7-90,0) %	NS
Extrathymicus Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺ Helios ⁻ /CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺	39,5 (12,8-60,1) %	39,8 (10,1-71,8) %	NS
Kimerült Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺ CD279 ⁺ /CD4 ⁺ CD25 ^{magas} FoxP3 ⁺	8,08 (4,16-13,5) %	18,2 (9,27-36,3) %	0,0223

Az adatokat mediánként (25-75 percentilis) adtam meg

NS: nem szignifikáns; Treg: regulátoros T sejt

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

Tanulmányunkba 18 praeclampsziás és 18 egészséges terhes nőt vontunk be. Az immunhisztokémiai festést 16 lepényi mintán végeztük el mindkét vizsgálati csoportból. A tanulmány résztvevőinek klinikai jellemzőit a 31. táblázat tartalmazza. Az egészséges és praeclampsziás terhesek lepényi CB1, CB2 és FAAH expressziójának reprezentatív Western blotjait a 24. ábra szemlélteti. A kvantitatív denzitometriás analízis eredményeit a 25. ábrán mutatom be. A CB1 placentáris expressziója szignifikánsabb nagyobb volt praeclampsziás terhesekben, mint egészséges terhes nőkben (149,3 (105,0-279,7) versus 98,1 (67,3-131,0) %, $p=0,008$). A CB2 (105,5 (80,9-133,2) versus 65,8 (45,5-128,4) %, $p>0,05$) és FAAH (112,2 (94,7-143,8) versus 91,2 (63,3-128,4) %, $p>0,05$) lepényi expressziójában azonban nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a két vizsgálati csoport között.

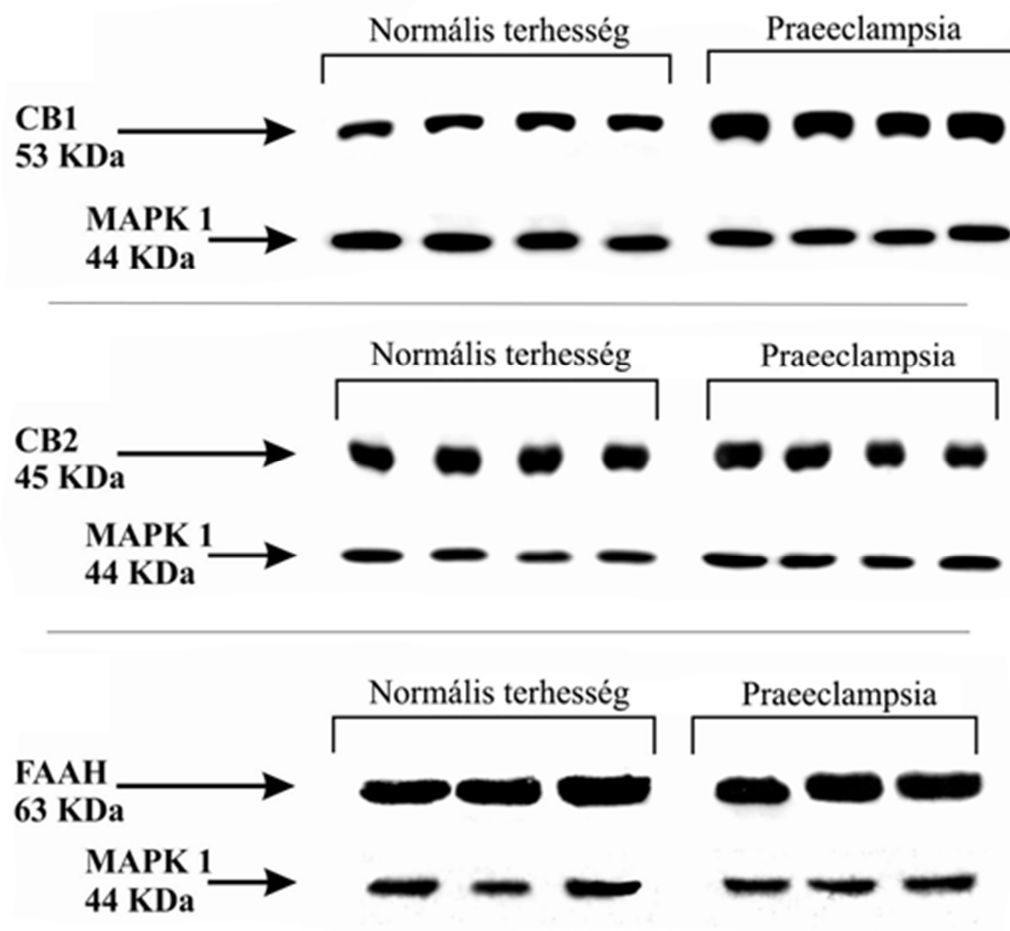
31. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=18)	Praeclampsziás terhesek (n=18)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	32 (28-35)	29 (28-32)	NS
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	21,8 (18,7-26,4)	24,2 (21,2-29,6)	NS
Dohányzók	1 (5,6%)	1 (5,6%)	NS
Primiparák	6 (33,3%)	13 (72,2%)	<0,05
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	120 (110-120)	180 (166-180)	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	80 (70-80)	110 (100-110)	<0,001
Terhességi kor szüléskor (hét)	38 (34-39)	37 (35-38)	NS
Újszülött születési súlya (gramm)	3100 (2300-3370)	2475 (1910-3400)	NS
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	4 (22,2%)	NS

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

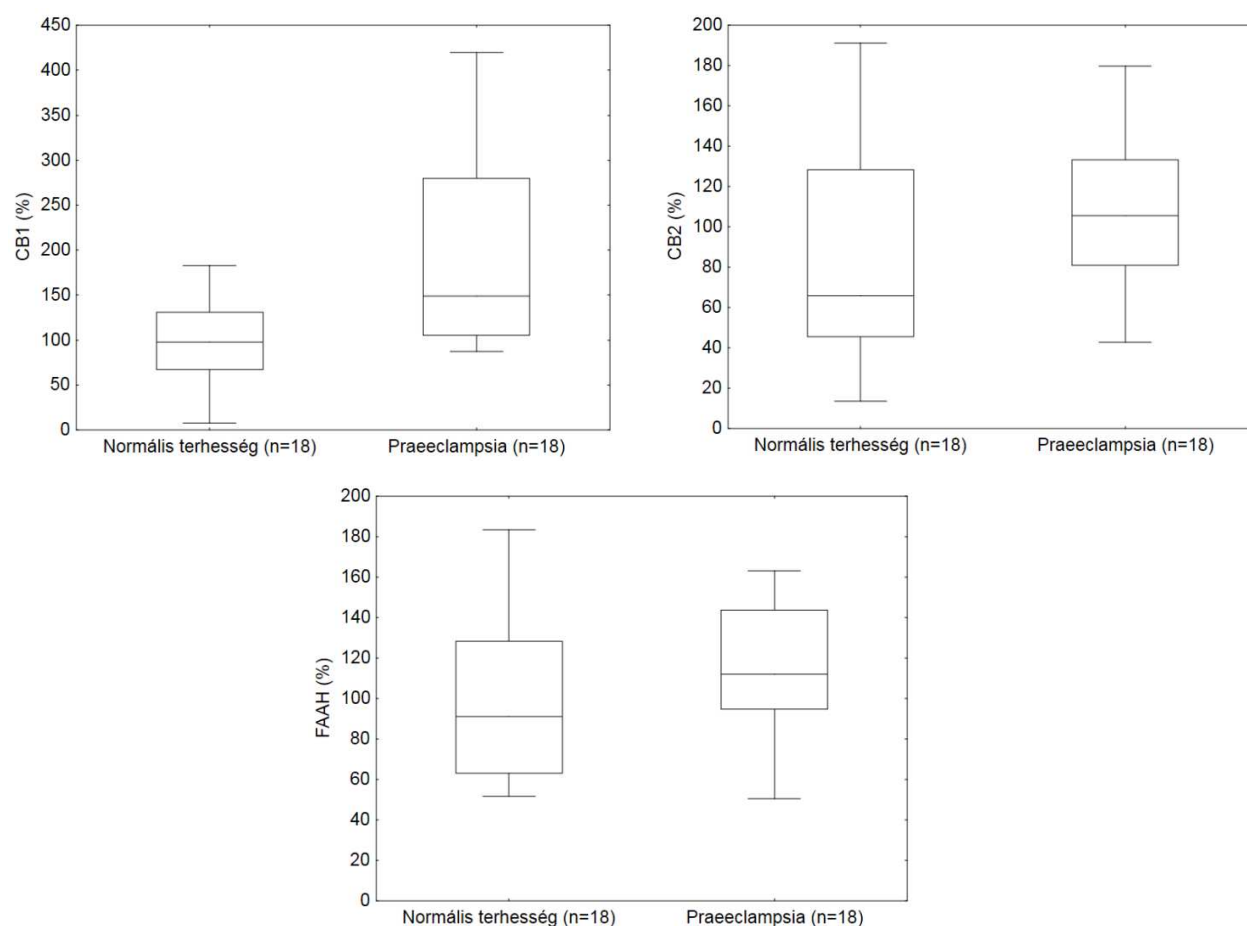
NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index



24. ábra

Egészséges terhes nők és praeeclampsziás terhesek lepényi kannabinoid receptor 1 (CB1), kannabinoid receptor 2 (CB2) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) expressziójának reprezentatív Western blotjai

MAPK1: mitogén-aktivált protein kináz 1

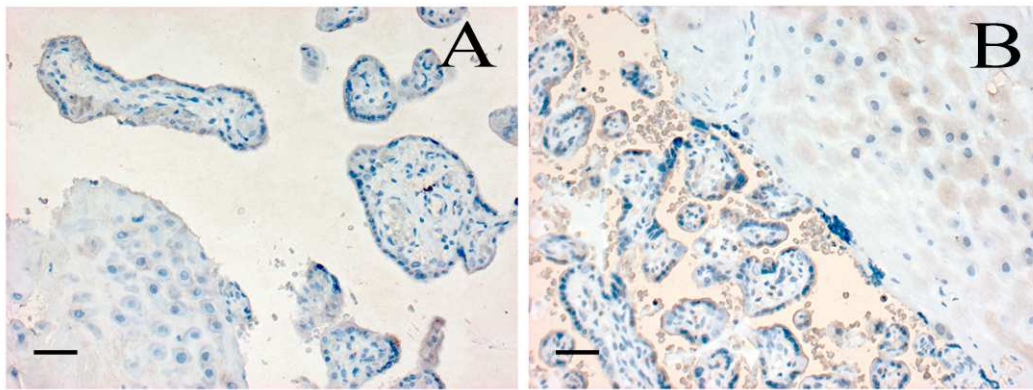


25. ábra

Egészséges terhes nők és praeclampsziás terhesek lepényi kannabinoid receptor 1 (CB1, $p=0,008$), kannabinoid receptor 2 (CB2, $p>0,05$) és zsírsav-amid hidroláz (FAAH, $p>0,05$) expressziója

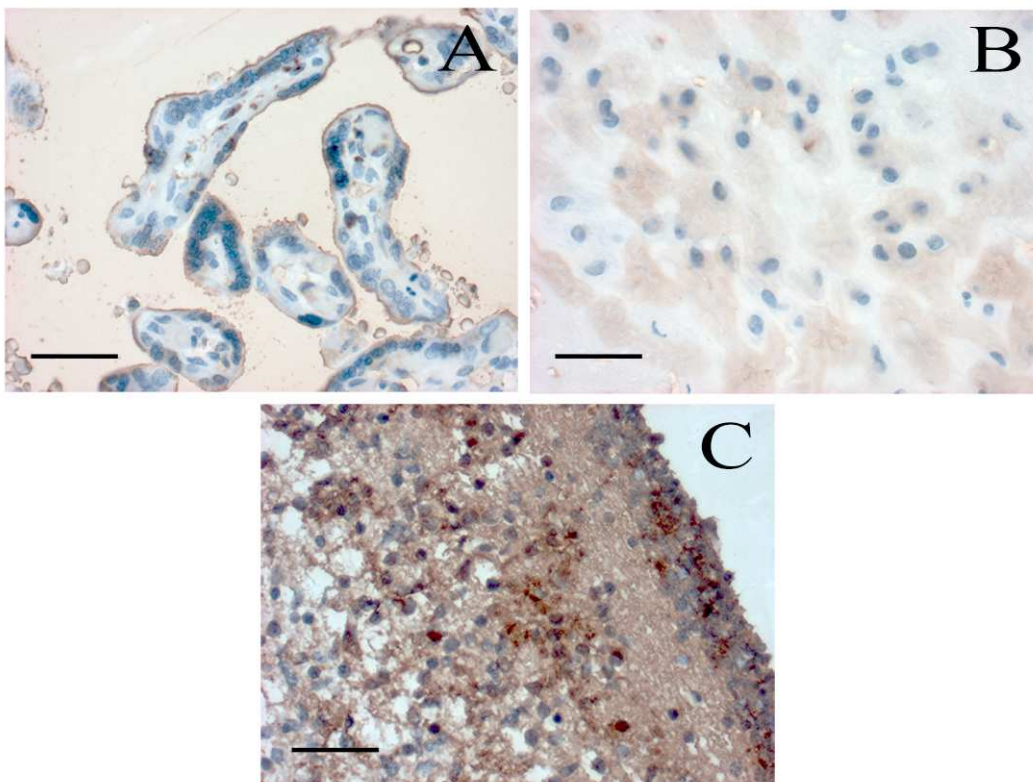
Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül

CB1 immunfestődési mintázat. Erős CB1 immunfestődést észleltünk a syncytiotrophoblast rétegben, valamint a boholykapillárisok endothelsejtjeiben. Kevésbé intenzív, de pozitív reakciót mutatott a decidua, a boholykapilláris simaizomsejtek, a stromális fibroblasztok és az amnion. Az említett lokalizációkban CB1 immunreaktivitást normális és praeclampsziás méhlepényben is megfigyeltünk, de a festődés kifejezettebben volt praeclampsziában (26. és 27. ábra).



26. ábra

Kannabinoid receptor 1 (CB1)-specifikus festődés normális (A) és praeclampsias (B) méhlepényben 200x-os nagyítás mellett (jelhossz: 100 μm)

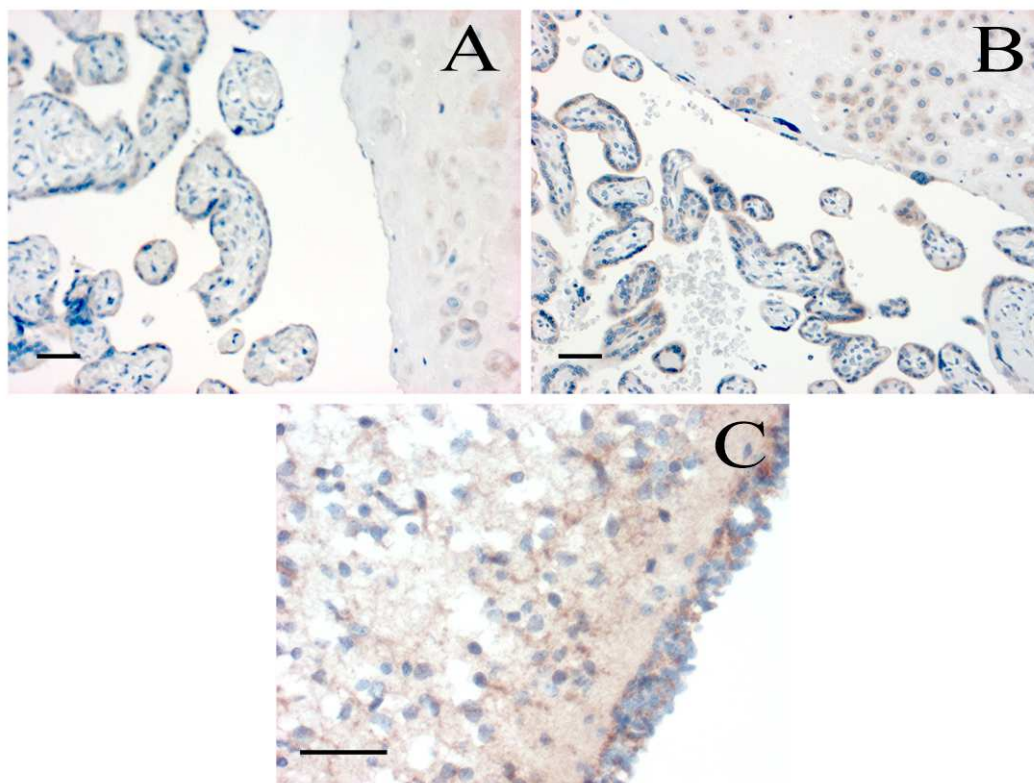


27. ábra

Erős kannabinoid receptor 1 (CB1)-specifikus festődés praeclampsias chorionbolyhokban (A) és deciduában (B), valamint CB1 festődés pozitív kontrollként használt humán kisagyszövetben (C)

A képek 400x-os nagyítás mellett készültek (jelhossz: 100 μm)

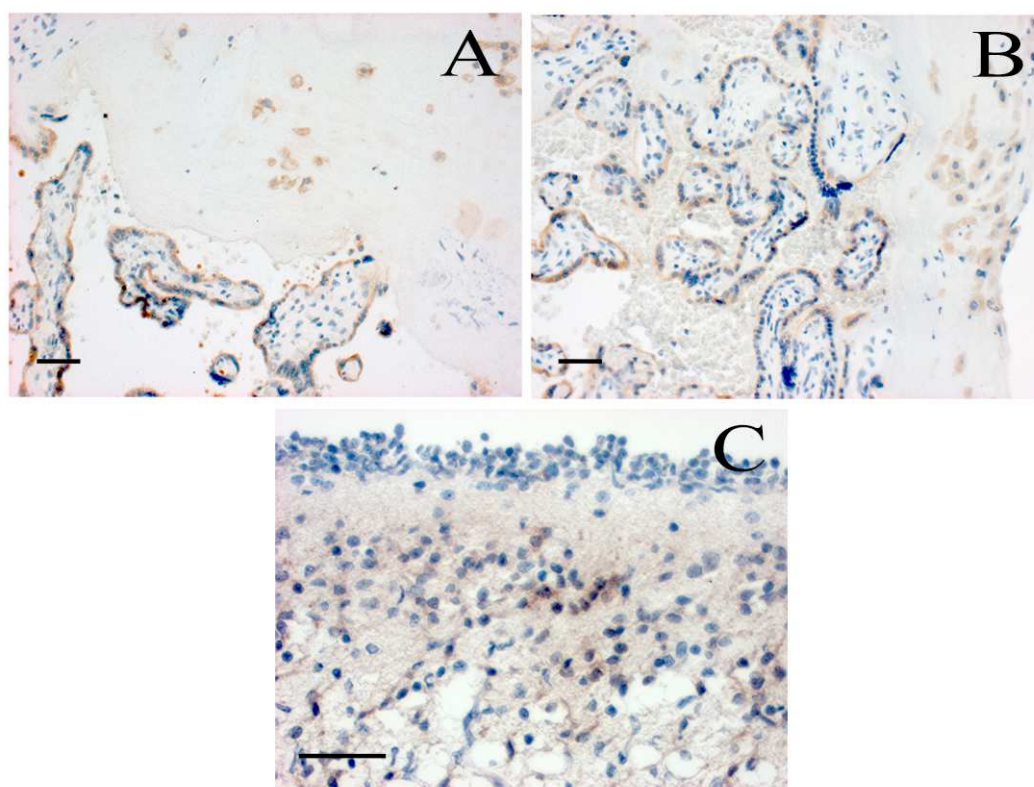
CB2 immunfestődési mintázat. CB2 immunfestődést mind normális, mind praeclampsias méhlepényben megfigyeltünk, azonban nem találtunk különbséget a festődés intenzitásában és lokalizációjában a két csoport között (28. ábra). A syncytiotrophoblast réteg és a stromális fibroblasztok pozitív reakciót mutattak, azonban a festődés intenzitása kevesbé volt erős, mint a CB1 esetében. A boholykapillárisokban nem, ugyanakkor a decíduában észleltünk CB2 festődést. Az amnion foltszerűen elszórt CB2 immunfestődést mutatott.



28. ábra

Kannabinoid receptor 2 (CB2)-specifikus festődés normális (A) és praeclampsias (B) méhlepényben 200x-os nagyítás mellett, valamint pozitív kontrollként használt humán kisagyszövetben (C) 400x-os nagyítás mellett (jelhossz: 100 μ m)

FAAH immunfestődési mintázat. A CB2 receptorhoz hasonló festődési mintázatot mutatott az FAAH enzim is. Pozitív reakciót észleltünk a syncytiotrophoblast rétegben és a stromális fibroblasztokban (bár a festődés kevésbé volt intenzív, mint a CB1 esetében). Nem találtunk FAAH immunfestődést a boholykapillárisokban, viszont megfigyelhető volt a decíduában és foltszerű eloszlásban az amnionban. Az FAAH festődés intenzitása és lokalizációja hasonló volt normális és praeclampsias méhlepényben (29. ábra).



29. ábra

Zsírsav-amid hidroláz (FAAH)-specifikus festődés normális (A) és praeclampsias (B) méhlepényben 200x-os nagyítás mellett, valamint pozitív kontrollként használt humán kisagyiszövetben (C) 400x-os nagyítás mellett (jelhossz: 100 μ m)

4.19. Az anandamid szérumszintjének meghatározása praeclampsiaiban

A vizsgálatba bevont 43 praeclampsias és 71 egészséges terhes nő klinikai jellemzőit a 32. táblázat ismerteti. Intrauterin növekedési retardáció egészséges terhes nőknél nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsias csoportban 12 esetben fordult elő. Huszonhét terhesnél alakult ki súlyos praeclampsia és 20 betegnél a kórkép korai kezdetű (<34. hét) formáját észleltük. Negyvenhárom praeclampsias és 53 egészséges terhes nőben az sFlt-1 és PlGF szérumszintjét is meghatároztuk. Ahogy a 30. ábra is mutatja, az anandamid szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt praeclampsias terhesekben, mint egészséges terhes nőkben (0,75 (0,44-1,03) versus 1,30 (0,76-2,0) ng/ml, $p < 0,001$). A praeclampsias terhesek szérumsFlt-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb (12121 (7963-18316) versus 2299 (1393-3179) pg/ml, $p < 0,001$), míg PlGF szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges terhes nőké (71,2 (39,2-86,4) versus 256,8 (181,1-421,0) pg/ml, $p < 0,001$). A különbségek azt követően is szignifikánsak maradtak, hogy életkorra, primiparitásra,

terhesség előtti BMI-re és vérvételkori terhességi korra kovariancia analízissel adjusztáltunk. A praeclampsias csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az anandamid szérumszintjében az enyhe és súlyos praeclampsias esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

Egészséges terhes nőkben a szérum anandamid koncentráció szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a terhesség előtti BMI-vel (Spearman $R=0,33$, $p<0,05$). Ennek megfelelően az egészséges terhes csoportban a túlsúlyos és obese terhesek ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) anandamid szérumszintje szignifikánsan magasabb volt, mint a normális súlyúaké (1,80 (1,20-2,60) versus 1,06 (0,70-1,61) ng/ml, $p<0,05$). Más összefüggést a páciensek klinikai jellemzői és az anandamid szérumszintje között egyik vizsgálati csoportban sem találtunk. Továbbá a szérum anandamid koncentráció nem mutatott szignifikáns korrelációt az sFlt-1 és PlGF szérumszintjével egészséges terhes, illetve praeclampsias csoportunkban.

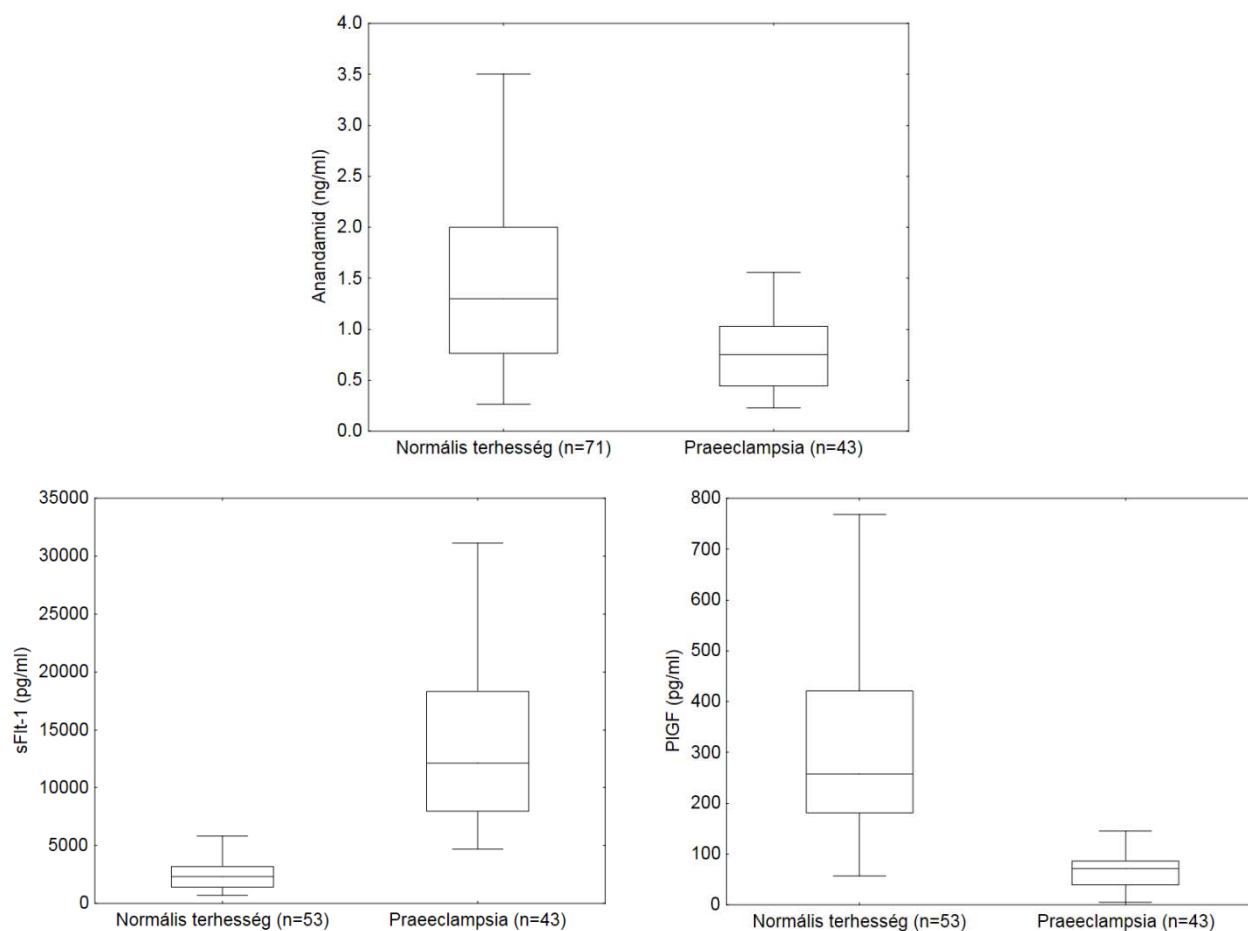
32. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=71)	Praeclampsias terhesek (n=43)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	31 (28-34)	30 (28-34)	NS
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	22,0 (20,2-25,0)	24,0 (22,0-27,0)	<0,05
Dohányzók	8 (11,3%)	4 (9,3%)	NS
Primiparák	24 (33,8%)	27 (62,8%)	<0,05
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (100-120)	160 (150-170)	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (60-80)	101 (100-110)	<0,001
Terhességi kor vérvételkor (hét)	37 (32-38)	35 (32-37)	NS
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (39-40)	35 (32-38)	<0,001
Újszülött születési súlya (gramm)	3440 (3200-3820)	2260 (1700-3000)	<0,001
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	12 (27,9%)	<0,001

Az adatokat folytonos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index



30. ábra

Egészséges terhes nők és praeeclampsziás terhesek szérumban anandamid ($p < 0,001$), szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1, $p < 0,001$) és placentáris növekedési faktor (PlGF, $p < 0,001$) koncentrációja

Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány kilógó értékek nélkül

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

Ebben a genetikai asszociációs vizsgálatunkban 119 súlyos praeeclampsziás és 103 egészséges terhes nő vett részt. Klinikai jellemzőiket a 33. táblázat tartalmazza. Az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciáit két vizsgálati csoportunkban a 34. táblázat szemlélteti. Mindkét polimorfizmus genotípus eloszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban volt a kontroll és a praeeclampsziás csoportban is. A PvuII és XbaI polimorfizmus genotípus és allél frekvenciájában nem volt szignifikáns különbség a két

csoport között. A két polimorfizmus egyidejű hordozását vizsgálva (35. táblázat) azonban azt találtuk, hogy a TT/AA genotípus kombináció szignifikánsan gyakrabban fordult elő a súlyos praeclampsziás csoportban (24,4% versus 9,7%, $p=0,003$), míg a TT/AG genotípus kombináció előfordulási gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt súlyos praeclampsziás terhesek között, mint a kontroll csoportban (5,0% versus 18,4%, $p=0,002$). Bár a CC/GG genotípus kombináció gyakrabban fordult elő a súlyos praeclampsziás csoportban, ez az összefüggés elveszítette szignifikanciáját azt követően, hogy többszörös logisztikus regresszióval életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparitásra és dohányzásra adjusztáltunk.

33. táblázat

Egészséges terhes nők és súlyos praeclampsziás terhesek klinikai jellemzői

	Súlyos praeclampsziás terhesek (n=119)	Egészséges terhes nők (n=103)	Statistikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	28 (24-32)	28 (25-31)	NS
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	$23,8 \pm 4,2$	$22,6 \pm 4,1$	$<0,05$
Dohányzók	12 (10,1%)	10 (9,7%)	NS
Primiparák	88 (73,9%)	49 (47,6%)	$<0,001$
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	180 ± 16	123 ± 8	$<0,001$
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	112 ± 10	83 ± 6	$<0,001$
Terhességi kor szüléskor (hét)	33 (30-35)	40 (39-41)	$<0,0001$
Újszülött születési súlya (gramm)	1565 ± 586	3493 ± 534	$<0,0001$
Intrauterin növekedési retardáció	58 (48,7%)	0 (0%)	$<0,0001$

Az adatokat normális eloszlású folytonos változók esetén átlag $\pm$ szórásként, nem normális eloszlású folytonos változóknál mediánként (25-75 percentilis), míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index

34. táblázat

Az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciái egészséges terhes nőkben és súlyos praeclampsias terhesekben

	Súlyos praeclampsias terhesek	Egészséges terhes nők
PvuII genotípus frekvenciák		
Genotípus	n=119 (100%)	n=103 (100%)
TT	37 (31,1%)	32 (31,1%)
TC	56 (47,1%)	53 (51,4%)
CC	26 (21,8%)	18 (17,5%)
$\chi^2=0,75$, df=2, p>0,05		
PvuII allél frekvenciák		
T	130 (54,6%)	117 (56,8%)
C	108 (45,4%)	89 (43,2%)
$\chi^2=0,21$, df=1, p>0,05		

	Súlyos praeclampsias terhesek	Egészséges terhes nők
XbaI genotípus frekvenciák		
Genotípus	n=119 (100%)	n=103 (100%)
AA	38 (31,9%)	25 (24,3%)
AG	62 (52,1%)	64 (62,1%)
GG	19 (16,0%)	14 (13,6%)
$\chi^2=2,33$, df=2, p>0,05		
XbaI allél frekvenciák		
A	138 (58,0%)	114 (55,3%)
G	100 (42,0%)	92 (44,7%)
$\chi^2=0,31$, df=1, p>0,05		

35. táblázat

Az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI genotípus kombinációinak frekvenciái egészséges terhes nőkben és súlyos praeclampsias terhesekben

Genotípus	Súlyos praeclampsias terhesek (n=119)	Egészséges terhes nők (n=103)
TT/AA	29 (24,4%)*	10 (9,7%)
TT/AG	6 (5,0%)+	19 (18,4%)
TT/GG	2 (1,7%)	3 (2,9%)
TC/AA	8 (6,7%)	12 (11,7%)
TC/AG	48 (40,3%)	36 (35,0%)
TC/GG	0 (0%)	5 (4,9%)
CC/AA	1 (0,9%)	3 (2,9%)
CC/AG	8 (6,7%)	9 (8,7%)
CC/GG	17 (14,3%)	6 (5,8%)
$\chi^2=29,05$, df=8, p<0,001		

* p=0,003, adjusztált esélyhányados (OR): 4,36, 95%-os konfidencia intervallum (CI): 1,65-11,53, TT/AA versus többi genotípus

+ p=0,002, adjusztált OR: 0,17, 95% CI: 0,06-0,53, TT/AG versus többi genotípus (életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparitásra és dohányzásra adjusztálva)

A két vizsgált polimorfizmus között szoros kapcsoltságot találtunk, ami megfelel annak, hogy csak 50 bázispár távolságra helyezkednek el egymástól az ösztrogén receptor α gén 1-es intronjában. Az Excoffier-Laval-Balding algoritmussal végzett haplotípus becslés eredményei szerint (36. táblázat) a homozigóta T-A haplotípus hordozók kockázata szignifikánsan magasabb volt súlyos praeclampsziára, ami az életkortól, terhesség előtti BMI-től, primiparitástól és dohányzástól függetlennek bizonyult (adjusztált OR (95% CI): 4,36 (1,65-11,53), $p=0,003$). A heterozigóta T-A haplotípus hordozók kockázata nem különbözött szignifikánsan a T-A haplotípust nem hordozókéktól (adjusztált OR (95% CI): 1,34 (0,64-2,83), $p>0,05$). A C-G, T-G és C-A haplotípusok nem mutattak összefüggést a súlyos praeclampsziával az életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparitásra és dohányzásra történő illesztést követően.

36. táblázat

Az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI T-A haplotípus hordozóinak és nem hordozóinak száma az egészséges terhes nők és a súlyos praeclampsziás terhesek csoportjában

	Súlyos praeclampsziás terhesek (n=119)	Egészséges terhes nők (n=103)
Homozigóta T-A hordozók	29 (24,4%)*	10 (9,7%)
Heterozigóta T-A hordozók	62 (52,1%)+	67 (65,1%)
Nem hordozók	28 (23,5%)	26 (25,2%)

* adjusztált esélyhányados (OR): 4,36, 95%-os konfidencia intervallum (CI): 1,65-11,53, homozigóta T-A hordozók versus heterozigóta T-A hordozók + nem hordozók, $p=0,003$
adjusztált OR: 5,64, 95% CI: 1,83-17,38, homozigóta T-A hordozók versus nem hordozók, $p=0,003$

+ adjusztált OR: 1,34, 95% CI: 0,64-2,83, heterozigóta T-A hordozók versus nem hordozók, $p>0,05$

(életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparitásra és dohányzásra adjusztálva)

Azt is megvizsgáltuk, hogy a két polimorfizmus mutat-e kapcsolatot az intrauterin növekedési retardációval súlyos praeclampsziás terhesekben. Eredményeink szerint a két polimorfizmus egyidejű hordozása, illetve a PvuII polimorfizmus önmagában nem befolyásolja az intrauterin növekedési retardáció kockázatát súlyos praeclampsziás terhesekben. Az XbaI polimorfizmus GG genotípusát hordozó súlyos praeclampsziás terhesek kockázata azonban szignifikánsan alacsonyabb volt intrauterin növekedési retardációra (OR (95% CI): 0,23 (0,07-0,73), $p=0,011$, 37. táblázat).

37. táblázat

Az ösztrogén receptor α gén XbaI polimorfizmusának genotípus frekvenciái súlyos praeclampsziás terhesekben intrauterin növekedési retardációval és anélkül

XbaI genotípus	Súlyos praeclampsziás terhesek intrauterin növekedési retardáció nélkül (n=61)	Súlyos praeclampsziás terhesek intrauterin növekedési retardációval (n=58)
AA	15 (24,6%)	23 (39,7%)
AG	31 (50,8%)	31 (53,4%)
GG	15 (24,6%)	4 (6,9%)*
$\chi^2=7,98$, $df=2$, $p=0,018$		

* $p=0,011$, esélyhányados (OR): 0,23, 95%-os konfidencia intervallum (CI): 0,07-0,73, GG versus többi genotípus

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

Tanulmányunkban 140 praeclampsziás, 69 HELLP-szindrómás és 144 egészséges terhes nő vett részt. Klinikai jellemzőiket a 38. táblázat ismerteti. Intrauterin növekedési retardáció egészséges terhes nőknél nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsziás csoportban 62 esetben, a HELLP-szindrómás csoportban pedig 32 esetben fordult elő. Súlyos intrauterin növekedési retardációt (az újszülött születési súlya az adott terhességi korra és nemre vonatkozó 3 percentilis értéket nem érte el) a praeclampsziás terhesek közül 22 esetben, a HELLP-szindrómás terheseknél 12 esetben észleltünk.

38. táblázat

Egészséges terhes nők, praeclampsias, valamint HELLP-szindrómás terhesek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=144)	Praeclampsias terhesek (n=140)	HELLP-szindrómás terhesek (n=69)
Életkor (év)	29,1±5,0	28,4±5,8	29,0±5,6
Terhesség előtti BMI (kg/m ²)	22,3±4,0	24,1±4,4**	26,7±4,4**
Primiparák	77 (53,5%)	97 (69,3%)*	46 (66,7%)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	111±11	170±23**	157±20**
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70±9	105±14**	102±14**
Terhességi kor szüléskor (hét)	39,6±1,2	33,3±3,6**	31,0±3,7**
Újszülött születési súlya (gramm)	3489±420	1731±756**	1264±652**
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	62 (44,3%)**	32 (46,4%)**
Súlyos IUGR	0 (0%)	22 (15,7%)**	12 (17,4%)**

Az adatokat folytonos változók esetén átlag±szórásként, míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

BMI: testtömeg index; IUGR: intrauterin növekedési retardáció

* p<0,05 versus egészséges terhes nők

** p<0,001 versus egészséges terhes nők

A tumor nekrozis faktor- α gén G-308A polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciáit vizsgálati csoportjainkban a 39. táblázat ismerteti. A TNF- α G-308A genotípus eloszlás Hardy-Weinberg egyensúlyban volt mindhárom csoportban. A TNF- α G-308A polimorfizmus genotípus és allél frekvenciájában nem volt szignifikáns különbség a praeclampsias és egészséges terhes csoport között. A homozigóta és heterozigóta mutáns allél hordozó terhesek kockázata praeclampsia-ra nem különbözött szignifikánsan a homozigóta vad allél hordozókéétől, még az életkorra, terhesség előtti BMI-re és primiparitásra többszörös logisztikus regresszióval történő illesztést követően sem (AA és GA genotípus hordozók versus GG genotípus hordozók, OR (95% CI): 0,76 (0,43-1,31), $p=0,32$; adjusztált OR (95% CI): 0,80 (0,44-1,45), $p=0,47$).

A TNF- α G-308A polimorfizmus genotípus és allél frekvenciájában szignifikáns különbséget találtunk az intrauterin növekedési retardációval társult és anélküli praeclampsias esetek között. A mutáns (TNF2 vagy A) allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő azokban a terhesekben, akiknél a praeclampsia-hoz IUGR társult, mint azokban, akiknél nem (18,5% versus 7,1%, $p=0,003$). Továbbá a mutáns allél hordozók gyakorisága is szignifikánsan nagyobb volt az előbbi csoportban (30,6% versus 12,8%, $p=0,010$). A TNF- α G-308A polimorfizmus genotípus és allél frekvenciája az egészséges terhes kontroll és a súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsias csoport között is szignifikáns különbséget mutatott ($p=0,003$ a genotípus és $p=0,001$ az allél frekvenciákra). A mutáns allél hordozó terhesek kockázata súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsia-ra szignifikánsan magasabb volt, mint a nem hordozóké, ami az életkortól, terhesség előtti BMI-től és primiparitástól függetlennek bizonyult (OR (95% CI): 2,89 (1,16-7,22), $p=0,023$; adjusztált OR (95% CI): 2,78 (1,04-7,45), $p=0,042$).

A TNF- α G-308A polimorfizmus genotípus és allél frekvenciájában nem volt szignifikáns különbség a HELLP-szindrómás és egészséges terhes csoport között. A mutáns allél hordozó terhesek kockázata HELLP-szindrómára nem különbözött szignifikánsan a nem hordozókéétől, még az életkorra, terhesség előtti BMI-re és primiparitásra többszörös logisztikus regresszióval történő illesztést követően sem (OR (95% CI): 0,80 (0,41-1,59), $p=0,53$; adjusztált OR (95% CI): 1,75 (0,51-6,02), $p=0,37$). A HELLP-szindrómás terhesek viszonylagosan alacsony száma nem tette lehetővé az IUGR jelenléte, illetve súlyossága alapján meghatározott alcsoportok vizsgálatát genetikai asszociációs vizsgálatunkban.

39. táblázat

A tumor nekrózis faktor- α gén G-308A polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciái egészséges terhes nőkben, praeclampsias (IUGR-rel, illetve IUGR nélkül), valamint HELLP-szindrómás terhesekben

	GG	GA	AA	Összes	p érték (versus egészséges terhes)	G allél	A allél	p érték (versus egészséges terhes)
Egészséges terhes	107 (74,3%)	33 (22,9%)	4 (2,8%)	144 (100%)		247 (85,8%)	41 (14,2%)	
Praeclampsias terhes	111 (79,3%)	24 (17,1%)	5 (3,6%)	140 (100%)	0,46	246 (87,9%)	34 (12,1%)	0,46
Praeclampsias terhes IUGR nélkül	68 (87,2%)	9 (11,5%)	1 (1,3%)	78 (100%)	0,081	145 (92,9%)	11 (7,1%)	0,025
Praeclampsias terhes IUGR-rel	43 (69,4%)	15 (24,2%)	4 (6,4%)	62 (100%)	0,43	101 (81,5%)	23 (18,5%)	0,27
Praeclampsias terhes súlyos IUGR-rel	11 (50,0%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)	22 (100%)	0,003	29 (65,9%)	15 (34,1%)	0,001
HELLP-szindrómás terhes	54 (78,3%)	15 (21,7%)	0 (0%)	69 (100%)	0,36	123 (89,1%)	15 (10,9%)	0,34

IUGR: intrauterin növekedési retardáció

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

Ebbe a genetikai asszociációs vizsgálatunkba 180 praeclampsias és 172 egészséges terhes nőt vontunk be. Klinikai jellemzőiket a 40. táblázat mutatja be. A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciáit két vizsgálati csoportunkban a 41. táblázat ismerteti. Mindkét polimorfizmus genotípus eloszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban volt a kontroll és a praeclampsias csoportban is. Az Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmus genotípus és allél frekvenciájában nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. A homozigóta és heterozigóta mutáns allél hordozó terhesek kockázata praeclampsiasra egyik polimorfizmus esetében sem különbözött szignifikánsan a homozigóta vad allél hordozókéthoz, még az életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparításra és dohányzásra többszörös logisztikus regresszióval történő illesztést követően sem (GG és AG

genotípus hordozók versus AA genotípus hordozók, OR (95% CI): 0,62 (0,31-1,24), $p=0,18$, adjusztált OR (95% CI): 0,60 (0,27-1,32), $p=0,20$; TT és CT genotípus hordozók versus CC genotípus hordozók, OR (95% CI): 0,59 (0,30-1,17), $p=0,13$, adjusztált OR (95% CI): 0,58 (0,27-1,28), $p=0,18$).

40. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsias terhesek klinikai jellemzői

	Praeclampsias terhesek (n=180)	Egészséges terhes nők (n=172)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	28,5±5,6	29,5±4,8	NS
Terhesség előtti BMI (kg/m ²)	24,2±4,5	22,1±3,9	<0,001
Dohányzók	15 (8,3%)	10 (5,8%)	NS
Primiparák	130 (72,2%)	96 (55,8%)	<0,05
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	168±18	112±12	<0,001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	105±11	71±9	<0,001
Terhességi kor szüléskor (hét)	34,5±3,9	39,4±1,4	<0,001
Újszülött születési súlya (gramm)	2081±944	3444±448	<0,001
Intrauterin növekedési retardáció	61 (33,9%)	0 (0%)	<0,001

Az adatokat folytonos változók esetén átlag±szórásként, míg diszkrét változók esetén abszolút számként (százalék) adtam meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index

41. táblázat

A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G) és Thr399Ile (C1196T) polimorfizmusának genotípus és allél frekvenciái egészséges terhes nőkben és praeclampsias terhesekben

	Praeclampsias terhesek	Egészséges terhes nők
Asp299Gly genotípus frekvenciák		
Genotípus	n=180 (100%)	n=172 (100%)
AA	165 (91,7%)	150 (87,2%)
AG	15 (8,3%)	21 (12,2%)
GG	0 (0%)	1 (0,6%)
$\chi^2=2,53$, df=2, p>0,05		
Asp299Gly allél frekvenciák		
A	345 (95,8 %)	321 (93,3 %)
G	15 (4,2 %)	23 (6,7 %)
$\chi^2=2,19$, df=1, p>0,05		

	Praeclampsias terhesek	Egészséges terhes nők
Thr399Ile genotípus frekvenciák		
Genotípus	n=180 (100%)	n=172 (100%)
CC	165 (91,7%)	149 (86,6%)
CT	15 (8,3%)	22 (12,8%)
TT	0 (0%)	1 (0,6%)
$\chi^2=2,96$, df=2, p>0,05		
Thr399Ile allél frekvenciák		
C	345 (95,8 %)	320 (93,0 %)
T	15 (4,2 %)	24 (7,0 %)
$\chi^2=2,66$, df=1, p>0,05		

A Toll-like receptor 4 gén két vizsgált polimorfizmusa között szoros kapcsoltságot találtunk. Ahogy a 42. táblázat szemlélteti, a két polimorfizmus által alkotott haplotípusok becsült frekvenciáiban nem volt szignifikáns különbség a praeclampsziás és egészséges terhes csoport között. A homozigóta és heterozigóta G-T haplotípus hordozók kockázata praeclampsziára nem különbözött szignifikánsan a G-T haplotípust nem hordozókéétól, még azt követően sem, hogy többszörös logisztikus regresszióval az életkorra, terhesség előtti BMI-re, primiparitásra és dohányzásra adjusztáltunk (G-T haplotípus hordozók versus nem hordozók, OR (95% CI): 0,65 (0,32-1,31), $p=0,23$; adjusztált OR (95% CI): 0,65 (0,29-1,44), $p=0,29$).

42. táblázat

A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly (A896G) és Thr399Ile (C1196T) polimorfizmusának becsült haplotípus frekvenciái egészséges terhes nőkben és praeclampsziás terhesekben

Haplotípus	Praeclampsziás terhesek n=360 (100%)	Egészséges terhes nők n=344 (100%)
A-C	345 (95,8%)	319 (92,7%)
A-T	0 (0%)	2 (0,6%)
G-C	0 (0%)	1 (0,3%)
G-T	15 (4,2%)	22 (6,4%)
$\chi^2=4,98$, df=3, $p>0,05$		

n: a vizsgált kromoszómák száma

A praeclampsziás csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusának genotípus, allél és haplotípus frekvenciájában az enyhe és súlyos praeclampsziás esetek, a korai és késői kezdetű praeclampszia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között.

Az *in silico* analízisünk eredménye szerint a Thr399Ile polimorfizmus (rs4986791) a Toll-like receptor 4 gén nagyfokban informatív tag SNP-je. A CEU populációban (Utah állambeli lakosok észak- és nyugat-európai származással) tökéletes kapcsoltságot mutatott ($D'=1$ és $r^2=1$) a Toll-like receptor 4 gén következő öt egy pontos nukleotid variációjával: rs10818073 (intronbeli), rs7864330 (intronbeli), rs12344353 (intronbeli), rs4986790 (misszensz, Asp299Gly) és rs10983756 (intronbeli).

5. Megbeszélés

5.1. 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 vérvételkori 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.

A VEGF-A és a PlGF fontos szerepet játszik az endothelsejtek integritásának biztosításában, különösen a fenesztrált endothelium esetében (96). Vizsgálatunkban szignifikáns korrelációkat találtunk az anti-angiogén sFlt-1, illetve az angiogén PlGF szérumszintek és az endothel-aktiváció (von Willebrand faktor antigén), illetve az endothel-sérülés (fibronektin) markerei között mind szövődménymentes terhességben, mind praeeclampsziában. Az sFlt-1 szérumszintje erős pozitív korrelációt mutatott mind egészséges, mind praeeclampsziás terhesek vesefunkciós paramétereivel, míg a szérumban PlGF koncentráció inverz korrelációban állt a vesefunkciós paraméterekkel praeeclampsziában. Továbbá a vérnyomás értékek és a praeeclampszia súlyossága is kapcsolatot mutatott a szérumban sFlt-1 szintekkel. 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 praeeclampszia patogenezisében.

Élettani terhességben az sFlt-1 fő forrása a méhlepény, ami magyarázza a terhesek perifériás keringésében megfigyelt lényegesen magasabb sFlt-1 koncentrációt nem terhes nőkkel összehasonlítva (162). Praeeclampsziában a keringő sFlt-1 szint tovább emelkedik ezen anti-angiogén fehérjének a hipoxiás placentából történő felszabadulása következtében (114). 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

szérum sFlt-1 koncentrációért. Ezt a legújabb irodalmi adatok is megerősítették, amelyek szerint a syncytiotrophoblast mikrovezikulumok sFlt-1-et is expresszálnak (91-93).

Intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsiaiban szignifikánsan alacsonyabb szérum PlGF koncentrációt találtunk, mint amikor IUGR nem volt megfigyelhető. Ezen eseteket a méhlepény vérkeringésének jelentős beszűkülése jellemzi (163). Tekintettel arra, hogy a tenyésztett trophoblastsejtek hipoxiás körülmények között kevesebb PlGF-et expresszálnak és szekretálnak, az alacsonyabb szérum PlGF koncentráció a kifejezett lepenyi ischaemia következménye lehet magzati növekedési retardációval szövődött praeclampsiaiban (164, 165). Ugyanakkor a csökkent lepenyi PlGF szint szerepet játszhat a lepenyi diszfunkció kialakulásában is, ezáltal hozzájárulva a magzati növekedési retardáció létrejöttéhez (166). A lepenyi tényezők különösen fontosak a korai praeclampsia patogenezisében, ami vizsgálatunkban szintén szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációval társult. A PlGF normális lepenyi funkcióban betöltött fontosságát a PlGF szérumszintje és az újszülöttek születési súlya között egészséges terhesekben megfigyelt szignifikáns pozitív korreláció is alátámasztja. A praeclampsias terhesek szérum PlGF koncentrációja a terhesség időtartamával (a szüléskori terhességi korról) párhuzamosan emelkedett, jelezve a PlGF meghatározás prognosztikai jelentőségét praeclampsiaiban.

Korábbi vizsgálatokkal összhangban, tanulmányunkban is jobb diagnosztikus pontosságúnak bizonyult praeclampsiaiban az sFlt-1/PlGF hányados, mint a szérum sFlt-1 és PlGF szint önmagában (167, 168). Ahogy a szenzitivitási és specificitási értékek is mutatják, nem minden magas sFlt-1 és alacsony PlGF szérumszinttel rendelkező terhes nőben fejlődik ki praeclampsia, és a kórkép alacsony sFlt-1 és magas PlGF szérumszint mellett is kialakulhat. A praeclampsia multifaktoriális kórereditű megbetegedés, és az sFlt-1 és PlGF mellett számos más angiogén és nem angiogén faktor is szerepet játszik a kórkép patogenezisében. Megjegyzem, hogy a praeclampsias terhesek többségében későn (≥ 34 . hét) és enyhe formában jelentkezett a kórkép, mely magyarázhatja a megfigyelt szenzitivitási és specificitási értékeket.

5.2. A „betegággy mellett” PlGF gyorsesztt diagnosztikus hatékonyságának és prognosztikai értékének vizsgálata magas vérnyomással szövődött terhességekben

A betegággy mellett is alkalmazható PlGF gyorsesztt hatékonynak bizonyult hipertóniával szövődött terhességekben a 35. terhességi hét előtt mind a diagnózisban, mind a terhesség várható időtartamának előrejelzésében. A tesztt a jövőben elősegítheti klinikai döntéseink meghozatalát a hipertónias terhes nők kezelésében.

Bár a keringésben található sFlt-1, illetve PlGF szintjét és hányadosukat kiterjedt módon vizsgálták praeclampsziában, kevés irodalmi adat állt rendelkezésre a terhességi hipertóniák egyéb formáiban (169-171). 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 vérvételkor 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. Másrésről 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 gyorseszt elősegíti majd klinikai döntéseink meghozatalát hipertóniás terhesekben.

5.3. A PlGF gyorseszt és a magzati flowmetria összehasonlítása a kedvezőtlen magzati kimenetel azonosításában magas vérnyomással szövődött terhességekben

Eredményeink szerint a PlGF gyorseszt hatékonyabb hipertóniával szövődött terhességekben a kedvezőtlen magzati kimenetel (37. terhességi hét előtti szülés szükségessége, intrauterin növekedési retardáció) azonosításában, mint a magzati flowmetria.

A PlGF gyorseszt 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 gyorseszt 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 gyorseszt 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. Másrésről a normális flowmetriás lelet és PlGF teszteredmény együttes előfordulása azonosítja azt a hipertóniás terhes populációt, akiknél a kedvezőtlen magzati kimenetel kockázata alacsony.

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

A keringésben található ADAMTS13 metalloproteáz az ultra-nagy von Willebrand faktor multimereket hasítja kisebb, kevésbé aktív fragmentumokra (172). Az ADAMTS13 fehérjét elsősorban a máj csillagsejtjei termelik, de expresszióját kimutatták más sejtekben is, beleértve az endothelsejteket és a trombocitákat (173-175). Aktivitása számos kórképben alacsony, amelyeket protrombotikus állapot, szervkárosodás, illetve akut fázis reakció jellemez (176-181). A súlyosan csökkent ADAMTS13 aktivitás (<5%) specifikus trombotikus trombocitopéniás purpurára (182, 183).

Eredményeink azt mutatják, hogy a magas von Willebrand faktor antigén szint ellenére a vérplazma ADAMTS13 aktivitása nem csökken praeclampszában. Továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezete is intakt praeclampszában. Korábbi tanulmányokban összefüggést mutattak ki az emelkedett plazma von Willebrand faktor antigén szint és

csökkent ADAMTS13 aktivitás között több kórképben is (177-179). 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 (180).

HELLP-szindrómában emelkedett plazma von Willebrand faktor antigén szint mellett csökkent ADAMTS13 aktivitást figyeltek meg korábbi vizsgálatokban (184, 185). 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.

5.5. A plazma oszteopontin szintjének meghatározása praeclampsziában

Az oszteopontint először a csontból izolálták, de kifejeződik az endometriumban, a villosus és extravillosus trophoblastsejtekben, az endothelsejtekben, a vaszkuláris simaizomsejtekben, az immunrendszer sejtjeiben és más extraosszeális sejtekben és szövetekben is (186-189). Az oszteopontin számos élettani és kóros folyamatban szerepet játszik, többek között a decidualizációban, implantációban, placentációban, krónikus gyulladásban, atherosclerosisban és az autoimmun kórképek kialakulásában (190-193). A praeclampsia és az atherosclerosis több rizikófaktorra azonos (obezitás, hyperlipidaemia, inzulinrezisztencia) és hasonló kórélettani mechanizmusok (oxidatív stressz, gyulladás, endothelsejt károsodás) vesznek részt a patogenezisükben. Tanulmányunkban szignifikáns pozitív lineáris összefüggést találtunk praeclampsziás terhesekben a plazma oszteopontin és fibronektin 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 fibronektin koncentráció az endothel-sérülés elfogadott markere praeclampsziában, és összefüggést mutat a kórkép súlyosságával és szövődményeivel (194, 195). A magas fibronektin szinttel rendelkező praeclampsziás terhesek között vizsgálatunkban is gyakrabban fordult elő a kórkép súlyos formája. A plazma oszteopontin és fibronektin 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 (196). 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.

5.6. 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. Eredményeink szerint 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 adhézíós molekulák megnövekedett mennyisége az anyai keringésben fontos szerepet játszik a praeclampszia anyai tünetegyüttesére jellemző kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakcióban és generalizált endothel-diszfunkcióban.

Saito és munkatársai közölték először, hogy praeclampsziában a Th1-típusú immunitás túlsúlya figyelhető meg (131, 132). 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 sejtadhézíós molekulák szintje megemelkedik, egy pro-inflammatorikus szisztémás környezetet létrehozva. A praeclampsziában megfigyelt emelkedett keringő IL-1 receptor antagonista koncentráció a pro-inflammatorikus IL-1 α és β megnövekedett aktivitását tükrözi, amelyek féléletideje a keringésben igen rövid, így szérumszintjeik vizsgálata nehéz (197). Az immunregulátoros IL-10 praeclampsziás terheseinkben megnövekedett szérumszintje összhangban van korábbi megfigyelésekkel és kompenzációs jelenségnek tekinthető (198).

A szérum MCP-1 és ICAM-1 koncentráció praeclampsziás terheseinkben pozitív korrelációt mutatott a szérum CRP és malondialdehid szintekkel, ami arra utal, hogy a leukociták kemotaxisa és endothelsejtekhez történő adhézíója fontos eleme a

praeclampsziában 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 praeclampsziás 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 szövődménymentes terhességben, mind praeclampsziában. A szérumban az 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 praeclampsziás terhesekben is. Az IP-10 (CXCL10) pro-inflammatorikus és anti-angiogén tulajdonságokkal is rendelkezik, és praeclampsziában ezen kemokint tartják a gyulladás és angiogén egyensúlyzavar közötti egyik lehetséges kapcsolatnak (199).

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

5.7. A szérumban a leptin koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkel, kemokinekkel, adhéziónak molekulákkal és angiogén faktorokkal praeclampsziában

A leptin egy 16 kDa molekulatömegű peptid hormon. Elsődleges forrása a zsírszövet, de más szervek is képesek a termelésére, beleértve a méhlepényt is (200). A leptin metabolikus hatásai mellett részt vesz a reprodukív folyamatokban (implantáció, embrionális fejlődés), valamint a természetes és adaptív immunválasz és a gyulladásos folyamatok szabályozásában (201, 202). Keringésben mért szintje szignifikánsan magasabb terhes, mint nem terhes nőkben, és tovább emelkedik praeclampsziában (86, 203).

Megfigyeléseink szerint az emelkedett szérumban a leptin koncentráció szignifikáns összefüggést mutat az interferon- γ -indukált protein-10 (IP-10) szérumszintjével

praeclampsziában. Továbbá az emelkedett szérumszintű leptin koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampsia rizikóját.

A leptin szérumszintje szignifikáns korrelációt mutatott az IP-10 szérumszintjével mind szövődménymentes terhességben, mind praeclampsziában. Ez egybevág azzal a korábbi *in vitro* megfigyeléssel, hogy a leptin szelektív módon képes indukálni az IP-10 expresszióját és szekrécióját humán monocitákban (204). 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 (199). Az IP-10 mutatta a legszorosabb összefüggést az endothel-diszfunkció markereivel, valamint a vese- és májfunkciós paraméterekkel egészséges és praeclampsziás terhesekben 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 szérumszintű sFlt-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 szérumszintű leptin koncentrációnak és sFlt-1/PlGF hányadosnak szinergikus hatása van a praeclampsia rizikójában, ahogy azt a kombinációjuk lényegesen nagyobb esélyhányadosa mutatta.

5.8. A 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás terhesek klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel

A hő sokkfehérjék elsősorban intracelluláris fehérjeként ismertek és a sejten belül dajkafehérje és citoprotektív funkciót látnak el (205). A Hsp70 megtalálható egészséges emberek perifériás vérében is (206). Szövődménymentes terhességben a keringésben található Hsp70 koncentrációját szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk, mint nem terhes nőkben, és pozitív korrelációt mutatott a terhességi kórral, valamint negatív korrelációt az anyai életkorral (207). Korábban kimutattuk, hogy a Hsp70 szérumszintje szignifikánsan emelkedett praeclampsziában szövődménymentes terhességgel összehasonlítva (208). Továbbá a Hsp70 szérumszintje szignifikánsan magasabb volt HELLP-szindrómás terhesekben, mint súlyos praeclampsziás terhesekben HELLP-szindróma jelenléte nélkül (209). Korábbi megfigyeléseink szerint az emelkedett szérumszintű Hsp70 koncentráció HELLP-szindrómában a

szöveti károsodást (hemolízist és hepatocelluláris nekrozist), illetve a kórkép súlyosságát tükrözi (210). Jelen tanulmányunkban szignifikáns összefüggést találtunk praeclampsziában a Hsp70 emelkedett szérumszintje és a szisztémás gyulladás, az oxidatív stressz és a hepatocelluláris károsodás markerei között.

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. Ezzel összhangban korábban már kimutatták, hogy a gyulladásos citokinek képesek indukálni a Hsp70 kibocsátását az extracelluláris térbe exosomák belsejében (211). Továbbá az oxidatív stresszt összefüggésbe hozták a keringésben található Hsp70 szintjének emelkedésével fizikai aktivitást (tornagyakorlatokat) követően, és a C-vitamin, valamint a γ -tokoferol meggátolta ezt a választ (212). Az antioxidáns folsav pedig szignifikánsan csökkentette a Hsp70 szérumszintjét 2-es típusú diabetesben szenvedő betegekben (213).

Az intracelluláris hősokkfehérjék nemcsak aktív módon képesek kijutni az extracelluláris térbe, hanem passzív módon is a széteső, nekrotikus sejtekből a plazmamembrán destrukcióját követően (214). A Hsp70 szérumszintje és a májfunkciós paraméterek között praeclampsziás terhesekben megfigyelt szignifikáns korreláció arra enged következtetni, hogy a Hsp70 felszabadulása a nekrotikus májsejtekből hozzájárulhat a szérum Hsp70 koncentráció emelkedéséhez praeclampsziában. Munkacsoportunk korábban már mutatott ki összefüggést a májsejt károsodás és az emelkedett Hsp70 szérumszint között krónikus szívelégtelenségben és HELLP-szindrómában is (210, 215).

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 (216). 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 (217-220).

5.9. A szérumban Hsp70 (HSPA1A) koncentráció összefüggése a keringésben található citokinekkal, kemokinekkal, adhézión molekulákkal és angiogén faktorokkal praeeclampsziában

Megfigyeléseink szerint az emelkedett szérumban Hsp70 koncentráció szignifikáns összefüggésben áll az IL-12p40, az MCP-1, az ICAM-1 és a VCAM-1 szérumszintjével praeeclampsziában. Továbbá az emelkedett szérumban Hsp70 koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeeclampsia kockázatát.

Bár a Hsp70 a sejten belül anti-inflammatorikus tulajdonsággal rendelkezik, az extracelluláris Hsp70 a természetes és adaptív immunrendszer aktiválásával képes egy pro-inflammatorikus immunválaszt létrehozni (216). Az extracelluláris Hsp70 az antigén-prezentáló sejtek felszínén található receptorokhoz (CD14, CD36, CD40, CD91, LOX-1, Toll-like receptor 2 és 4) kötődik, és stimulálja azok pro-inflammatorikus citokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6 és IL-12), kemokin (az MCP-1-t is beleértve) és nitrogén-monoxid termelését, valamint felszínükön kostimulátoros molekulák expresszióját (221-226). Az 5.8. pontban ismertettem, hogy a Hsp70 emelkedett szérumszintje és a szisztémás gyulladás markerének tekintett szérumban CRP koncentráció között szignifikáns korrelációt találtunk praeeclampsziában. A praeeclampsziás terheseinkben megfigyelt kapcsolat az emelkedett szérumban Hsp70 és az IL-12p40, MCP-1, ICAM-1, valamint VCAM-1 szintek között megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a keringésben található Hsp70-nek szerepe lehet a praeeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásában.

Ahogy az 5.6. pontban tárgyaltam, praeeclampsziás 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 praeeclampsziában. Tekintettel arra, hogy az extracelluláris Hsp70 képes kötődni az endothelsejtekhez, valamint, hogy a Hsp70 kapcsolatot mutat az endothel-aktivációval a méhlepény vaszkuláris megbetegedéseiben, az is lehetséges, hogy praeeclampsziában a keringésben található Hsp70 közvetlen módon is szerepet játszik az endothelsejtek aktivációjában, illetve sérülésében (227, 228). Praeeclampsziás terheseinkben a szérumban Hsp70 és ICAM-1, valamint VCAM-1 koncentrációk között megfigyelt szignifikáns korreláció alátámaszthatja ezt a feltételezésünket. Az ICAM-1 és a VCAM-1 ugyanis alacsony koncentrációban jelen van az endothelsejtek membránjában, és az endothelsejtek aktiválódása esetén koncentrációja jelentősen megemelkedik.

Praeclampsziában az anyai keringésben megnövekedett mennyiségben található Hsp70 forrása nem tisztázott teljes mértékben. Az 5.8. pontban ismertettem, hogy eredményeink szerint a májsejt károsodás lehet az egyik lehetséges oka ennek. Azonban májsejt károsodás csak a praeclampsia súlyos eseteiben fordul elő. Jól ismert, hogy a fehérvérsejtek kifejezetten aktiválódnak praeclampsziában, és képesek Hsp70 és gyulladásos molekulák kibocsátására is (229). Praeclampsziás terhesekben 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. Ezzel összhangban praeclampsziás terhesek teljes vérében a Hsp70 mRNS expressziója jóval kifejezettebb volt, mint normotóniás terhesekében (230). 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 szérum sFlt-1 és csökkent PlGF koncentráció nem mutatott összefüggést a Hsp70 szérumszintjével praeclampsziás terhesekben, jelezve, hogy az angiogén egyensúlyzavar és a keringésben található Hsp70 koncentrációjának megváltozása egymástól független folyamatok a praeclampsia patogenezisében. Eredményeink szerint az emelkedett szérum Hsp70 koncentrációnak és sFlt-1/PlGF hányadosnak additív hatása van a praeclampsia kockázatában, ahogy azt a kombinációjuk lényegesen nagyobb esélyhányadosa mutatta.

5.10. A hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintjének meghatározása praeclampsziában

Korábban már leírták, hogy az anti-humán Hsp60, anti-mycobacterialis Hsp65 és anti-humán Hsp70 antitestek megtalálhatók egészséges emberek perifériás vérében (206, 231). Eredményeink szerint a humán Hsp60, mycobacterialis Hsp65 és humán Hsp70 elleni antitestek jelen vannak egészséges terhes nők perifériás vérében is. 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. A természetes autoantitestek a patogén behatolók elleni első vonalbeli védekezésben fontosak (232). Ezzel összhangban az anti-Hsp70 antitest kimutatható volt középső trimeszteri magzatvízmintákban, és koncentrációja korrelált az antimikrobiális immunmediátorok magzatvízben mért

menyiségével (233). Vizsgálati csoportjainkban az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 szérumszintje közötti szoros korreláció keresztreakáló epitópok jelenlétére utal.

A mikrobiális és emlős hősokkfehérjék ubikviter jellegük és nagyfokú szekvencia homológiájuk miatt molekuláris mimikri révén, mint ártalmas autoantigének kapcsolatot képeznek a fertőzés és az autoimmunitás között (234). Az atherosclerosis kockázati tényezőinek többsége (fertőzés, gyulladás, hemodinamikus stressz, oxidatív stressz) képes indukálni a hősokkfehérjék expresszióját az érfalban, illetve azok kibocsátását onnan. A keresztreakáló hősokkfehérje elleni antitestek és T sejtek károsítják a hősokkfehérjéket fokozottan expresszáló szöveteket az érfalban, és ezen keresztül hozzájárulnak az atherosclerosis kialakulásához (235). Kimutatták, hogy a humán Hsp60 elleni immunválasz, ami egy korábbi fertőzés következménye lehet, kedvezőtlenül befolyásolja a terhesség kimenetelét (236, 237). A Hsp60 és Hsp70 elleni antitesteket a koraszüléssel is kapcsolatba hozták (238).

A gyulladás, hemodinamikus és oxidatív stressz a praeclampsia patogenezisében is szerepet játszik. Megfigyeléseink szerint az emelkedett szérumszintű Hsp70 ellenére a hősokkfehérjék elleni antitestek szérumszintje nem változik praeclampszában. 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 (239-241). A fertőzés és a hősokkfehérjék fokozott expressziója, illetve extracelluláris térbe történő kibocsátása mellett egyéb, például genetikai tényezők is befolyásolhatják ezen autoantitestek képződését (242, 243). 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. Érdekes, hogy a humán Hsp60 elleni sejtközvetített autoimmun reakciót kapcsolatba hozták korábban a spontán vetéléssel (244).

5.11. A komplementrendszer vizsgálata praeclampszában

A komplementrendszernek a természetes immunrendszer részeként alapvető szerepe van a szervezet mikrobiális patogének, apoptotikus és nekrotikus sejtek elleni védelmében. Mind excesszív aktiválódása, mind deficienciája különböző kórképek, többek között kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához vezethet (245). A komplementrendszer három úton aktiválódhat. A klasszikus útvonalat elsősorban immunkomplexek, a C-reaktív protein és

a kettősszálú DNS, a lektin útvonalat mikroorganizmusok felszínén található szénhidrát csoportok, míg az alternatív útvonalat idegen (bakteriális vagy virális) felszínek aktiválják (246). A komplementrendszer aktiválódása a target C3b/iC3b-vel, illetve C4b-vel történő opszonizációjához és azon keresztül fagocitózisához, pro-inflammatorikus anafilatoxinok (C3a, C4a, C5a) kibocsátásához, és a lítikus terminális komplex (membrane attack complex) képződéséhez vezet. A szervezet egészséges sejtjeinek védelmében a komplementrendszer aktiválódását szolubilis és membránhoz kötött szabályozó fehérjék kontrollálják (247).

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) praeclampsias terhesek szisztémás keringésében. Eredményeink szerint a C1rC1sC1-INH és C3bBbP aktivációs komplexek plazmaszintje szignifikánsan emelkedett praeclampsiaiban, 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 praeclampsias terhesekben.

A komplementrendszer klasszikus úton történő aktiválódását számos korábbi megfigyelés alátámasztja. A keringő immunkomplexek mennyisége magasabb praeclampsiaiban, ami az azok képződése és eltávolítása közötti egyensúly felborulására utal (248, 249). A C-reaktív protein szérumszintje is szignifikánsan magasabb praeclampsiaiban. A klasszikus útvonalat a kettősszálú DNS is képes aktiválni (250). Anyai és magzati eredetű szabad DNS nagyobb mennyiségben mutatható ki praeclampsias terhesek keringésében (251, 252). Továbbá a Hsp70 is hatásos aktivátora a komplementrendszer klasszikus útjának (253). Az apoptotikus és nekrotikus sejtek mind a klasszikus, mind az alternatív útvonalat tudják aktiválni (254-256). A trophoblast apoptózis és nekrozis az ischaemiás és oxidatív stressznek kitett praeclampsias méhlepényben is megfigyelhető. Az alternatív útvonal szerepét bizonyítja az a korábbi megfigyelés is, hogy a Bb aktivációs fragmentum terhesség első felében észlelt emelkedett plazmaszintje összefüggést mutat a praeclampsia későbbi kialakulásával (257).

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 praeclampsiaiban, ezek azonban ellentétes eredményekre jutottak (258-262). 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 praeclampsiaiban.

Érdekes megfigyelésünk, hogy az intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsiaiban a plazma SC5b9 szintje szignifikánsan magasabb. Ezen eseteket a méhlepény vérkeringésének jelentős beszűkülése jellemzi, így a terminális út excesszív aktiválódása az apoptotikus és nekrotikus trophoblast eredetű törmeléknek a kifejezetten ischaemiás méhlepényből az anyai keringésbe történő fokozott kibocsátását tükrözheti. Másrészt a komplementrendszer aktiválódása a terminális komplex fokozott képződésével az IUGR kialakulásához is hozzájárulhat. Komplement depozitumok intrauterin növekedési retardációval társult akut atherosclerosisban is megfigyelhetők (263). A terminális komplex lepenyi lokalizációja szoros kapcsolatot mutatott a fibrin depozitumokéval a boholysérülés helyein, különösen intrauterin növekedési retardációban és praeclampsiaiban. A terminális komplex kötődése fokozta a hipoxiának kitett cytotrophoblast sejtek apoptózist (264). Továbbá a spontán vetélés és IUGR egér modelljében a komplement aktiváció a lepeny normális fejlődéséhez szükséges angiogén faktorok egyensúlyának zavarához vezetett (265).

A komplementrendszer szisztémás aktiválódásának a lepenyi eredetű gyulladásos stimulusok és a praeclampsia anyai tünetegyüttese között összekötő szerepe is lehet. A praeclampsia számos klinikai tünete és patogenetikai folyamata magyarázható a komplementrendszer aktiválódásával. Az anafilatoxinok (C3a, C4a, C5a) fokozzák a vaszkuláris permeabilitást és simaizomsejt kontrakciót, valamint a leukociták kemotaxisát okozzák (247, 266). A C5a és a terminális komplex képes aktiválni a monocitákat és a granulocitákat gyulladásos mediátorok fokozott képződéséhez vezetve (76, 267-270). Továbbá a komplement aktivációt az endothelsejt károsodással is kapcsolatba hozták trombotikus mikroangiopátiában (271).

A fikolinok a természetes immunrendszer mintázatfelismerő molekulái, melyek a mikrobiális patogének, apoptotikus és nekrotikus sejtek felszínén található szénhidrátokhoz kötődnek. Két módon hatnak: aktiválják a komplementrendszer lektin útját, valamint egy primitív opszonofagocitózis révén (272). 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 praeclampsiaiban. A fikolinok direkt opszoninként hatva képesek elősegíteni a mikroorganizmusok, apoptotikus és nekrotikus sejtek eltávolítását fagocitózis útján (273-275). Korábban leírták, hogy a fikolin-2 és a fikolin-3 az apoptotikus syncytiotrophoblast sejtekhez kötődik a praeclampsias méhlepényben, és azt feltételezték,

hogy ez vezet a keringő fikolinok csökkent koncentrációjához (259). 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 (87, 91-93). 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. Bár a fikolin-3 plazmaszintje is csökkent praeclampsziában, az nem mutatott összefüggést a szabad magzati DNS és az sFlt-1 keringésben mért koncentrációjával egészséges és praeclampsziás terhesekben. Ezt magyarázhatja a fikolin-2 és a fikolin-3 eltérő ligand specificitása, tudniillik a fikolin-2 képes a DNS-hez is kötődni (274). Lehetséges, hogy az alacsony fikolin-3 plazmaszint praeclampsziában tényleg csak egyszerűen az apoptotikus placentában történő szekvesztráció következménye (259).

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. Ezt alátámaszthatja, hogy IgA nefropátiában a fikolin-2 glomeruláris depozíciója a komplementrendszer lektin útjának lokális aktivációjával összefüggést mutatott a vesekárosodás súlyosságával (276).

5.12. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris VEGF-A expressziójának vizsgálata praeeclampsziában

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 praeeclampsziás terhesekben, ami arra utal, hogy a keringő T és NK sejtek kevesebb VEGF-A-t termelnek praeeclampsziában.

Kísérletes és klinikai adatok mutatják, hogy a VEGF-A csökkent expressziója vagy neutralizációja szerepet játszhat a praeeclampsia patogenezisében. A VEGF-A az endothelsejtek nitrogén-monoxid és prosztaciklin termelését serkentve vazodilatációt okoz (111). A VEGF-A különösen fontos a fenesztrált endothelium integritásának biztosításában, ami a praeeclampsia által elsődlegesen érintett szervekben (vese, máj, agy) található (96). A VEGF-A podocita-specifikus deléciójára heterozigóta egerekben a VEGF-A expresszió 50%-os csökkenése proteinuria és glomeruláris endotheliosis kialakulásához vezetett, hasonlóan az anti-VEGF-A antitestek adásához (277-279). Rákbetegekben VEGF-A inhibitorok alkalmazása hipertónia, proteinuria és reverzibilis posterior leukoencephalopathia szindróma kialakulásával járt (280, 281).

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a keringő angiogén és anti-angiogén faktorok közötti egyensúly felborulása fontos tényező a praeeclampsia kialakulásában (97, 100, 114). A perifériás vérben található T és NK sejtek csökkent VEGF-A termelése hozzájárulhat az angiogén egyensúlyzavar és a következményes generalizált endothelsejt diszfunkció létrejöttéhez praeeclampsziában. A keringő T és NK sejtek aktiválódnak praeeclampsziában és nagy mennyiségű pro-inflammatorikus citokint termelnek (23, 134). Feltételezzük, hogy a perifériás vér limfocitáinak csökkent VEGF-A expressziója az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció részjelensége praeeclampsziában. Lehetséges, hogy az aktiváció hatására a keringő T és NK sejtek megváltoztatják fenotípusukat, és VEGF-A helyett inkább gyulladásos citokineket expresszálnak. A limfociták VEGF-A expresszióját azonban genetikai tényezők is befolyásolhatják. Korábban munkacsoportunk és mások is leírtak összefüggést a VEGF-A gén funkcionális polimorfizmusai és a praeeclampsia, illetve a HELLP-szindróma között (282-286).

5.13. A perifériás vérben található limfociták intracelluláris galektin-1 expressziójának vizsgálata praeclampsziában

A galektin-1 a filogenetikailag konzervált β -galaktozid-kötő emlős lektinek családjába tartozó fehérje. Az immunrendszerben az aktivált T sejtekben, B sejtekben, NK sejtekben és makrofágokban fejeződik ki (287-290). Immunregulátoros hatását több különböző mechanizmus útján fejt ki. A galektin-1 gátolja a T sejtek proliferációját, és az aktivált citotoxikus T sejtek, Th1 és Th17 sejtek apoptózisát idézi elő (287, 291, 292). Továbbá elősegíti a fehérvérsejtek fagocitózist és gátolja a T sejt aktivációt (293, 294).

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. Praeclampsziában a galektin-1-pozitív T (helper és citotoxikus) és NK sejtek aránya a perifériás vérben szignifikánsan csökken szövődmenymentes terhességgel összehasonlítva, ami arra utal, hogy a keringő T és NK sejtek kevesebb galektin-1 fehérjét termelnek praeclampsziában.

Irodalmi adatok szerint a galektin-1 kulcsszerepet játszik az anya és szemiallogén magzata közötti immuntolerancia kialakításában. Galektin-1-deficiens egerekben rekombináns galektin-1 adása meggátolta a vetélést és helyreállította az immuntoleranciát több mechanizmus révén: visszaállította a Th2-típusú immunitás túlsúlyát az anya és magzat közötti határfelületen, továbbá előmozdította a tolerogén uterinális dendritikus sejtek képződését, ami az IL-10-et termelő regulátoros T sejtek expanziójához vezetett (295). A galektin-1 és a progeszteron szinergetikus hatását mutatták ki a terhesség fenntartásában (295). Mindemellett a deciduális NK sejtek galektin-1 termelése a T sejtek apoptózist idézte elő az anya és magzat közötti határfelületen (296). 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 szövődmenymentes terhességben.

Praeclampsziában 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 praeclampsziában. 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 apoptózisát, a Th2 sejtek védettek a galektin-1-gyel szemben a sejtfelszíni glikoproteinjeik különböző szialilációja miatt. Ezzel összhangban a galektin-1-deficiens egerekben kifejezettebb Th1- és Th17-típusú immunválaszt figyeltek meg (292). 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 (132, 297).

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

A granulizin egy citolítikus és pro-inflammatorikus molekula, amit az aktivált citotoxikus T sejtek és NK sejtek termelnek (298). Szérumszintje szoros összefüggést mutatott a citotoxikus T sejtek és NK sejtek aktivitásával, és a celluláris immunitás új szérum markerének tekintik (299). A granulizin szérumszintje szignifikánsan magasabb praeclampsziában, és korrelál az artériás középnyomással (300).

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 (299, 301). 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 szérum granulizin koncentrációjának korábban leírt emelkedését praeclampsziában (300). Az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció részeként a citotoxikus T sejtek aktiválódnak és fokozott válaszkészséget mutatnak az apai antigénekre praeclampsziában (132, 302, 303). 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 (304). 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. Ezt támaszthatja alá az is, hogy a praeclampsziás terhesek szérumban granulizin koncentrációja korrelált a perifériás vérben található Th1 sejtek gyakoriságával, valamint a Th1 és Th2 sejtek arányával (300).

5.15. 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.

A Th17 sejtek IL-17A-t, IL-17F-t, IL-21-et, IL-22-t, és más pro-inflammatorikus citokineket termelnek. Ezek a sejtek alapvetőek a szervezet mikrobiális patogének, elsősorban az extracelluláris baktériumok, gombák, bizonyos protozoonok és vírusok elleni védelmében (305). A Th17 sejtek azonban számos autoimmun és gyulladásos betegség (rheumatoid arthritis, sclerosis multiplex, gyulladásos bélbetegségek), valamint az allograft kilökődés patogenezisében is szerepet játszanak (306, 307). 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 (297). 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 Th17 és regulátoros T sejtek differenciálódását a RORc (ROR γ t) és FoxP3 transzkripciós faktorok szabályozzák. Jianjun és munkatársai kimutatták, hogy a RORc mRNS expressziója magasabb, míg a FoxP3-é alacsonyabb a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben és a deciduában praeclampsziás terhesekben, ami arra utal, hogy e transzkripciós faktorok egyensúlyának zavara szerepet játszhat a Th17-típusú immunitás túlsúlyában praeclampsziában (308). A Th17 sejtek és a regulátoros T sejtek naiv T sejtekből történő differenciálódásához TGF- β szükséges. A Th17 sejtek terminális differenciálódása pro-inflammatorikus citokinek jelenlétét igényli (309). A pro-inflammatorikus citokinek és a szolubilis endoglin (a TGF- β endogén inhibitora) emelkedett szérumszintje magyarázhatja –

legalábbis részben – a Th17/regulátoros T sejt arány megnövekedését praeclampsziában (109). Az is lehetséges, hogy a Th17/regulátoros T sejt arány emelkedéséért a regulátoros T sejtek Th17 sejtekké történő átalakulása felelős praeclampsziában (310).

A CD4 sejtek mellett a CD8 és NK sejtek is képesek IL-17A termelésére (311, 312). 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 (313).

Tanulmányunkban a perifériás vérben található Th1 és Th2 sejtek prevalenciáját sejtfelszíni kemokin receptor markerek segítségével vizsgáltuk áramlási citometriával. A CXCR3 markert a Th1, a CCR4 markert a Th2 sejtek kimutatására használtuk. E 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 (307). 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.

5.16. 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 immunregulátoros hatásainak ismeretében csökkent frekvenciájuk hozzájárulhat a szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásához praeclampsziában. Számos tanulmányban figyeltek meg alacsonyabb regulátoros T sejt gyakoriságot praeclampsziás terhesek perifériás vérében, mint egészséges terhes nőkben (137-140). Továbbá a regulátoros T sejtek szuppresszív kapacitásának csökkenését is leírták praeclampsziában (141, 142). Mindazonáltal olyan közlemények is megjelentek, amelyekben

a praeclampsias és egészséges terhesek regulátoros T sejt frekvenciájában nem találtak szignifikáns különbséget (143, 144). Ezekben a vizsgálatokban a regulátoros T sejteket egy sejtfelszíni aktivációs marker, a CD25 expressziója ($CD4^+ CD25^{magas}$ sejtek), vagy az intracelluláris FoxP3 pozitivitás alapján ($CD4^+ FoxP3^+$ vagy $CD4^+ CD25^{magas} FoxP3^+$ sejtek) azonosították.

A regulátoros T sejtek differenciálódásához nélkülözhetetlen FoxP3 transzkripció 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 (314-317). Megjegyzem, hogy a két korábbi vizsgálatban, amelyekben a regulátoros T sejtek prevalenciájában nem találtak különbséget praeclampsias és egészséges terhesek között, csak CD25-öt, és nem pedig FoxP3-at alkalmaztak a regulátoros T sejtek azonosítására (143, 144). Tanulmányunkban először mutattuk ki, hogy a nem konvencionális $CD4^+ CD25^- FoxP3^+$ regulátoros T sejtek gyakorisága is csökken praeclampsiasban. 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 praeclampsias terhesek között. Ez azt mutatja, hogy a konvencionális és nem konvencionális regulátoros T sejtek gyakorisága párhuzamosan változik szövődménymentes terhességben és praeclampsiasban, és hogy mindkét alcsoport jelenléte a szisztémás keringésben egyaránt fontos a terhesség alatti immuntolerancia biztosításában.

5.17. A perifériás vérben található regulátoros T sejt-alcsoportok prevalenciájának meghatározása praeclampsiasban

A regulátoros T sejtek nem alkotnak egy homogén sejtcsoportot, hanem további alcsoportokra oszthatók. A $CD4^+ FoxP3^+$ T sejtek három fenotípusosan és funkcionálisan különböző alcsoportból állnak. A $CD4^+ FoxP3^+ CD45RA^+$ sejtek a naiv vagy nyugvó regulátoros T sejtek, míg a $CD4^+ FoxP3^{++} CD45RA^-$ sejtek a teljesen funkcionális effektor vagy aktivált regulátoros T sejtek. A $CD4^+ FoxP3^+ CD45RA^-$ sejtek citokin-termelő, nem-szuppresszív effektor (aktivált) T sejtek. A teljesen differenciált aktivált regulátoros T sejtek válaszkészsége kifejezettebb, de gyorsabban pusztulnak el, míg a nyugvó regulátoros T sejtek válaszkészsége limitált, azonban képesek proliferálni és aktivált regulátoros T sejtekké átalakulni (318). 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 praeclampszában. Ez hozzájárulhat a természetes és az adaptív immunrendszer praeclampszában észlelt aktiválódásához. Ezzel összhangban a perifériás vérben található $CD4^+$ CD25⁺ FoxP3⁺ CD45RA⁻ aktivált T sejtek gyakoriságát tanulmányunkban is magasabbnak találtuk praeclampszában, mint szövődménymentes terhességben.

A regulátoros T sejteknek egy kimerült, diszfunkcionális fenotípusát írták le krónikus hepatitis C vírus fertőzésben (319, 320). A kimerült regulátoros T sejtek CD279-et, vagyis programmed death receptor 1 (PD-1)-et expresszálnak. Azt figyelték meg, hogy a PD-1 egyik ligandja, a CD274 (PD-L1) negatívan befolyásolta a regulátoros T sejtek működését a STAT-5 foszforiláció gátlásán keresztül krónikus hepatitis C vírus fertőzésben (319). Továbbá az autoimmun megbetegedésekre hajlamosító FcRL3 gén expressziója humán regulátoros T sejteken azok diszfunkciójával és a PD-1 fokozott expressziójával társult (321). Tanulmányunkban a kimerült, funkcionálisan kevésbé aktív $CD4^+$ CD25^{magas} FoxP3⁺ CD279⁺ regulátoros T sejtek gyakoriságát magasabbnak találtuk praeclampszában, ami az effektor regulátoros T sejtek csökkent prevalenciájával együtt magyarázhatja a regulátoros T sejtek praeclampszában megfigyelt funkciózavarát (141, 142).

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. Az Ikaros családnhoz tartozó Helios transzkripciós faktort azonosították a thymicus regulátoros T sejtek markereként (322). Samstein és munkatársai szerint a regulátoros T sejtek extrathymicus differenciálódása alapvető a terhesség alatti immuntolerancia biztosításában méhlepénnyel rendelkező emlősökben (323). Hsu és munkatársai a $CD4^+$ Helios⁻ Foxp3⁺ indukált regulátoros T sejtek expanszióját figyelték meg szövődménymentes terhességben, különösen a decíduában, és ez a folyamat károsodott praeclampszában (324). Másrészt Inada és munkatársai azt közölték, hogy a decíduában található Helios⁺ effektor természetes regulátoros T sejtek gyakorisága csökken spontán vetelés esetén normális embryonalis kariotípus mellett, és arra a következtetésre jutottak, hogy ezek a sejtek fontos szerepet játszanak a terhesség fennmaradásában (325). 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.

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

Az endokannabinoidok a Δ^9 -tetrahydrokannabinollal, a marihuána legerősebb pszichotrop összetevőjével megegyező hatású, endogén termelődő lipid mediátorok. A leginkább ismert és vizsgált endokannabinoid molekula az anandamid (N-arachidonoil-etanolamin). Szintéziséért az N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz-D (NAPE-PLD), míg lebontásáért a zsírsav-amid hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH) felelős (326). Az endokannabinoidok hatásukat elsősorban a G-fehérje kapcsolt kannabinoid receptorokon (CB1 és CB2) keresztül fejtik ki több jelátviteli útvonalon keresztül, beleértve az adenilát-cikláz gátlását, mitogén-aktivált protein kinázok aktiválását és különböző ioncsatornák aktiválását vagy gátlását (327). Az endokannabinoid rendszer elemei a petefészekben, petevezetőben, méhben, embryóban és a méhlepényben is megtalálhatók, és fontos szerepet játszanak a női reprodukív folyamatokban, ideértve az oogenezist, preimplantációs embryo fejlődést, az embryo petevezetőben történő transzportját, az implantációt, decidualizációt, placentációt, valamint a terhesség fennmaradását és a szülést (327-329).

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.

CB1, CB2 és FAAH immunfestődést észleltünk a syncytiotrophoblast rétegben, a boholy mesenchymában és a deciduában normális és praeclampsziás méhlepényben is. Erős CB1 immunreakciót figyeltünk meg a boholykapillárisok endothelsejtjeiben, valamint mérsékelt reakciót azok simaizomsejtjeiben, míg CB2 és FAAH festődés nem volt detektálható ezekben a lokalizációkban. A chorionlemez amnionhámjában kevésbé intenzív CB1 immunfestődést, és foltszerű elrendeződésben pozitív CB2 és FAAH immunreakciót találtunk. Eredményeink összhangban állnak az endokannabinoid rendszer humán placentáris lokalizációját vizsgáló korábbi tanulmányokéval (330-333).

A CB1 immunreaktivitás kifejezetten erősebb volt a syncytiotrophoblast rétegben és a boholy mesenchymában praeclampsziás lepényi mintáinkban szövődménymentes terhességgel összehasonlítva. Ez egybevág korábbi megfigyelésekkel, ugyanis erős CB1 immunpozitivitást találtak spontán vetélésből nyert lepények trophoblastsejtjeiben, bár praeclampsziában nem figyeltünk meg alacsonyabb FAAH reaktivitást a syncytiotrophoblast

rétegben a spontán vetéléssel szemben (333). Ezeket az eredményeket az endokannabinoid rendszer implantációban és placentációban betöltött szerepe magyarázhatja (328, 334). A trophoblast invázió folyamatát az endokannabinoid rendszer erősen befolyásolja. Megfigyelték, hogy a CB1 mind alacsony, mind magas expressziója elégtelen trophoblast migrációs képességhez vezet (335). Feltételezésünk szerint a CB1 fokozott expressziója az elégtelen trophoblast invázió következtében a placentáció zavarához, és így a praeeclampsia kialakulásához vezethet.

Tanulmányunkban erős CB1 immunreaktivitást figyeltünk meg praeeclampsziában a deciduában is. A szintetikus kannabinoidok gátolják a humán deciduális sejtek differenciálódását és azok apoptózist váltják ki CB1 aktiváción keresztül. A kannabinoid hatásnak kitett deciduális fibroblasztok kevesebb decidualizációra specifikus markert fejeztek ki és fokozott DNS fragmentációt mutattak (336). 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 praeeclampsziát okozva.

A praeeclampsziás 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 vérrellátását (337). Az anandamid vazorelaxáns hatását különböző mechanizmusok útján fejt ki, fokozza például az indukálható nitrogén-monoxid szintáz expresszióját és aktivitását az endothelsejtekben (338). Az agyi keringésben a CB1 közvetlen vazodilatátor hatással is rendelkezik a vaszkuláris simaizomsejteken az L-típusú kalciumcsatornán keresztül történő kalciumbeáramlás gátlása révén (339).

Abán és munkatársai korábban vizsgálták a CB1 és FAAH lepényi expresszióját és lokalizációját praeeclampsziában (340). Tanulmányukban szignifikánsan magasabb NAPE-PLD expressziót és alacsonyabb vagy kimutathatatlan FAAH expressziót találtak praeeclampsziában, ugyanakkor nem figyeltek meg különbséget a CB1 expresszióban normális és praeeclampsziás méhlepények között. Eredményeik megerősítik az endokannabinoid rendszer kóros aktiválódását praeeclampsziában, azonban az endokannabinoid rendszer deciduális expresszióját, illetve a CB2 expresszióját és lokalizációját nem vizsgálták. Az Abán és munkatársai és saját eredményeink között észlelt különbségeket magyarázhatják a

praeclampsziás csoport terhességi korában, a kórkép súlyosságában, illetve a használt antitestekben mutatkozó eltérések.

Tekintettel tanulmányunk eset-kontroll jellegére, direkt ok-okozati összefüggés a CB1 fokozott lepényi expressziója és a praeclampsia kialakulása között nem állapítható meg. Ugyan lehetséges, hogy a CB1 fokozott expressziója inkább a praeclampsia következménye, mint oka, azonban nem találtunk irodalmi adatot arra vonatkozóan, hogy a praeclampsia kockázati tényezői vagy kórélettani folyamatai összefüggést mutatnának a CB1 lepényi expressziójával.

5.19. Az anandamid szérumszintjének meghatározása praeclampsziában

Eredményeink szerint az anandamid szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb praeclampsziában, mint szövődménymentes 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 szérum anandamid koncentráció az anandamid CB1-et fokozottan expresszáló syncytiotrophoblasthoz történő kötődésének, és így a méhlepénybeni szekvesztrációjának a következménye. A leptin képes stimulálni humán T limfociták és limfóma sejtek FAAH aktivitását (341, 342). Az IL-6 is fokozza az FAAH enzim aktivitását humán limfocitákban (343). Tekintettel arra, hogy mind a leptin, mind az IL-6 szérumszintje emelkedik praeclampsziában, a limfociták fokozott FAAH aktivitása is magyarázhatja a szérum anandamid koncentráció csökkenését praeclampsziában. A Hsp70 és az albumin képes megkötni az anandamidot a citoplazmában (344). Ezért az is elképzelhető, hogy a Hsp70 dajkafehérjeként megköti az anandamidot a perifériás keringésben, szérumszintjének csökkenéséhez vezetve. Az anandamid albuminhoz kötődve a vesén keresztül is exkrécióra kerülhet praeclampsziában a vizelettel történő albuminvesztés révén.

Mind az exogén, mind az endogén kannabinoidok anti-inflammatorikus hatását kimutatták. Az anandamid a Th17-mediált gyulladásos folyamatot csillapítja *in vivo* az IL-10 termelés serkentésén keresztül, amely pro-inflammatorikus útvonalakra ható különböző mikroRNS-eket indukálva IL-17A és IFN- γ csökkenéshez vezet (345). Az endokannabinoidok a citokintermelés egyensúlyát Th1-ről Th2 irányba tolják el (346). Továbbá mind az anandamid, mind az exogén Δ^9 -tetrahydrokannabinol serkenti a regulátoros T sejtek funkcióját CB1 és CB2 receptorokon keresztül (347). 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 (348). Az endokannabinoidok a CB1 és az 1-es típusú vanilloid receptoron (TRPV1) hatva, NO-mediált és NO-független útvonalakon keresztül képesek vazodilatációt kiváltani (337). Ezek alapján lehetséges, hogy a csökkent szérumszintű anandamid koncentráció szerepet játszik a vérnyomás emelkedésében praeclampsziában. Érdekes megfigyelés, hogy transzgénikus patkány praeclampsia modellben, koraterhességben az artéria uterina angiotenzin II által kiváltott fokozott kontrakciója az anandamid hidrolízisének gátlásával csökkenthető volt, ami a renin-angiotenzin és az endokannabinoid rendszer interakciójára utal a vaszkuláris reaktivitás növekedésében a hipertóniás terhesség korai (preszimptomás) szakaszában (349).

Tanulmányunkban az emelkedett szérumszintű 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.

5.20. 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 ösztrogének az ösztrogén receptor α -n keresztül több különböző – mind direkt vaszkuláris, mind szisztémás – hatást is kifejtenek, amelyek befolyásolhatják a praeclampsia kockázatát (350). Az ösztrogének vazodilatációt okozó hatása az ösztrogén receptor α -n keresztül részben gyors, nem genomikus, részben genomikus úton érvényesül. Az ösztrogén receptor α -n keresztül az ösztrogének emellett felgyorsítják a re-endothelizációt érérésülést követően, illetve gátolják a vaszkuláris sérülésre adott válaszreakciót (351, 352). Továbbá az ösztrogének szisztémás hatásokat is kifejtenek az ösztrogén receptor α -n keresztül, amik a

lipid profilt, az alvadási és fibrinolitikus rendszert érintik, illetve antioxidáns hatásokat is magukba foglalnak (350).

Egy intronban elhelyezkedő polimorfizmus számos módon gyakorolhat hatást a fenotípusra: elősegítheti vagy gátolhatja a gén transzkripciót, befolyásolhatja a hírvivő RNS hasítását, illetve kapcsolságban állhat egy másik, funkcionális gén polimorfizmussal (353-355). 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 intragénikus enhancer-ként funkcionál (356). Azt is kimutatták, hogy az ösztrogének fokozzák a myb transzkripció faktor expresszióját (357). 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 (358). Ezért feltételezzük, hogy az ösztrogén receptor α gén polimorfizmusa által kiváltott relatív ösztrogénhiányos állapot (csökkent ösztrogén receptor α expresszió) vazokonstrikciót okoz a szisztémás és uteroplacentáris keringésben, és ezen keresztül fokozhatja a praeclampsia és az intrauterin növekedési retardáció kockázatát. Az ösztrogén receptor α csökkent expresszióját az azt kódoló gén egy másik egy pontos nukleotid variációja kapcsán korábban már összefüggésbe hozták a spontán vetéléssel (359). Továbbá a kórelőzményben szereplő praeclampsia csökkenti az emlőrák kockázatát, ami szintén az ösztrogén receptor csökkent expressziójára utal praeclampsias terhesekben (360). A praeclampsia és a kardiovaszkuláris megbetegedések több rizikófaktorra megegyezik (obezitás, hyperlipidaemia, inzulinrezisztencia) és hasonló kóreléttani mechanizmusok (oxidatív stressz, gyulladás, endothelsejt károsodás) vesznek részt a kialakulásukban. Ezzel összhangban az ösztrogén receptor α gén PvuII és XbaI T-A haplotípusa kapcsolatot mutatott a myocardialis infarctussal és az ischaemiás szívbetegséggel postmenopausás nőkben (361).

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

A tumor nekrosis faktor- α gén polimorfizmusai közül a promotor régióban 308 nukleotiddal a transzkripció startpontjától felfelé elhelyezkedő guanin (TNF1 allél)-adenin (TNF2 allél) tranzíciót (G-308A) vizsgálták leggyakrabban jelölt gén asszociációs tanulmányokban. A mutáns allélről (TNF2) 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 (362).

Tanulmányunkban azt figyeltük meg, hogy a mutáns allél hordozó terhesek kockázata súlyos intrauterin növekedési retardációval társult praeclampsia szignifikánsan magasabb volt, mint a nem hordozóké, ami az életkortól, terhesség előtti BMI-től és primiparitástól függetlennek bizonyult.

A TNF- α képes endothelsejt diszfunkciót és károsodást, továbbá inzulinrezisztenciát és dyslipidaemiát előidézni, amelyek mindegyike szerepet játszik a praeclampsia anyai tünetegyüttesének a patogenezisében is (363, 364). Az a megfigyelésünk azonban, hogy a TNF- α G-308A polimorfizmus csak azokban az esetekben mutatott összefüggést a praeclampsiaival, amikor az súlyos intrauterin növekedési retardációval társult, arra utal, hogy ez az egy pontos nukleotid variáció inkább a kórkép magzati, mint anyai tünetegyüttesére való hajlamot fokozza. A TNF- α az anya és magzat közötti határfelületen erőteljes lokális (autokrin és parakrin) hatásokat is kifejt. Reister és munkatársai közölték, hogy a makrofágok, amelyek a praeclampsias terheseklepényi ágyában nagy mennyiségben vannak jelen, képesek gátolni az extravillosus trophoblastsejtek invázióját a spirális artériákban TNF- α szekréció és triptofán depléción keresztül kiváltott apoptózis révén (365). A TNF- α első trimeszteri boholy explantátumon a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) indukcióján keresztül is gátolta a trophoblast inváziót (366). A TNF- α képes továbbá stimulálni a fibrin képződését protrombinázok, úgymint az fgl2 aktivációján keresztül, ami a trophoblastsejtek integritásának károsodásához, és azon keresztül praeclampsia és/vagy IUGR kialakulásához vezethet (367). 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.

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

A Toll-like receptor 4 a mintázatfelismerő receptorok családjába tartozik, elsősorban a természetes immunrendszer sejtjein fejeződik ki: a monocitákon, makrofágokon, granulocitákon és dendritikus sejteken (368). A Toll-like receptor 4 a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharidok receptora, de képes endogén ligandokat, a károsodott sejtek által kibocsátott veszély jeleket is felismerni, többek között a hő sokkfehérjéket is. A Toll-like receptor 4 aktivációja pro-inflammatorikus citokinek, úgymint a TNF- α , továbbá 1-es típusú interferonok termeléséhez vezet (369).

A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly polimorfizmusa egy adenin-guanin tranzíció a 896-os nukleotid pozícióban (A896G), ami egy aszpartát-glicin aminosav cseréhez vezet a 299-es pozícióban. A Thr399Ile egy pontos nukleotid variáció egy citozin-timin tranzíciót jelent az 1196-os nukleotid pozícióban (C1196T), ami egy treonin-izoleucin aminosav cserét okoz a 399-es pozícióban (370). 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 praeclampsias 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 praeclampsiaival.

A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusa a receptor extracelluláris doménjét érinti és csökkent ligand felismeréshez vezethet. Humán vizsgálatban kimutatták, hogy a két polimorfizmus jelenléte az inhalált lipopoliszacharidra adott csökkent válaszreakcióval társul (370). Továbbá megfigyelték összefüggésüket több fertőző megbetegedéssel és a koraszüléssel is (371-374). Másrészt az atheroscleroticus szív- és érrendszeri betegségek, a rheumatoid arthritis, a késői kezdetű Alzheimer-kór és a tüdőtranszplantációt követő akut allograft kilökődés kockázatát csökkentik (375-380).

A praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős szisztémás gyulladásos válaszreakció részeként a természetes és az adaptív immunrendszer aktiválódik. A Toll-like receptor 4 központi szerepet játszik a természetes immunválasz létrejöttében és szabályozza az adaptív immunválaszt (381). Ezért azt feltételeztük, hogy a Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile egy pontos nukleotid variációja funkcióvesztéssel járó polimorfizmusként befolyásolja a praeclampsia kockázatát. A két polimorfizmus és a praeclampsia közötti összefüggés hiányának oka nem ismert. Lehetséges, hogy a vizsgált polimorfizmusok valójában nem járnak funkcionális következményekkel. Erre utalhat, hogy olyan genetikai asszociációs vizsgálatokat is közöltek, amelyekben a két polimorfizmus nem mutatott összefüggést különböző fertőzőes eredetű, illetve atheroscleroticus megbetegedésekkel (382-384). Azok a megfigyelések, melyek szerint a mutáns allél változatok nem befolyásolják a monociták, illetve a teljes vér lipopoliszacharid által kiváltott aktivációját, ugyancsak megkérdőjelezi a két polimorfizmus szerepét a gyulladásos kórképek iránti fogékonyságban (385, 386). Továbbá a Toll-like receptor 4 endogén (nem mikrobiális) ligandjának létezése is vitatott (387).

Tanulmányunkkal egyidőben megjelent közleményükben holland szerzők arról számoltak be, hogy a Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusa a korai kezdetű praeclampsia és HELLP-szindróma kockázatát fokozza (388). Később kanadai kutatók is találtak kapcsolatot a Toll-like receptor 4 gén két általunk is vizsgált polimorfizmusa és a korai kezdetű praeclampsia fokozott kockázata között (389). Ezt követően publikált vizsgálatukban brazil szerzők azonban nem figyeltek meg összefüggést az Asp299Gly polimorfizmus és a praeclampsia között (390). Tanulmányunkban nem volt szignifikáns különbség a Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusának genotípus, allél és haplotípus frekvenciájában a korai és késői kezdetű praeclampsias esetek között. Így az is elképzelhető, hogy etnikai különbségek magyarázzák a két polimorfizmus és a praeclampsia közötti összefüggés hiányát közép-magyarországi kaukázusi populációinkban.

6. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. Teljesen automatizált elektrokemilumineszcens immunoassay módszerrel kimutattam, hogy az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszint praeclampszában 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 praeclampszában. Továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezete is intakt praeclampszában.
5. A plazma oszteopontin és fibronectin szintek között szignifikáns pozitív lineáris összefüggés figyelhető meg praeclampsziás terhesekben. Kifejezett endothelsejt károsodással járó praeclampszában 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 adhézis 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 szérumszintű IL-17A koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados hatása additív a praeclampszia kockázatában.
8. Az emelkedett szérumszintű leptin koncentráció szignifikáns összefüggést mutat az interferon- γ -indukált protein-10 (IP-10) szérumszintjével praeclampsziában. Az emelkedett szérumszintű leptin koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampszia rizikóját.
9. A Hsp70 emelkedett szérumszintje összefüggést mutat a szisztémás gyulladás, az oxidatív stressz és a hepatocelluláris károsodás markereivel praeclampsziában.
10. Az emelkedett szérumszintű Hsp70 koncentráció szignifikáns összefüggésben áll az IL-12p40, az MCP-1, az ICAM-1 és a VCAM-1 szérumszintjével praeclampsziában. Továbbá az emelkedett szérumszintű Hsp70 koncentráció és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampszia 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.

7. Irodalomjegyzék

1. Di Renzo GC. The great obstetrical syndromes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 633-635.
2. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010; 376: 631-644.
3. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447-1451.
4. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 170: 1-7.
5. Lisonkova S, Sabr Y, Mayer C, Young C, Skoll A, Joseph KS. Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2014; 124: 771-781.
6. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens* 2008; 21: 521-526.
7. Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstet Gynecol* 2009; 113: 1075-1081.
8. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-799.
9. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 130-137.
10. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M, NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension* 2003; 41: 437-445.
11. Tranquilli AL, Landi B, Giannubilo SR, Sibai BM. Preeclampsia: No longer solely a pregnancy disease. *Pregnancy Hypertens* 2012; 2: 350-357.
12. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 1235-1239.
13. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330: 565.

14. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2002; 346: 33-38.
15. Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 156-161.
16. Rao AK, Cheng YW, Caughey AB. Perinatal complications among different Asian-American subgroups. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: e39-41.
17. Silva LM, Coolman M, Steegers EA, Jaddoe VW, Moll HA, Hofman A, Mackenbach JP, Raat H. Low socioeconomic status is a risk factor for preeclampsia: the Generation R Study. *J Hypertens* 2008; 26: 1200-1208.
18. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. Maternal infection and risk of preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 7-22.
19. Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizan JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1026-1035.
20. Committee Opinion Summary No. 638: First-Trimester Risk Assessment for Early-Onset Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2015; 126: 689.
21. Visintin C, Mugglestone MA, Almerie MQ, Nherera LM, James D, Walkinshaw S, Guideline Development G. Management of hypertensive disorders during pregnancy: summary of NICE guidance. *BMJ* 2010; 341: c2207.
22. Griffith FL. A Medical Papyrus from Egypt. *Br Med J* 1893; 1: 1172-1174.
23. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007; 28: 192-209.
24. Robillard PY, Hulsey TC, Alexander GR, Keenan A, de Caunes F, Papiernik E. Paternity patterns and risk of preeclampsia in the last pregnancy in multiparae. *J Reprod Immunol* 1993; 24: 1-12.
25. Robillard PY, Hulsey TC. Association of pregnancy-induced-hypertension, preeclampsia, and eclampsia with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 1996; 347: 619.
26. Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 1989; 262: 3143-3147.

27. Koelman CA, Coumans AB, Nijman HW, Doxiadis II, Dekker GA, Claas FH. Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid? *J Reprod Immunol* 2000; 46: 155-166.
28. Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, Philips S, Allgar V, Walker JJ. The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Hum Reprod* 1999; 14: 2268-2273.
29. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 534-543.
30. Robertson SA, Guerin LR, Moldenhauer LM, Hayball JD. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 109-116.
31. Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlstrom AC, Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod* 2009; 80: 1036-1045.
32. Cagayan MS. Hydatidiform mole and its complications: review of patient profiles and management at the university of the Philippines-Philippine General Hospital. *J Reprod Med* 2014; 59: 235-240.
33. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA. Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol* 2007; 24: 257-266.
34. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308: 1592-1594.
35. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006; 27: 399-404.
36. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-663.
37. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-958.
38. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 342-352.
39. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000; 157: 2111-2122.

40. Zhou Y, Genbacev O, Damsky CH, Fisher SJ. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 197-213.
41. Graham CH, Burton GJ. Oxygen and trophoblast behaviour--a workshop report. *Placenta* 2004; 25 Suppl A: S90-92.
42. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93: 1049-1059.
43. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35.
44. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 31-40.
45. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575-583.
46. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 2000; 156: 2185-2199.
47. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002; 66: 802-812.
48. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 648-655.
49. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 669-674.
50. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359-1375.

51. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 347-357.
52. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 703-716.
53. Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006; 7: 241-246.
54. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, Borzychowski A, Ashkar AA, Black GP, Evans SS, Chantakru S, van den Heuvel M, Paffaro VA Jr, Yamada AT. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction* 2003; 126: 149-160.
55. van der Meer A, Lukassen HG, van Lierop MJ, Wijnands F, Mosselman S, Braat DD, Joosten I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 189-195.
56. Rajagopalan S. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction. *Cell Mol Immunol* 2014; 11: 460-466.
57. Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O, Laskarin G, Juretic K, Bensussan A, Rukavina D, Le Bouteiller P. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. *Placenta* 2006; 27 Suppl A: S34-39.
58. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 572-580.
59. Moffett A, Hiby SE. How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* 2007; 28 Suppl A: S51-56.
60. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200: 957-965.
61. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, Scherjon SA, Claas FH. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* 2008; 180: 5737-5745.
62. Tilburgs T, Scherjon SA, van der Mast BJ, Haasnoot GW, Versteeg-v.d.Voort-Maarschalk M, Roelen DL, van Rood JJ, Claas FH. Fetal-maternal HLA-C mismatch

- is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *J Reprod Immunol* 2009; 82: 148-157.
63. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; 76: 30-39.
 64. Stevens DU, Al-Nasiry S, Bulten J, Spaanderman ME. Decidual vasculopathy in preeclampsia: lesion characteristics relate to disease severity and perinatal outcome. *Placenta* 2013; 34: 805-809.
 65. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 499-506.
 66. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1200-1204.
 67. Gratacos E, Casals E, Deulofeu R, Cararach V, Alonso PL, Fortuny A. Lipid peroxide and vitamin E patterns in pregnant women with different types of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 1072-1076.
 68. Hubel CA. Dyslipidemia, iron, and oxidative stress in preeclampsia: assessment of maternal and feto-placental interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 75-92.
 69. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 309-316.
 70. Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009; 30 Suppl A: S38-42.
 71. Terrone DA, Rinehart BK, May WL, Moore A, Magann EF, Martin JN Jr. Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia. *South Med J* 2000; 93: 768-771.
 72. Canzoneri BJ, Lewis DF, Groome L, Wang Y. Increased neutrophil numbers account for leukocytosis in women with preeclampsia. *Am J Perinatol* 2009; 26: 729-732.
 73. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 80-86.
 74. Haeger M, Bengtson A, Karlsson K, Heideman M. Complement activation and anaphylatoxin (C3a and C5a) formation in preeclampsia and by amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1989; 73: 551-556.
 75. Haeger M, Unander M, Bengtsson A. Complement activation in relation to development of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 46-49.

76. Haeger M, Unander M, Norder-Hansson B, Tylman M, Bengtsson A. Complement, neutrophil, and macrophage activation in women with severe preeclampsia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 19-26.
77. de Messias-Reason IJ, Aleixo V, de Freitas H, Nisihara RM, Mocelin V, Urbanetz A. Complement activation in Brazilian patients with preeclampsia. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2000; 10: 209-214.
78. Perry KG Jr, Martin JN Jr. Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1992; 35: 338-350.
79. Konijnenberg A, Stokkers EW, van der Post JA, Schaap MC, Boer K, Bleker OP, Sturk A. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 461-469.
80. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 202-203.
81. Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 102-111.
82. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2006; 70: 83-91.
83. Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 151-162.
84. Perkins AV, Linton EA, Eben F, Simpson J, Wolfe CD, Redman CW. Corticotrophin-releasing hormone and corticotrophin-releasing hormone binding protein in normal and pre-eclamptic human pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 118-122.
85. Muttukrishna S, Knight PG, Groome NP, Redman CW, Ledger WL. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet* 1997; 349: 1285-1288.
86. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3225-3229.

87. Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21: 597-602.
88. Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol* 2007; 178: 5949-5956.
89. Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 943-949.
90. Cester N, Staffolani R, Rabini RA, Magnanelli R, Salvolini E, Galassi R, Mazzanti L, Romanini C. Pregnancy induced hypertension: a role for peroxidation in microvillus plasma membranes. *Mol Cell Biochem* 1994; 131: 151-155.
91. Guller S, Tang Z, Ma YY, Di Santo S, Sager R, Schneider H. Protein composition of microparticles shed from human placenta during placental perfusion: Potential role in angiogenesis and fibrinolysis in preeclampsia. *Placenta* 2011; 32: 63-69.
92. Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, Zsengeller Z, Edmunds L, Jeyabalan A, Hubel CA, Stillman IE, Parikh SM, Karumanchi SA. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension* 2012; 59: 256-264.
93. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One* 2013; 8: e56754.
94. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: 193-201.
95. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011; 31: 33-46.
96. Maharaj AS, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res* 2007; 74: 100-113.
97. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649-658.

98. Li Z, Zhang Y, Ying Ma J, Kapoun AM, Shao Q, Kerr I, Lam A, O'Young G, Sannajust F, Stathis P, Schreiner G, Karumanchi SA, Protter AA, Pollitt NS. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. *Hypertension* 2007; 50: 686-692.
99. Suzuki H, Ohkuchi A, Matsubara S, Takei Y, Murakami M, Shibuya M, Suzuki M, Sato Y. Effect of recombinant placental growth factor 2 on hypertension induced by full-length mouse soluble fms-like tyrosine kinase 1 adenoviral vector in pregnant mice. *Hypertension* 2009; 54: 1129-1135.
100. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672-683.
101. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, Taylor RN, Ecker JL, Karumanchi SA, Thadhani R. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 16-22.
102. Maynard SE, Moore Simas TA, Solitro MJ, Rajan A, Crawford S, Soderland P, Meyer BA. Circulating angiogenic factors in singleton vs multiple-gestation pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 200.e1-7.
103. Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, Shivalingappa V, Mutter W, Sachs BP, Lim KH, Bdolah-Abram T, Epstein FH, Karumanchi SA. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 428.e1-6.
104. Koga K, Osuga Y, Tajima T, Hirota Y, Igarashi T, Fujii T, Yano T, Taketani Y. Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. *Fertil Steril* 2010; 94: 305-308.
105. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, Sachs BP, Haddow JE, Karumanchi SA. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 239-245.
106. Jeyabalan A, Powers RW, Durica AR, Harger GF, Roberts JM, Ness RB. Cigarette smoke exposure and angiogenic factors in pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens* 2008; 21: 943-947.

107. Mehendale R, Hibbard J, Fazleabas A, Leach R. Placental angiogenesis markers sFlt-1 and PlGF: response to cigarette smoke. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 363.e1-5.
108. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642-649.
109. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA, CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006; 355: 992-1005.
110. Karumanchi SA, Rana S, Taylor RN. Angiogenesis and preeclampsia. In: Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Lindheimer MD (szerk.). *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Elsevier Inc., 2015: 113-132.
111. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; 274: 25130-25135.
112. Ristimäki A, Ylikorkala O, Viinikka L. Effect of growth factors on human vascular endothelial cell prostacyclin production. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 653-657.
113. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Clemens JD, Hauth JC, Catalano P, Sibai B, Curet LB, Levine RJ. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999; 282: 356-362.
114. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 2004; 145: 4838-4845.
115. Gu Y, Lewis DF, Wang Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 260-266.
116. Barsoum IB, Renaud SJ, Graham CH. Glyceryl trinitrate inhibits hypoxia-induced release of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and endoglin from placental tissues. *Am J Pathol* 2011; 178: 2888-2896.

117. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension* 2007; 50: 1142-1147.
118. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, Waugh R, McKenzie P, Kirwan P, Hennessy A. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int* 2007; 71: 977-984.
119. Gilbert JS, Gilbert SA, Arany M, Granger JP. Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension* 2009; 53: 399-403.
120. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* 2007; 115: 1789-1797.
121. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* 2008; 14: 855-862.
122. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008; 453: 1117-1121.
123. Hirtenlehner K, Pollheimer J, Lichtenberger C, Wolschek MF, Zeisler H, Husslein P, Knofler M. Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 412-417.
124. Stenczer B, Molvarec A, Veresh Z, Gullai N, Nagy GR, Walentin S, Szijártó 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.
125. Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J, Garcia C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibarguengoitia F, de la Escalera GM, Clapp C. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 2007; 87: 1009-1017.
126. Leanos-Miranda A, Marquez-Acosta J, Cardenas-Mondragon GM, Chinolla-Arellano ZL, Rivera-Leanos R, Bermejo-Huerta S, Romero-Arauz JF, Alvarez-Jimenez G, Ramos-Leon JC, Ulloa-Aguirre A. Urinary prolactin as a reliable marker for preeclampsia, its severity, and the occurrence of adverse pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2492-2499.

127. Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hayashi C, Hoshiai T, Senoo M, Chisaka H, Yaegashi N, Okamura K. Decrease and senescence of endothelial progenitor cells in patients with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5329-5332.
128. Davidge ST, de Groot CJ, Taylor RN. Endothelial cell dysfunction. In: Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Lindheimer MD (szerk.). *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Elsevier Inc., 2015: 181-207.
129. Redman CW, Sargent IL, Taylor RN. Immunology of normal pregnancy and preeclampsia. In: Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Lindheimer MD (szerk.). *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Elsevier Inc., 2015: 161-179.
130. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 115-122.
131. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 550-555.
132. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 297-306.
133. Ohkuchi A, Minakami H, Aoya T, Haga T, Kimura H, Suzuki M, Sato I. Expansion of the fraction of Th1 cells in women with preeclampsia: inverse correlation between the percentage of Th1 cells and the plasma level of PAI-2. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46: 252-259.
134. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 381-386.
135. Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzelak B, Rolinski J, Oleszczuk J. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 86: 165-170.
136. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 30-37.
137. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 139-145.

138. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 39-45.
139. Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ, Erwich JJ. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy* 2009; 28: 300-311.
140. Toldi G, Svec P, Vásárhelyi B, Mészáros G, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 1229-1233.
141. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, Sohn C. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol* 2008; 129: 401-412.
142. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2012; 93: 75-81.
143. Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Casalis PA, Dudenhausen JW, Volk HD, Zenclussen AC. Preeclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 384-389.
144. Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z, Dong M. Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 190-194.
145. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1365-1370.
146. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol* 2004; 24: 565-570.
147. Sattar N, Greer IA. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? *BMJ* 2002; 325: 157-160.
148. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22.

149. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 159-167.
150. Joubert K. Magyar születéskori testtömeg- és testhossz-standardok az 1990-96. évi országos élveszületési adatok alapján. *Magy Nőorv L* 2000; 63: 155-163.
151. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005; 129: 93-100.
152. John Bowen D, Bowley SJ. Improved visualisation of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Thromb Haemost* 2007; 97: 1051-1052.
153. Budde U, Schneppenheim R, Eikenboom J, Goodeve A, Will K, Drewke E, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Perez A, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost* 2008; 6: 762-771.
154. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods* 2001; 257: 107-116.
155. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
156. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
157. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-372.
158. Excoffier L, Slatkin M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 171-180.
159. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics* 2003; 1: 7-19.
160. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796.
161. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320.
162. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by

- the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1540-1548.
163. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 2005; 46: 1243-1249.
 164. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657-665.
 165. Lash GE, Taylor CM, Trew AJ, Cooper S, Anthony FW, Wheeler T, Baker PN. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors* 2002; 20: 189-196.
 166. Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10: 178-188.
 167. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 161.e1-11.
 168. Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H, Takahashi K, Yoshida M, Matsubara S, Suzuki M. Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. *Hypertens Res* 2010; 33: 422-427.
 169. Nadarajah VD, Min RG, Judson JP, Jegasothy R, Ling EH. Maternal plasma soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor levels as biochemical markers of gestational hypertension for Malaysian mothers. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 855-863.
 170. Khalil A, Muttukrishna S, Harrington K, Jauniaux E. Effect of antihypertensive therapy with alpha methyl dopa on levels of angiogenic factors in pregnancies with hypertensive disorders. *PLoS One* 2008; 3: e2766.
 171. Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation* 2010; 122: 478-487.
 172. Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, Lopez JA, Cruz MA. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2003; 278: 29633-29639.

173. Zhou W, Inada M, Lee TP, Benten D, Lyubsky S, Bouhassira EE, Gupta S, Tsai HM. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2005; 85: 780-788.
174. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1396-1404.
175. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 212-216.
176. Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, Canciani MT, Daina E, Bresin E, Contaretti S, Caprioli J, Gamba S, Ruggenenti P, Perico N, Mannucci PM, Italian Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2002; 100: 778-785.
177. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98: 2730-2735.
178. Mannucci PM, Vanoli M, Forza I, Canciani MT, Scorza R. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). *Haematologica* 2003; 88: 914-918.
179. Mannucci PM, Karimi M, Mosalaei A, Canciani MT, Peyvandi F. Patients with localized and disseminated tumors have reduced but measurable levels of ADAMTS-13 (von Willebrand factor cleaving protease). *Haematologica* 2003; 88: 454-458.
180. Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 2007; 138: 534-540.
181. Bockmeyer CL, Claus RA, Budde U, Kentouche K, Schneppenheim R, Losche W, Reinhart K, Brunkhorst FM. Inflammation-associated ADAMTS13 deficiency promotes formation of ultra-large von Willebrand factor. *Haematologica* 2008; 93: 137-140.
182. Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002; 100: 710-713.

183. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, Cheung B, Machin SJ, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol* 2012; 158: 323-335.
184. Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003; 88: 1029-1034.
185. Hulstein JJ, van Runnard Heimel PJ, Franx A, Lenting PJ, Bruinse HW, Silence K, de Groot PG, Fijnheer R. Acute activation of the endothelium results in increased levels of active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2569-2575.
186. Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, Lessey BA. Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4991-5000.
187. Briese J, Oberndorfer M, Patschenik C, Schulte HM, Makrigiannakis A, Loning T, Bamberger AM. Osteopontin is colocalized with the adhesion molecule CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5407-5413.
188. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1648-1656.
189. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 333-345.
190. Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, Spencer TE, Bazer FW, Pfarrer C, Gray CA. Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biol Reprod* 2003; 68: 1951-1958.
191. Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 2003; 69: 1458-1471.
192. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2302-2309.

193. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 602-606.
194. Paternoster D, Stella A, Simioni P, Trovo S, Plebani P, Girolami A. Clotting inhibitors and fibronectin as potential markers in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 1994; 47: 215-221.
195. Ostlund E, Hansson LO, Bremme K. Fibronectin is a marker for organ involvement and may reflect the severity of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20: 79-87.
196. Beninati S, Senger DR, Cordella-Miele E, Mukherjee AB, Chackalaparampil I, Shanmugam V, Singh K, Mukherjee BB. Osteopontin: its transglutaminase-catalyzed posttranslational modifications and cross-linking to fibronectin. *J Biochem* 1994; 115: 675-682.
197. Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol* 1994; 84: 937-940.
198. Benian A, Madazli R, Aksu F, Uzun H, Aydin S. Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 327-331.
199. Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, Than NG, Mittal P, Edwin S, Yoon BH, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hassan SS. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 777-792.
200. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033.
201. Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C. The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18: 297-303.
202. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 437-446.
203. Sarandakou A, Protonotariou E, Rizos D, Malamitsi-Puchner A, Giannaki G, Phocas I, Creatsas G. Serum leptin concentrations during the perinatal period. *Am J Perinatol* 2000; 17: 325-328.

204. Meier CA, Chicheportiche R, Dreyer M, Dayer JM. IP-10, but not RANTES, is upregulated by leptin in monocytic cells. *Cytokine* 2003; 21: 43-47.
205. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66: 191-197.
206. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 1998; 27: 367-377.
207. 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.
208. 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.
209. 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.
210. Madách K, Molvarec A, Rigó J Jr, Nagy B, Péntzes 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.
211. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* 2005; 175: 2900-2912.
212. Fischer CP, Hiscock NJ, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjoberg LB, Febbraio MA, Pedersen BK. Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise-induced heat shock protein 72 expression in humans. *J Appl Physiol (1985)* 2006; 100: 1679-1687.
213. Hunter-Lavin C, Hudson PR, Mukherjee S, Davies GK, Williams CP, Harvey JN, Child DF, Williams JH. Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9: 344-349.
214. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to

- dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539-1546.
215. Gombos T, Förhécz Z, Pozsonyi Z, Jánoskúti L, Prohászka Z. Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure. *Cell Stress Chaperones* 2008; 13: 199-206.
 216. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003; 362: 469-476.
 217. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002; 105: 685-690.
 218. Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol* 2003; 58: 664-669.
 219. Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimamura F, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M. Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection. *Am J Surg* 2004; 187: 777-784.
 220. Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart* 2005; 91: 299-304.
 221. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6: 435-442.
 222. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14: 303-313.
 223. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; 277: 15028-15034.
 224. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 2002; 168: 2997-3003.
 225. Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic

- cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol* 2002; 169: 2422-2429.
226. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev* 2005; 11: 34-45.
 227. Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 1951-1960.
 228. Liu Y, Li N, You L, Liu X, Li H, Wang X. HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Mol Med* 2008; 14: 561-566.
 229. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 511-517.
 230. Boutet M, Roland L, Thomas N, Bilodeau JF. Specific systemic antioxidant response to preeclampsia in late pregnancy: the study of intracellular glutathione peroxidases in maternal and fetal blood. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 530.e1-7.
 231. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones* 1999; 4: 29-35.
 232. Lutz HU, Miescher S. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 405-409.
 233. Gelber SE, Bongiovanni AM, Jean-Pierre C, Linhares IM, Skupski DW, Witkin SS. Antibodies to the 70 kDa heat shock protein in midtrimester amniotic fluid and intraamniotic immunity. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 278.e1-4.
 234. Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P, Mehlert A, So A, Rothbard J, Jindal S, Young RA, Young DB. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1989; 1: 191-196.
 235. Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 31-37.
 236. Witkin SS, Sultan KM, Neal GS, Jeremias J, Grifo JA, Rosenwaks Z. Unsuspected *Chlamydia trachomatis* infection and in vitro fertilization outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1208-1214.

237. Witkin SS, Jeremias J, Neuer A, David S, Kligman I, Toth M, Willner E, Witkin K. Immune recognition of the 60kD heat shock protein: implications for subsequent fertility. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1996; 4: 152-158.
238. Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Hartig W. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7: 180-185.
239. Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000; 36: 303-307.
240. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels* 2000; 15: 18-22.
241. Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegard J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens* 2002; 20: 1815-1820.
242. Veres A, Prohászka Z, Kilpinen S, Singh M, Füst G, Hurme M. The promoter polymorphism of the IL-6 gene is associated with levels of antibodies to 60-kDa heat-shock proteins. *Immunogenetics* 2002; 53: 851-856.
243. Pandey JP, Prohászka Z, Veres A, Füst G, Hurme M. Epistatic effects of genes encoding immunoglobulin GM allotypes and interleukin-6 on the production of autoantibodies to 60- and 65-kDa heat-shock proteins. *Genes Immun* 2004; 5: 68-71.
244. Kligman I, Jeremias J, Rosenwaks Z, Witkin SS. Cell-mediated immunity to human and *Escherichia coli* 60-kDa heat shock protein in women: association with a history of spontaneous abortion and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 32-36.
245. Oksjoki R, Kovanen PT, Meri S, Pentikainen MO. Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Front Biosci* 2007; 12: 4696-4708.
246. Nauta AJ, Roos A, Daha MR. A regulatory role for complement in innate immunity and autoimmunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 310-323.
247. Sjoberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 2009; 30: 83-90.
248. Feinberg BB, Jack RM, Mok SC, Anderson DJ. Low erythrocyte complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression in preeclamptic gestations. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 352-357.

249. Feinberg BB. Preeclampsia: the death of Goliath. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 84-98.
250. Jiang H, Cooper B, Robey FA, Gewurz H. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J Biol Chem* 1992; 267: 25597-25601.
251. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 414-419.
252. 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.
253. Prohászka Z, Singh M, Nagy K, Kiss E, Lakos G, Duba J, Füst G. Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7: 17-22.
254. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijsma O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, Gingras AR, Mantovani A, Hack EC, Roos A. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1726-1736.
255. Roos A, Xu W, Castellano G, Nauta AJ, Garred P, Daha MR, van Kooten C. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 921-929.
256. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, Daha MR, van Kooten C. Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol* 2008; 180: 7613-7621.
257. Lynch AM, Murphy JR, Byers T, Gibbs RS, Neville MC, Giclas PC, Salmon JE, Holers VM. Alternative complement pathway activation fragment Bb in early pregnancy as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 385.e1-9.
258. van de Geijn FE, Dolhain RJ, van Rijs W, Hazes JM, de Groot CJ. Mannose-binding lectin genotypes and pre-eclampsia: a case-control study. *Hum Immunol* 2007; 68: 888-893.
259. Wang CC, Yim KW, Poon TC, Choy KW, Chu CY, Lui WT, Lau TK, Rogers MS, Leung TN. Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia. *Clin Chem* 2007; 53: 42-52.

260. Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigó B, Szabó G, Papp Z, Linhares IM, Witkin SS. Mannose-binding lectin (MBL) codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome and pre-eclampsia-associated intrauterine growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 281-285.
261. Than NG, Romero R, Erez O, Kusanovic JP, Tarca AL, Edwin SS, Kim JS, Hassan SS, Espinoza J, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Friel L, Gotsch F, Vaisbuch E, Camacho N, Papp Z. A role for mannose-binding lectin, a component of the innate immune system in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 333-345.
262. Celik N, Ozan H. Maternal serum mannose-binding lectin in severe preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2008; 35: 179-182.
263. Labarrere C, Alonso J, Manni J, Domenichini E, Althabe O. Immunohistochemical findings in acute atherosclerosis associated with intrauterine growth retardation. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; 7: 149-155.
264. Rampersad R, Barton A, Sadovsky Y, Nelson DM. The C5b-9 membrane attack complex of complement activation localizes to villous trophoblast injury in vivo and modulates human trophoblast function in vitro. *Placenta* 2008; 29: 855-861.
265. Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 2006; 203: 2165-2175.
266. Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol* 1984; 7: 193-219.
267. Webster RO, Hong SR, Johnston RB Jr, Henson PM. Biological effects of the human complement fragments C5a and C5ades Arg on neutrophil function. *Immunopharmacology* 1980; 2: 201-219.
268. Hansch GM, Seitz M, Betz M. Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 317-320.
269. Scholz W, McClurg MR, Cardenas GJ, Smith M, Noonan DJ, Hugli TE, Morgan EL. C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57: 297-307.
270. Haeger M, Unander M, Andersson B, Tarkowski A, Arnestad JP, Bengtsson A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75: 695-701.

271. Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, Macconi D, Gastoldi S, Todeschini M, Porra F, Belotti D, Pogliani EM, Noris M, Remuzzi G. Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost* 2005; 93: 443-452.
272. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology* 2007; 212: 371-379.
273. Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem* 1996; 271: 2448-2454.
274. Jensen ML, Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Garred P. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol* 2007; 44: 856-865.
275. Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P, Garred P. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1598-1607.
276. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, Stahl GL, Matsushita M, Fujita T, van Kooten C, Daha MR. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1724-1734.
277. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111: 707-716.
278. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 43-54.
279. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 2003; 278: 12605-12608.
280. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 427-434.

281. Glusker P, Recht L, Lane B. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and bevacizumab. *N Engl J Med* 2006; 354: 980-982.
282. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, Maltezos E. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 321-324.
283. Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay Á, Vásárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó J Jr. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 233-236.
284. Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR, Kim A. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 271.e1-4.
285. 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.
286. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 115-120.
287. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2311-2319.
288. Zuniga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 73-79.
289. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-1212.
290. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol* 1998; 160: 4831-4840.

291. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995; 378: 736-739.
292. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8: 825-834.
293. Dias-Baruffi M, Zhu H, Cho M, Karmakar S, McEver RP, Cummings RD. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 41282-41293.
294. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* 2000; 165: 3722-3729.
295. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007; 13: 1450-1457.
296. Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, Strominger JL. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18472-18477.
297. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009; 183: 7023-7030.
298. Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens* 2009; 73: 193-198.
299. Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, Nagasawa M, Takano S, Kasahara Y, Nakamura Y, Kondo S, Sugamura K, Nakamura M, Nagata K. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1925-1933.
300. Sakai M, Ogawa K, Shiozaki A, Yoneda S, Sasaki Y, Nagata K, Saito S. Serum granulysin is a marker for Th1 type immunity in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 114-119.
301. Obata-Onai A, Hashimoto S, Onai N, Kurachi M, Nagai S, Shizuno K, Nagahata T, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 2002; 14: 1085-1098.

302. Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, Oleszczuk J. The expression and concentrations of Fas/APO-1 (CD95) antigen in patients with severe pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2001; 49: 153-164.
303. de Groot CJ, van der Mast BJ, Visser W, De Kuiper P, Weimar W, Van Besouw NM. Preeclampsia is associated with increased cytotoxic T-cell capacity to paternal antigens. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 496.e1-6.
304. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005; 174: 5243-5248.
305. O'Quinn DB, Palmer MT, Lee YK, Weaver CT. Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Adv Immunol* 2008; 99: 115-163.
306. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martinez EJ, Duran-Avelar Mde J, Garcia-Magallanes N, Vibanco-Perez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam* 2014; 2014: 651503.
307. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46.
308. Jianjun Z, Yali H, Zhiqun W, Mingming Z, Xia Z. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 38-45.
309. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res* 2009; 19: 399-411.
310. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008; 112: 2340-2352.
311. Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M. Expression of IL-17 in human memory CD45RO⁺ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 1999; 11: 257-266.
312. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehly D, Stumhofer JS, Hunter CA. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 2010; 184: 1776-1783.
313. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; 76: 40-44.
314. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.

315. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336.
316. Nishioka T, Shimizu J, Iida R, Yamazaki S, Sakaguchi S. CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J Immunol* 2006; 176: 6586-6593.
317. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells. *Blood* 2007; 110: 2537-2544.
318. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899-911.
319. Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, Cerino A, Mondelli MU, Barnaba V. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009; 119: 551-564.
320. Shen T, Zheng J, Liang H, Xu C, Chen X, Zhang T, Xu Q, Lu F. Characteristics and PD-1 expression of peripheral CD4+CD127loCD25hiFoxP3+ Treg cells in chronic HCV infected-patients. *Virology* 2011; 8: 279.
321. Swainson LA, Mold JE, Bajpai UD, McCune JM. Expression of the autoimmune susceptibility gene FcRL3 on human regulatory T cells is associated with dysfunction and high levels of programmed cell death-1. *J Immunol* 2010; 184: 3639-3647.
322. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433-3441.
323. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012; 150: 29-38.
324. Hsu P, Santner-Nanan B, Dahlstrom JE, Fadia M, Chandra A, Peek M, Nanan R. Altered decidual DC-SIGN+ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia. *Am J Pathol* 2012; 181: 2149-2160.

325. Inada K, Shima T, Ito M, Ushijima A, Saito S. Helios-positive functional regulatory T cells are decreased in decidua of miscarriage cases with normal fetal chromosomal content. *J Reprod Immunol* 2015; 107: 10-19.
326. Habayeb OM, Bell SC, Konje JC. Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. *Life Sci* 2002; 70: 1963-1977.
327. Taylor AH, Amoako AA, Bambang K, Karasu T, Gebeh A, Lam PM, Marzcylo TH, Konje JC. Endocannabinoids and pregnancy. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 921-930.
328. Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Almada M, Costa MA, Teixeira NA. The Endocannabinoid System in the Postimplantation Period: A Role during Decidualization and Placentation. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 510540.
329. Meccariello R, Battista N, Bradshaw HB, Wang H. Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 412354.
330. Habayeb OM, Taylor AH, Bell SC, Taylor DJ, Konje JC. Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. *Endocrinology* 2008; 149: 5052-5060.
331. Park B, Gibbons HM, Mitchell MD, Glass M. Identification of the CB1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the human placenta. *Placenta* 2003; 24: 990-995.
332. Taylor AH, Finney M, Lam PM, Konje JC. Modulation of the endocannabinoid system in viable and non-viable first trimester pregnancies by pregnancy-related hormones. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 152.
333. Trabucco E, Acone G, Marenna A, Pierantoni R, Cacciola G, Chioccarelli T, Mackie K, Fasano S, Colacurci N, Meccariello R, Cobellis G, Cobellis L. Endocannabinoid system in first trimester placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage. *Placenta* 2009; 30: 516-522.
334. Sun X, Xie H, Yang J, Wang H, Bradshaw HB, Dey SK. Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 16887-16892.
335. Xie H, Sun X, Piao Y, Jegga AG, Handwerger S, Ko MS, Dey SK. Silencing or amplification of endocannabinoid signaling in blastocysts via CB1 compromises trophoblast cell migration. *J Biol Chem* 2012; 287: 32288-32297.
336. Moghadam KK, Kessler CA, Schroeder JK, Buckley AR, Brar AK, Handwerger S. Cannabinoid receptor I activation markedly inhibits human decidualization. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 65-74.

337. Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 63-77.
338. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agro A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; 275: 13484-13492.
339. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 1999; 276: H2085-2093.
340. Abán C, Leguizamon GF, Cella M, Damiano A, Franchi AM, Farina MG. Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: effects on nitric oxide synthesis. *Placenta* 2013; 34: 67-74.
341. Maccarrone M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. *J Biol Chem* 2003; 278: 13318-13324.
342. Gasperi V, Fezza F, Spagnuolo P, Pasquariello N, Maccarrone M. Further insights into the regulation of human FAAH by progesterone and leptin implications for endogenous levels of anandamide and apoptosis of immune and neuronal cells. *Neurotoxicology* 2005; 26: 811-817.
343. Gasperi V, Ceci R, Tantimonaco M, Talamonti E, Battista N, Parisi A, Florio R, Sabatini S, Rossi A, Maccarrone M. The fatty acid amide hydrolase in lymphocytes from sedentary and active subjects. *Med Sci Sports Exerc* 2014; 46: 24-32.
344. Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol* 2009; 16: 624-632.
345. Jackson AR, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Anandamide attenuates Th-17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity response by triggering IL-10 production and consequent microRNA induction. *PLoS One* 2014; 9: e93954.
346. Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 2009; 60: 85-92.
347. Hegde VL, Hegde S, Cravatt BF, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: involvement of regulatory T cells. *Mol Pharmacol* 2008; 74: 20-33.
348. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. *FEBS J* 2013; 280: 1918-1943.

349. Pulgar VM, Yamaleyeva LM, Varagic J, McGee CM, Bader M, Dechend R, Howlett AC, Brosnihan KB. Increased angiotensin II contraction of the uterine artery at early gestation in a transgenic model of hypertensive pregnancy is reduced by inhibition of endocannabinoid hydrolysis. *Hypertension* 2014; 64: 619-625.
350. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811.
351. Bouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 2001; 103: 423-428.
352. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 2002; 90: 1087-1092.
353. Scohy S, Gabant P, Szpirer C, Szpirer J. Identification of an enhancer and an alternative promoter in the first intron of the alpha-fetoprotein gene. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 3743-3751.
354. Gotoda T, Kinoshita M, Ishibashi S, Inaba T, Harada K, Shimada M, Osuga J, Teramoto T, Yazaki Y, Yamada N. Skipping of exon 14 and possible instability of both the mRNA and the resultant truncated protein underlie a common cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1376-1381.
355. O'Neill JP, Rogan PK, Cariello N, Nicklas JA. Mutations that alter RNA splicing of the human HPRT gene: a review of the spectrum. *Mutat Res* 1998; 411: 179-214.
356. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL, Meyers DA, Blecker ER. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105: 1879-1882.
357. Swartz CD, Afshari CA, Yu L, Hall KE, Dixon D. Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 441-450.
358. Byers MJ, Zangl A, Phernetton TM, Lopez G, Chen DB, Magness RR. Endothelial vasodilator production by ovine uterine and systemic arteries: ovarian steroid and pregnancy control of ERalpha and ERbeta levels. *J Physiol* 2005; 565: 85-99.

359. Lehrer S, Sanchez M, Song HK, Dalton J, Levine E, Savoretti P, Thung SN, Schachter B. Oestrogen receptor B-region polymorphism and spontaneous abortion in women with breast cancer. *Lancet* 1990; 335: 622-624.
360. Forman MR, Cantwell MM, Ronckers C, Zhang Y. Through the looking glass at early-life exposures and breast cancer risk. *Cancer Invest* 2005; 23: 609-624.
361. Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, Geurts van Kessel CH, van Meurs JB, Nijhuis RL, van Leeuwen JP, de Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA* 2004; 291: 2969-2977.
362. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 562-566.
363. Pober JS, Min W. Endothelial cell dysfunction, injury and death. *Handb Exp Pharmacol* 2006: 135-156.
364. Chan JC, Cheung JC, Stehouwer CD, Emeis JJ, Tong PC, Ko GT, Yudkin JS. The central roles of obesity-associated dyslipidaemia, endothelial activation and cytokines in the Metabolic Syndrome--an analysis by structural equation modelling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 994-1008.
365. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001; 81: 1143-1152.
366. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knofler M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 812-822.
367. Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, Hertwig K, Coulam CB, August C, Lea R, Dudenhausen JW, Gorczynski RM, Levy GA, Clark DA. Activation of the novel prothrombinase, fg12, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46: 196-210.
368. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 2002; 23: 375-378.
369. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.

370. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
371. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1028-1032.
372. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, Witkin SS, MAP Study Group. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 116: 152-156.
373. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Houry S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004; 189: 2057-2063.
374. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002; 52: 373-376.
375. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347: 185-192.
376. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Lebreton D, Ollivier V, de Prost D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e61-64.
377. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso M, Hoffmann E, Franceschi C, Caruso C. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; 292: 2339-2340.
378. Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, Joosten LA, van Riel PL, van den Berg WB. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 999-1001.
379. Minorette P, Gazzaruso C, Vito CD, Emanuele E, Bianchi M, Coen E, Reino M, Geroldi D. Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2006; 391: 147-149.

380. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Herczyk WF, Howell DN, Reinsmoen NL, Schwartz DA. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 628-632.
381. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.
382. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarski EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184: 640-642.
383. Yang IA, Holloway JW, Ye S, Southampton Atherosclerosis Study G. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 187-190.
384. Reismann P, Lichy C, Rudofsky G, Humpert PM, Genius J, Si TD, Dorfer C, Grau AJ, Hamann A, Hacke W, Nawroth PP, Bierhaus A. Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J Neurol* 2004; 251: 853-858.
385. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003; 197: 1787-1791.
386. von Aulock S, Schroder NW, Gueinzus K, Traub S, Hoffmann S, Graf K, Dimmeler S, Hartung T, Schumann RR, Hermann C. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis* 2003; 188: 938-943.
387. Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 2003; 278: 174-179.
388. van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, Voorbij HA, Bruinse HW, Roest M. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS One* 2008; 3: e1865.
389. Xie F, Hu Y, Speert DP, Turvey SE, Peng G, Money DM, Magee LA, von Dadelszen P, Toxaemia Study Group. Toll-like receptor gene polymorphisms and preeclampsia risk: a case-control study and data synthesis. *Hypertens Pregnancy* 2010; 29: 390-398.

390. Franchim CS, Sass N, Mattar R, Pendeloski KP, Lin LH, Torloni MR, Daher S. Inflammatory mediators gene polymorphisms in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2011; 30: 338-346.

8. Saját közlemények jegyzéke

8.1. 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 szérumban 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).

8.2. 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 praeeclampsziával 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, Vásárhelyi 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, Vásárhelyi 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, Szijszák 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, Vásárhelyi 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, Vásárhelyi 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.

8.3. 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

9. 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

10. 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.