

Immunológiai tényezők vizsgálata praeeclampsiában

Doktori értekezés

Dr. Halmos Amrita

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molvarec Attila Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Éva Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Wappler Edina, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Paulin Ferenc, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Keltai Katalin Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Siklós Pál, az orvostudomány kandidátusa,
osztályvezető főorvos

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1. A terhességi hypertonia klinikai jelentősége	7
1.2. A terhességi hypertoniák osztályozása	7
1.2.1. Krónikus hypertonia	7
1.2.2. Gesztációs hypertonia	8
1.2.3. Praeclampsia	8
1.2.4. HELLP-szindróma	9
1.3. A praeclampsiakór eredete és patogenezise	9
1.4. Immunológiai tényezők szerepe a praeclampsia kialakulásában	12
1.4.1. A természetes és adaptív immunrendszer szerepe terhességben	12
1.4.2. A regulátoros T sejtek szerepe terhességben és praeclampsiában	15
1.4.3. Az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció Praeclampsiában	17
1.4.4. Az akut fázis fehérjék és szerepük praeclampsiában	21
1.4.5. A komplement rendszer szerepe terhességben és praeclampsiában	24
2. CÉLKITŰZÉSEK	28
3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK	30
3.1. A tanulmányban részt vevők	30
3.2. A vérminták levétele, előkészítése és tárolása	31
3.3. Laboratóriumi módszerek	31
3.4. Statisztikai analízis	33
4. EREDMÉNYEK	34
4.1. Az AHSZG és CRP akut fázis fehérjék vizsgálata praeclampsiában	34
4.1.1. A betegek klinikai jellemzői	34

4.1.2. Egészséges terhes nők és praeclampsziás betegek szérumban α_2-HS glikoprotein és C-reaktív protein szintjének vizsgálata	37
4.1.3. A klinikai jellemzők és a szérumban CRP szintek viszonya a szérumban AHSG koncentrációkhoz praeclampsziában	38
4.1.4. A szérumban AHSG meghatározás diagnosztikus értéke praeclampsziában	40
4.2. A CD4+CD25magas Foxp3+ és aCD4+CD25-Foxp3+ regulátoros T sejtek gyakorisága egészséges terhesek és praeclampsziások perifériás vérében	41
4.2.1. A betegek klinikai jellemzői	41
4.2.2. A regulátoros T sejt populációk gyakorisága egészséges nem terhes és terhes nőkben és praeclampsziában	43
4.3. Keringő fikolin-2 és fikolin-3 vizsgálata egészséges terhességben és praeclampsziában	44
4.3.1. A betegek klinikai jellemzői	44
4.3.2. A fikolinok, komplement aktivációs termékek, angiogén faktorok, valamint az endothel aktiváció, endothel sérülés és a trophoblast-törmelék markereinek vizsgálata egészséges nem terhes és terhes nőkben, valamint praeclampsziában	46
4.3.3. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétereik, valamint fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjei közötti összefüggés	49
5. MEGBESZÉLÉS	51
5.1. AHSG és CRP szérumban koncentrációk változása praeclampsziában	51
5.2. A perifériás vérben található CD4+ CD25magas FoxP3+ és CD4+ CD25- FoxP3+ regulátoros T sejtek gyakorisága szövődménymentes terhességben és praeclampsziában	54
5.3. Keringő fikolin-2 és fikolin-3 szintek egészséges terhességben és praeclampsziában	56
6. KÖVETKEZTETÉSEK	60
7. ÖSSZEFOGLALÁS	61

8. SUMMARY	62
9. IRODALOMJEGYZÉK	63
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	80
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82

Rövidítések jegyzéke

A	dezoxiadenozin 5'-monofoszfát, dAMP
AFP	alfa-fetoprotein
AHSG	α_2 HS glikoprotein
ALT	alanin-aminotranszferáz
ANOVA	varianciaanalízis
APP	akut fázis fehérjék
AST	aszpartát-aminotranszferáz
AUC	a görbe alatti terület (area under curve)
BMI	testtömeg index
C	dezoxicitidin 5'-monofoszfát, dCMP
CI	megbízhatósági tartomány (konfidencia intervallum)
CR	komplement receptor
CRH	corticotropin-releasing hormon
CRP	C-reaktív protein
CTL	citotoxikus T-lymphocyta
DAF	decay accelerating factor
DIC	disszeminált intravaszkuláris koaguláció
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
G	deoxiguanozin 5'-monofoszfát, dGMP
GCS	granulocyta kolóniastimuláló faktor
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
HELLP	haemolysis, emelkedett májenzim értékek, alacsony thrombocytaszám
HLA	humán leukocyta antigén
IDO	indolamin 2,3-dioxigenáz
IEBR	idő előtti burokpedés
IF	impakt faktor

IL	interleukin
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor 1
IL-1ra	IL-1 receptor antagonist
IUGR	intrauterin növekedési retardatio
KIR	killer immunoglobulin-like receptor
LDH	laktát-dehidrogenáz
MAC	membrane attack complex
MASP	MBL-asszociált szerin proteáz
MBL	mannóz-kötő lektin
MCP	membrán kofaktor protein
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
NK sejt	természetes ölósejt
OR	esélyhányados
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAPP-A	terhességhez kötött plazma protein-A
PE	praeclampsia
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejtjei
PCR	polimeráz láncreakció
PIGF	placentaris növekedési faktor
RNS	ribonukleinsav
ROC	Receiver Operating Characteristic
sFlt-1	szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1
SRY	Y kromoszóma szex-determináló régió
T	dezoxitimidin 5'-monofoszfát, dTMP
Treg	regulátoros T sejt
TBG	tiroxin-kötő fehérje
TGF-β	transzformáló növekedési faktor- β
Th	T helper sejt
TNF-α	tumor nekrosis faktor- α
TPA	szöveti plazminogén aktivátor
VEGF	vascularis endothelialis növekedési faktor
VWF:Ag	von Willebrand faktor antigén

1. Bevezetés

1.1.A terhességi hypertonia klinikai jelentősége

A terhességi magas vérnyomással járó állapotok napjainkban is a vezető anyai halálokok közé tartoznak a fejlett és a fejlődő országokban egyaránt. A terhességek mintegy 6-8 %-a szövődik magas vérnyomással, és ez jelentősen hozzájárul az anyai mortalitás és morbiditás emelkedéséhez, mivel a magas vérnyomásban szenvedő várandósoknál gyakrabban alakulnak ki akár halálhoz vezető szövődmények is, mint abruptio placentae, DIC, agyvérzés, máj- és veseelégtelenség [1]. Az Amerikai Egyesült Államokban az embólia okozta betegségek után a magas vérnyomással járó terhességi betegségek jelentik a második leggyakoribb anyai halálozási okot, az anyai mortalitás 15 %-a terhességi magas vérnyomással járó betegségekhez köthető [2]. A fejlett országokban a terhességi magas vérnyomással járó betegségek, így a praeclampsia incidenciája is folyamatos emelkedést mutat, ami nagy valószínűséggel összefüggésbe hozható a predisponáló tényezők, úgy mint a krónikus magas vérnyomás, elhízás, cukorbetegség emelkedő prevalenciájával, illetve azzal, hogy a terhesség vállalása a fejlett országokban egyre későbbi anyai életkorra tolódik [3, 4]. Bár napjainkban is intenzív kutatás tárgya, a terhességi magas vérnyomások oka még mindig ismeretlen, így sem a betegségek előrejelzésében, sem megelőzésében, de kezelésében sem rendelkezünk még megfelelő módszerekkel.

1.2. A terhességi hypertoniák osztályozása

A terhességi magas vérnyomással járó állapotok osztályozásának jelentősége abban rejlik, hogy a különböző csoportokba sorolt betegségek különböző anyai és magzati szövődményekkel járhatnak, azok kezelése illetve prognózisa is eltérő.

1.2.1. Krónikus hypertonia

Krónikus hypertoniáról beszélünk a terhesség előtt is fennálló, valamint a terhesség 20. hete előtt diagnosztizált magas vérnyomás esetén. Magas vérnyomásról akkor

beszélünk, ha két alkalommal legalább 6 óra, de legfeljebb egy hétkülönbséggel ≥ 140 Hgmm szisztolés és/vagy ≥ 90 Hgmm diasztolés vérnyomást mérünk. Továbbá utólag krónikus hipertonia diagnózisát állíthatjuk fel, amennyiben a magas vérnyomás terhesség alatt kerül felismerésre, és a szülés után 12 héttel is fennmarad.

1.2.2. Gestatiós hipertonia

Amennyiben a terhesség 20. hete után proteinuria nélkül jelentkező magas vérnyomást találunk, azt gesztációs hypertóniának nevezzük. Az ebbe a csoportba sorolt várandósok közül néhányánál később a terhesség folyamán praeclampsia alakulhat ki, vagy a magas vérnyomás a szülés után is fennmaradhat, ekkor azonban utólag más csoportba soroljuk a betegeket (praeclampsia, illetve krónikus hipertonia). Amennyiben praeclampsia nem alakul ki, és a vérnyomás a szülés után 12 héttel visszatér a normál tartományba, átmeneti terhességi hypertóniáról beszélünk.

1.2.3. Praeclampsia

A praeclampsia terhességre specifikus multiszisztémás szindróma, mely a terhesség 20. hete után lép fel. Tekintettel szerteágazó tünettanára és máig nem teljesen tisztázott kórereditére, a praeclampsia definíciója folyamatosan változott az elmúlt évek során. Jelenleg legelfogadottabb diagnosztikai kritériumai a következők: praeclampsiaaként definiáljuk a korábban normotenziós asszonyok esetén a 20. terhességi hét után fellépő magas vérnyomást, amelyet proteinuria kísér. A magas vérnyomás diagnosztikai kritériumát előzőleg ismertettük. Proteinuria diagnózisát pedig $\geq 0,3\text{g}/24$ óra fehérjeürítés, illetve a vizelet tesztsíkon észlelt $\geq 1+$ fehérje esetén állítottuk fel, amennyiben húgyúti fertőzés nem állt fenn.

Eclampsiaról akkor beszélünk, ha praeclampsias asszonynál más okkal nem magyarázható tonicus-clonicus görcsroham lép fel.

Praeclampsia kialakulhat krónikus hypertóniában szenvedő várandósok esetén, ezt ráarakódásos praeclampsianak nevezzük. Ez esetben mind az anyai, mind a magzati szövődmények prognózisa rosszabb, mint akár krónikus hipertonia, akár normotenziós terhesben kialakuló praeclampsia esetén. A ráarakódásos praeclampsia diagnózisa kihívás a klinikus számára. Ráarakódásos praeclampsia kell gondolnunk, amennyiben proteinuria jelentkezik olyan terhesnél, akinél a terhesség 20. hete előtt csak magas

vérnyomást észleltünk, proteinuriát nem. Azon várandósoknál, akiknél a terhesség 20. hete előtt is fennállt proteiuria a magas vérnyomás mellett, ráakódásos praeclampsia kialakulására hívhatja fel a figyelmet a hirtelen súlyosbodó proteinuria, a hirtelen emelkedő vérnyomás, az újonnan kialakuló thrombocytopenia illetve az ALT és AST szintek emelkedése [1].

1.2.4. HELLP-szindróma

A HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count)-szindrómajellemzői a microangiopathiás haemolysis, az emelkedett májenzim értékek és az alacsony thrombocytaszám[5]. Diagnosztikai kritériumai Sibai szerint[6]: szérumban aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitás >70 U/l, szérumban laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás >600 U/l és thrombocytaszám <100 G/l. A legalacsonyabb perinatalis thrombocytaszám alapján a HELLP-szindrómát 3 csoportra oszthatjuk (Mississippi-klasszifikáció): súlyos (1. típus: thrombocytaszám ≤50 G/l), középsúlyos (2. típus: 51-100 G/l) és enyhe (3. típus: 101-150 G/l) thrombocytopeniával járó formára.

1.3. A praeclampsia kóreredete és patogenezeise

A praeclampsia kóreredete és patogenezeise napjainkban is folyamatos kutatás tárgyát képezi, ennek ellenére a kialakulás pontos folyamata még mindig nem teljesen tisztázott. Egyes vélemények szerint nem is feltétlenül egy betegségről van szó, és a későbbiekben lehetséges, hogy etiológia és lefolyás szerint több, eddig egységesen a praeclampsia alá sorolt szindrómát fogunk megkülönböztetni [7, 8].

A legújabb kutatások alapján valószínűnek látszik, hogy a szindróma kialakulása két úton lehetséges, az egyik nagy csoportot a „placentáris”, a másikat az „anyai” kóroki tényezők uralják [9].

A placentáris praeclampsia preklinikai és klinikai stádiumokra osztható. A preklinikai stádiumban a méhlepény nem megfelelő kialakulása, a placentáris vérellátás zavara az eredendő probléma.

Egészséges terhességben az extravillosus cytotrophoblastok már a terhesség 6. hetétől áthatolnak az anyai decidua spirális artériáinak falán [10], ahol a terhesség 9. hetéig „trophoblast dugót” képeznek [11, 12], amely megvédi az organogenesis alatt

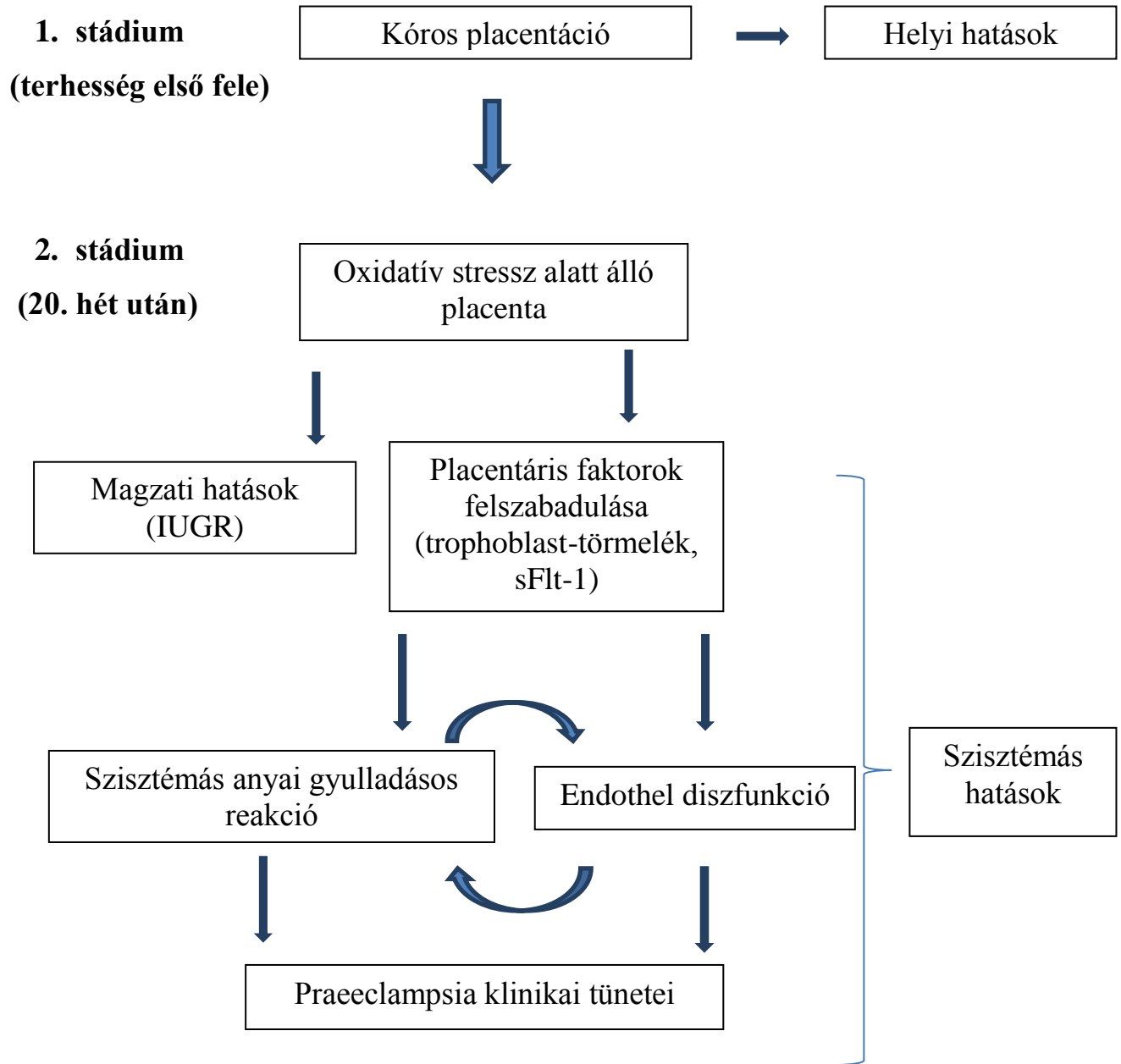
kifejezetten érzékeny embriót a szabad gyökök által okozott teratogén károsodástól. A terhesség 9-12. hete között az uteroplacentáris erek rekanalizálódnak, aminek következtében a placentáris oxigenizáció fokozódik, erre utalnak az oxidatív stressz hirtelen megjelenő markerei is [12]. A 12. hét után a cytotrophoblastok inváziója a spirális artériák átalakulásához vezet, melynek során elvesztik simaizom rétegüket, ami az artériák nagymértékű dilatációját okozza. A cytotrophoblastok a spirális artériák falában és belfelszínén is megjelennek, ezáltal pseudoendotheliumot hozva létre [10]. Ez a folyamat a 20. hétre lényegében lezajlik, ezáltal az uteroplacentáris keringés vaszkuláris kapacitása igen nagy fokban megnövekszik.

Placentáris praeclampsia esetén a trophoblast invázió és a spirális artériák átalakulása nem a megfelelő módon és ütemben zajlik, így az uteroplacentáris keringés kapacitása elmarad a szükségesétől [13], ami a későbbiekben praeclampsia tünetei mellett méhenbelüli magzati retardációhoz is vezethet.

A kóros placentáció hátterében a legújabb kutatások immunológiai okokat feltételeznek, melyek lényege, hogy az anya és a magzat közötti immunológiai kapcsolat nem kielégítő, a cytotrophoblast sejtek nem kapják meg az anyai deciduális immunsejtektől azokat a jeleket, melyek szükségesek a fent leírt korai placentáris folyamatok lezajlásához [14, 15].

A praeclampsia kétlépcsős modellje (1. ábra) szerint a kóros korai placentáció következtében az oxidatív stressznek kitett, diszfunkcionális placentából a terhesség későbbi szakaszában olyan faktorok kerülnek az anyai keringésbe, melyek a praeclampsia klinikai tüneteinek kialakulásához vezetnek. Feltételezések szerint a placentából oxidatív stressz hatására felszabaduló „trophoblast törmelék” erősen gyulladáskeltő hatású, felszabadulásuk hatására a szervezetben generalizált szisztémás gyulladással alakul ki, amely endothel diszfunkcióval jár együtt [16]. A kóros placentáció nem minden esetben vezet praeclampsiahoz, és nem is tekinthető a praeclampsia egyedüli okának, azonban igen erős predisponáló faktorként fogható fel a praeclampsia kialakulása szempontjából.

„Anyai” praeclampsia esetén a praeclampsia nem a kóros placentáció miatt, hanem olyan anyai alapbetegségek talaján alakul ki, melyekre szintén szisztémás gyulladással reagáló jellemző, mint a magasvérnyomás, az elhízás, a cukorbetegség és bizonyos autoimmun betegségek[8].



1. ábra A preeclampsia kialakulásának kétlépcsős modellje [17]

1.4. Immunológiai tényezők szerepe a praeclampsia kialakulásában

Az anya és magzata közötti immunológiai kapcsolat már a múlt század közepe óta foglalkoztatja a kutatókat. A magzatot sokáig „allografi”-ként tekintették, amelynek kilökődését az anyai immunrendszer szupprimált állapota és a magzati antigénprezentáció hiánya akadályozta volna meg [18].

Mára paradigmaváltás történt a terhességre adott anyai válaszról alkotott elképzelések tekintetében, az új elképzelések szerint az immunrendszer adaptív ágának szupprimáltsága mellett a nem-specifikus, természetes ág fokozott aktivitása figyelhető meg [19].

1.4.1. A természetes és adaptív immunrendszer szerepe terhességben

Az immunrendszer két fő rendszerből, a természetes (nem specifikus) és az adaptív (specifikus) ágból áll, melyek mind sejtes, mind humorális komponenseket tartalmaznak (1. táblázat).

1. táblázat

Sejtes és humorális komponensek a természetes és adaptív immunrendszerben [19]

Komponens	Természetes	Adaptív
Sejtes	monociták/makrofágok granulocyták NK sejtek hízósejtek $\gamma\delta$ T sejtek	T és B sejtek
Humorális	komplement akut fazis fehérjék MBL	antitestek

Az adaptív rendszer sokkal intenzívebb kutatás tárgya, mivel alapvető szerepe van a fertőzések leküzdésében. A természetes immunrendszert eddig primitívebbnek, kevésbé jelentősnek tartották, ám most úgy tűnik, mégis ennek a rendszernek lehet döntő szerepe az egyik legalapvetőbb immunológiai kihívást jelentő feladat megoldásában, az emberi terhességben. Lényege, hogy úgy váljon lehetővé a magzat elleni reakció megakadályozása, hogy közben a fertőzések elleni védelem is megfelelő maradjon.

Ez részben úgy valósulhat meg, hogy a syncytiotrophoblast nem expresszál MHC I (HLA-A és HLA-B) és II molekulákat, a cytotrophoblaston expresszált nem klasszikus antigének viszont az uterinális NK sejtekkel [20] és T limfocitákkal kölcsönhatásba kerülve jelentős szerepet töltenek be a terhesség fenntartásában [21]. Bizonyos placentáris termékek, mint a progeszteron, a PGE₂ és egyes citokinek, mint az IL-4 és IL-10 koraterhességben szupprimálják a Th1 választ [22, 23], ami szintén a terhesség fennmaradását szolgálja.

Emellett viszont a természetes immunrendszer fokozott szisztémás aktivitását találták terhességben. Az első trimesztertől kezdve a granulocita- és monocitaszám emelkedése jellemző, valamint a keringő mono- és granulociták aktivált fenotípusai jelennek meg nagyobb számban egészséges terhességben is [24]. Leírták a monocita fagocitózis fokozódását, valamint egyes, az akut fázis reakcióra jellemző szolubilis faktorok plazmaszintjének emelkedését is. Ezzel szemben az NK sejtek citotoxikus aktivitásának és IFN- γ termelésének csökkenését találták [20] (2. táblázat).

2. táblázat
A természetes immunrendszer változása terhességben [19]

Anyai keringés	
Monociták	↑ számuk
	↑ fagocitózis
	↑ MCP-1 termelés
	↑ IL-12 termelés
	↑ felszíni CD-14, CD-11b, CD-64
	↑ intracellularis ROS
	↑ plazma neopterin
	↑ plazma TNF- α
Granulociták	↑ számuk
	↑ fagocitózis
	↑ felszíni CD-14, CD-11b, CD-64
	↑ intracellularis ROS
	↑ ALP
	↑ plazma laktoferrin
	↑ plazma elasztáz
NK sejtek	↓ számuk
	↓ citotoxicitás
	↓ IFN- γ termelés
Komplement rendszer	↑ C1q, C3, C4, C4d faktor
Akut fázis fehérjék	↓ albumin
	↑ globulin
	↑ cöruoplazmin
	↑ α 1-antitripszin
	↑ fibrinogén
	↑ VII, VIII, X alvadási faktor
$\gamma\delta$ T sejtek	Nincs adat

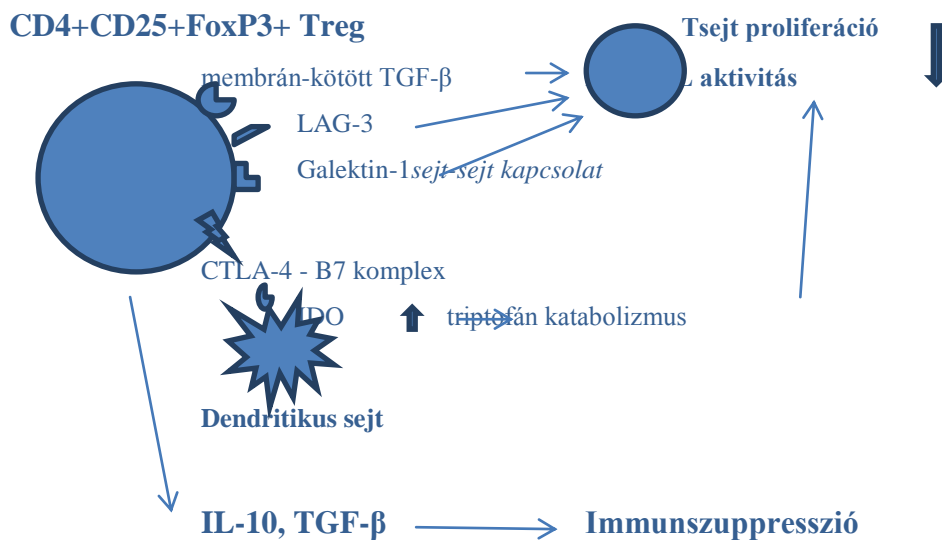
1.4.2. A regulátoros T sejtek szerepe terhességben és praeeclampsziában

A beágyazódás időszakában, amikor az anyai szervezet kapcsolatba kerül az embrionális eredetű sejtekkel, kulcsfontosságú immunológiai folyamatok zajlanak le, melyek megakadályozzák az anyától immunológiailag félig idegen magzat károsodását. Ennek egyik alapja, hogy a syncytiotrophoblastok nem expresszálnak klasszikus MHC I és II. osztályba tartozó molekulákat, viszont az extravillosus cytotrophoblastok expresszálnak MHC I. osztályba tartozó HLA-C, HLA-E és HLA-G antigéneket, melyek az uterinális NK sejtek specifikus ligandjai [25]. A decíduális NK sejtek számos citokint és angiogén faktort termelnek, melyek elősegítik a trophoblast proliferációt és differenciációt. Viszont az NK sejteknek a magzati és trophoblast sejtek ellen irányuló citotoxikus aktivitását a HLA-G-t és HLA-C-t felismerő killer immunoglobulin-like receptorok (KIR) gátolják. Így az NK sejtek felé irányuló aktiváló és gátló szignálok megfelelő egyensúlyának jelentős szerepe van a terhesség fennmaradásában [26].

A koraterhességi immunszabályozás fontos tényezői a T sejtek is, melyek az NK sejtek mellett nagy számban vannak jelen a beágyazódás helyszínén, a decídua basálisban. A T sejteket citokin termelésük alapján több alcsoportba soroljuk. A Th1 sejtek a sejtes immunitás, a Th2 sejtek a humorális immunitás részei, mindkét csoport az immunrendszert aktiváló hatással rendelkezik. Ezzel szemben a Th3 sejtek, melyek főleg immunszuppresszív hatású TGF- β -t termelnek, valamint a Tr1 sejtek, melyek főként a szintén immunszuppresszív hatású IL-10-et termelik, az immunrendszer szabályozásában vesznek részt. Terhességben a Th1/Th2 egyensúly a Th2 dominancia felé tolódik el.

A legújabb kutatások szerint a CD4⁺ CD25⁺ regulátoros T sejteknek kiemelkedő szerepe van a terhesség fenntartásában. A CD4⁺T sejteken belül három alcsoport különíthető el, a CD4⁺ CD25⁻, a CD4⁺ CD25^{magas} és a CD4⁺ CD25^{alacsony} csoportok. A CD4⁺ sejtek legspecifikusabb markere a FoxP3 transzkripciós faktor, mely a legtöbb CD4⁺ CD25⁺ és a CD4⁺ CD25⁻ sejtek kis részén is expresszálódik. Továbbá a FoxP3 expressziója szuppresszív funkciókat indukál perifériás CD4⁺ CD25⁻ T sejteken [27]. A CD4⁺ CD25⁺ sejtek közül a CD4⁺ CD25^{magas} sejtek rendelkeznek jelentős szabályozó tulajdonságokkal, a CD4⁺ CD25^{alacsony} sejtek viszont nem. A CD4⁺ CD25^{magas} sejtek eddigi tudásunk szerint

három módon fejtenek ki immunreguláló hatást. Az első a sejt-sejt interakció, melynek hatására a konvencionális T sejtek DNS szintézise gátlás alá kerül, csökken a T sejt proliferáció, a citotoxikus T lymphocita (CTL) és az NK sejt aktiváció. Ebben a membrán-kötött TGF- β -nak, Lag-3-nak és galektin-1-nek tulajdonítanak fontos szerepet [28]. A második út lényege, hogy a Treg-ek által termelt TGF- β és IL-10 citokinek gátolják a T sejt aktivációt. A harmadik mechanizmus szerint pedig a CD4⁺ CD25⁺ sejtek által expresszált CTLA-4 a dendritikus sejtek és a makrofágok indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) expresszióját indukálja. Az IDO enzim fontos immunreguláló hatással rendelkezik, jelenlétében a triptofán katabolizmusa miatt a CTL és NK sejt aktivitás csökken [29, 30] (2. ábra).



2.ábra A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek immunregulátoros hatásai [31]

A legújabb vizsgálatok alapján a CD4⁺ CD25^{magas} Treg alcsoport tovább osztható aktivált (CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3^{magas}) és nyugvó (CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3^{alacsony}) regulátoros T sejtekre. Mindkét alcsoport szuppresszív, de eltérnek proliferációs dinamikájukban és válaszkészségükben. A teljesen differenciált aktivált Treg sejtek válaszkészsége nagyobb, azonban gyorsabban pusztulnak el, míg a nyugvó Treg sejtek válaszkészsége limitált, de képesek proliferálni és fokozott FoxP3 expressziójú aktivált Treg sejtekké alakulni [32].

A praeclampsziára jellemző szisztémás gyulladós reakció kialakulásában a Th1 és Th2 sejtek egyensúlyának felborulása, a Th1 dominancia mellett a regulátoros T sejtek prevalenciájának változása is szerepet játszik [33, 34]. Mint tárgyaltuk, a Treg sejteknek a gyulladós válasz kialakulásának gátlásában van jelentős szerepe. A normálnál alacsonyabb Treg frekvencia a praeclampsziásokra jellemző túlzott szisztémás válaszhoz vezethet. Több kutatócsoport alacsonyabb perifériás Treg prevalenciát igazolt praeclampsziában az egészséges terhességben mérthez képest [35, 36].

1.4.3. Az anyai szisztémás gyulladós válaszreakció praeclampsziában

Mint korábban tárgyaltuk, egészséges terhességre jellemző egy enyhe szisztémás anyai gyulladós válasz, a természetes immunrendszer fokozott aktivitása, ez azonban praeclampsziában még kifejezettebb. A legújabb elképzelések szerint így a praeclampsia klinikai tünetei akkor alakulnak ki, amikor ez a szisztémás gyulladós folyamat az anyai szervekben, szervrendszerekben dekompenzációhoz vezet [37].

A korai placentáció már korábban leírt zavara miatt a nem megfelelően átalakult spirális artériákon nagynyomású puzatilis áramlással kerül a vér az intervillósus térbe. Az oxigenizáció folyamatos, gyors változása és a hidrosztatikus stressz végső soron placentáris hypoxiához, oxidatív stresszhez és endothel károsodáshoz vezet [38], és az ennek hatására a placenta syncicialis felszínéről az anyai vérbe kerülő gyulladáskeltő faktoroknak alapvető szerepe lehet a szisztémás gyulladós válasz kialakulásában. A placenta syncicialis felszínén igen gyakori a synciciotrophoblastok apoptosisa, melynek során jelentős mennyiségű apoptotikus törmelék és sejt kerül a vérbe [39]. Az oxidatív stressznek kitett trophoblastok esetén fokozott az apoptosisa, ezért ilyen esetekben még több trophoblast-törmelék szabadul fel, és kerül a keringésbe. Intenzív kutatás tárgya, hogy pontosan mely faktoroknak van döntő szerepe a gyulladós válasz kialakulásában. Fontos szerepet tulajdonítanak a syncicialis membrán mikrovezikuláknak, melyeknek endothel károsító és neutrophil aktiváló, gyulladáskeltő hatásuk van [40]. A trophoblast-törmeléken kívül azonban számos más faktor, melyeknek keringő plazmaszintjét emelkedettnek találták praeclampsziában, szerepe is

felmerül a szisztémás gyulladással válasz kialakításában, ilyenek a CRH, bizonyos növekedési faktorok, az activin-A és a leptin.

Emellett megfigyelték, hogy a szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) szérumszintje emelkedik, míg a szabad placentaris növekedési faktor (PlGF) és vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) szérumszintjei csökkennek praeclampsiában [41]. Az sFlt-1 a VEGF-hez és PlGF-hez kötődik, és inaktiválja azokat. Mivel azonban a VEGF és PlGF magas szintje szükséges az endothel megfelelő állapotának fenntartásához, ezek megkötése, csökkent szintje endothel diszfunkció kialakulásához vezet [41].

A fenti faktorok által elindított szisztémás gyulladással válaszban a gyulladással immunsejteken kívül részt vesz az alvadási- és komplement rendszer, az endothelium, és jellemzőek rá bizonyos metabolikus változások is. A szisztémás gyulladás által kiváltott reakciót akut fázis reakciónak nevezzük, melynek részei bizonyos keringő plazmaproteinek szintjének változásai, láz, anémia, leukocytosis és metabolikus változások, melyek főleg a májat és a zsírszövetet érintik [42] (3. táblázat). Praeclampsiában számos akut fázis fehérje plazmaszintjének változását figyelték meg, melyről a későbbiekben részletesen írunk.

Mint korábban volt róla szó, egészséges terhességben is jellemző a leukocytosis, valamint a neutrophil granulocyták fokozott aktivációja, ez praeclampsiában még kifejezettebb [43].

A metabolikus változásokban a centrális zsírszövetnek meghatározó szerepe van, mivel a zsírsejtek jelentős mennyiségű gyulladáskeltő citokint termelnek, főleg TNF- α -t, IL-6-ot, PAI-1-t, valamint leptint. Ezek a citokinek inzulin rezisztenciát és lipolízist indukálnak, a lipogenezist viszont gátolják, ezzel a keringő szabad zsírsavak mennyiségének növekedését eredményezik [44].

3. táblázat

A szisztémás gyulladási rendszer fokozott aktivitása praeeclampsiában egészséges terhességhez képest

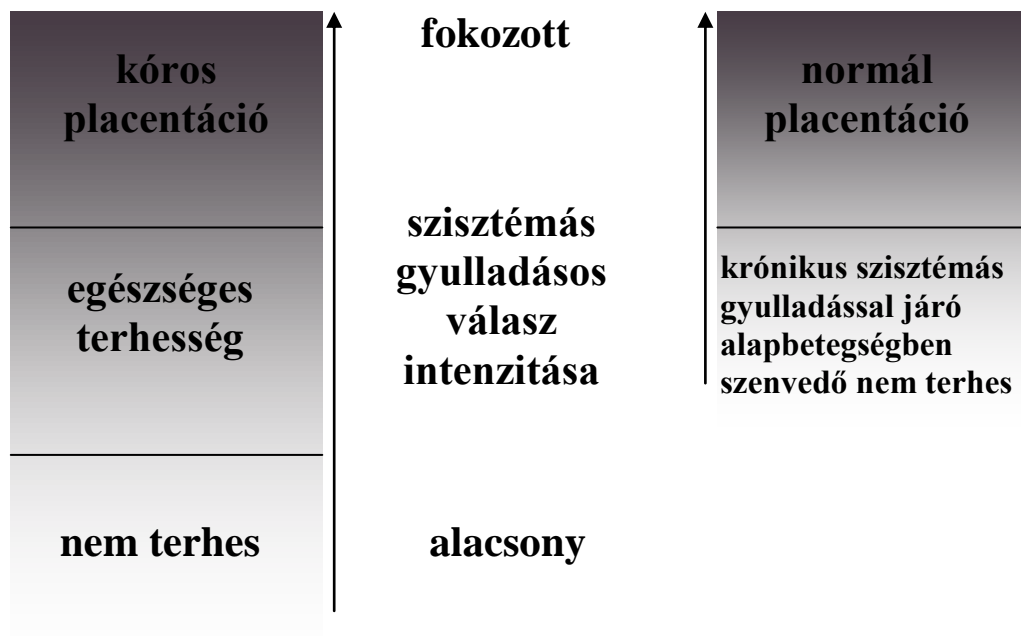
Gyulladásos markerek	Referenciák
<i>Általános gyulladási markerek</i>	
Leukocytosis	Terrone és mtsai[45]
Fokozott leukocyta aktiváció	Sacks és mtsai[24]
Komplement aktiváció	Haeger és mtsai[46]
Alvadási rendszer fokozott aktivitása	Perry és Martin[47]
Thrombocyta aktiváció	Konijnborg és mtsai[48]
Endothel aktiváció markerei	Taylor és mtsai[49]
Oxidatív stressz markerei	Gratacos és mtsai[50]
Hypertrigliceridaemia	Hubel és mtsai[51]
<i>Gyulladáskeltő citokinek</i>	
TNF- α	Vince és mtsai[52]
IL-6	Greer és mtsai[53]
IL-8	Stallmach és mtsai[54]

A legújabb kutatások szerint tehát a praeclampsia tulajdonképpen felfogható az egészséges terhességben is fennálló szisztémás gyulladással járó fokozott formájaként, ebből érthető az is, hogy miért lehetetlen a praeclampsia kialakulását egyetlen okkal, tényezővel magyarázni.

Arra is kellő magyarázatot ad a fenti teória, hogy miért alakul ki gyakrabban praeclampsia a már korábban fennálló, egyébként is szisztémás gyulladással járó betegségek esetén, mint a metabolikus X szindróma részeként is jelentkező elhízás, cukorbetegség, krónikus magas vérnyomás (3. ábra).

Placentáris praeclampsia

Anyai praeclampsia



3. ábra A szisztémás gyulladással járó válasz intenzitásának és a praeclampsia kialakulásának összefüggése [17]

1.4.4. Az akut fázis fehérjék és szerepük praeclampsziában

Az akut fázis reakció, mely neve ellenére krónikus is lehet, a szervezet válasza a lokális vagy szisztémás gyulladásra. Erre számos, akut fázis fehérjének nevezett plazmafehérje koncentrációjának változása jellemző (4. táblázat), de része több fiziológiai, biokémiai, viselkedésbeli és nutricionális változás is (5. táblázat).

4. táblázat

Humán akut fázis fehérjék plazmakoncentrációjának változása gyulladós reakció során [42]

Plazmaszint emelkedést mutató fehérjék

Komplement rendszer

C3, C4, C9, Faktor B, C1 inhibitor, C4b-kötő protein, MBL

Alvadási és fibrinolitikus rendszer

fibrinogén, plazminogén, TPA, urokináz, Protein S, vitronectin, PAI-1

Antiproteázok

α_1 proteáz inhibitor, α_1 antichymotrypsin, inter- α -trypsin inhibitorok

Transzport fehérjék

cöruoplazmin, haptoglobin, hemopexin

Gyulladós válasz szereplői

szekretált foszfolipáz-A₂, lipopoliszacharid-kötő fehérje, IL-1ra, GCS

További fehérjék

CRP, amiloid-A, α_1 acid glikoprotein, fibronektin, ferritin, angiotenzinogén

Plazmaszint csökkenést mutató fehérjék

Albumin, transzferrin, transztiretin, AHSG, AFP, TBG, IGF-1, XII. faktor, retinol-kötő fehérje

5. táblázat

Az akut fázis reakció részei [42]

Neuroendokrin változások

Láz, aluszékonyosság, étvágytalanság

CRH, kortikotropin és kortizol fokozott elválasztása

Arginin vazopresszin fokozott elválasztása

IGF-1 csökkent termelése

Mellékvese fokozott katekolamin elválasztása

Haemopoetikus változások

Vérszegénység

Leukocytosis

Thrombocytosis

Anyagcsere változások

Izomtömeg csökkenése, negatív nitrogén egyensúly

Csökkent glukoneogenezis

Csontritkulás

Fokozott lipogenezis a májban

Fokozott lipolízis a zsírszövetben

Csökkent lipoprotein lipáz aktivitás az izom-és zsírszövetben

Cachexia

Változások a májban

Fokozott metallothionein, NOS, hem oxigenáz, mangán superoxid dizmutáz, metalloproteináz-1 szöveti inhibitor termelés

Csökkent foszfoenolpiruvát karboxikináz aktivitás

Változások a nem fehérje természetű plazma alkotókban

Hipocinkémia, hipoferrémia, hiperurikémia

Csökkent plazma retinol és emelkedett glutation koncentráció

Akut fázis fehérjeként definiáljuk azokat a fehérjéket, melyek plazmakoncentrációja legalább 25%-kal emelkedik (pozitív APP) vagy csökken (negatív APP) a szervezetben zajló gyulladás során. Jelentős koncentrációváltozások várhatóak fertőzések, trauma, sebészeti beavatkozások, égések, szöveti infarktus valamint daganatos betegségek kapcsán, de nagyfokú testedzés, szülés, pszichiátriai megbetegedések, illetve hőterhelés kapcsán is megfigyeltek mérsékelt változásokat. Az APP-eket legnagyobbbrészt a hepatocyták termelik, termelésüket az aktivált makrofágokból és monocitákból felszabaduló citokinek szabályozzák. A legtöbb APP termelésének fő stimulátora az IL-6, de az IL-11, a leukemia gátló faktor, az onkosztatin M, a ciliáris neurotrop faktor és a kardiotropin 1 is hasonló hatásokkal rendelkezik. A citokinek kaszkádként és hálózatban együttműködve serkentik az APP-k termelését.

A legismertebb APP a CRP, amely a természetes immunrendszer részeként közreműködik az idegen patogének felimerésében, a fagocitákhoz kötődve a célsejtek megsemmisítését is mediálja, valamint a komplement rendszert aktiváló hatása is ismert. Emellett a monociták gyulladáskeltő citokin és szöveti faktor termelését is stimulálja. Ezzel szemben ismertek gyulladáscsökkentő hatásai is, hiszen a neutrophil granulociták endothelhez való kötődését gátolja, és serkenti az IL-1 receptor antagonistá termelését. Az amiloid-A feltehetően a fagociták és limfociták adhéziójának és kemotaxisának fokozásán keresztül fejti ki hatását. Több APP, mint a MBL és a GCS a komplement rendszer részeként játszik szerepet a gyulladásos reakcióban. Más APP-knek viszont gyulladáscsökkentő hatása van, ilyenek a haptoglobin, a hemopexin, melyek a reaktív oxigén gyökök ellen védenek, az α_1 -antichymotrypsin és az α_1 -proteáz inhibitor, melyek a proteolitikus enzimek működését antagonizálják, valamint a fibrinogén, mely az endothelsejt adhéziót és proliferációt serkenti.

Az α_2 -Heremans–Schmid (α_2 -HS) glikoprotein (fetuin-A, AHSG) a marha fetuin humán homológja, egy nagyrészt a májsejtek által termelt plazmafehérje, mely a cisztein proteináz inhibitorok cisztatin “szupercsaládjába” tartozik [55]. Az AHSG azon kevés negatív akut fázis fehérjék közé tartozik, melyeknek szintézise a májban csökken az akut fázis reakció során [56]. A fehérjének számos biológiai funkciója van, úgymint az osteogenesis és csontresorptio szabályozása, a felesleges mineralizáció megelőzése, valamint az inzulin receptor autofoszforylációjának és tirozin kináz aktivitásának gátlása [57, 58]. Emellett serkenti a fagocitózist és rendelkezik opszonin tulajdonságokkal is

[59]. Érdekes, hogy a magzatban különösen magas az AHSG vérszintje és szöveti expressziója, így feltételezhető, hogy részt vesz a szövetek kifejlődésében, ahogyan más fajoknál a fetuin [60].

Praeclampsziában a korábban már tárgyalt szisztémás gyulladáshoz akut fázis reakciót vált ki, ennek részeként a CRP, az angiotenzinogén, a fibrinogén, a plazminogén, és számos komplement komponens: C3, α_1 -antitripszin, valamint a cöroloplazmin, a foszfolipáz A2, a szialinsav és az α_1 -acid glikoprotein szintjének emelkedését írták le praecclampsziás betegek plazmájában. Ezzel szemben például a negatív APP-ként ismert albumin szintjének csökkenését találták [44, 61].

1.4.5. A komplement rendszer szerepe terhességben és praecclampsziában

A komplement rendszernek központi szerepe van a természetes immunitásban, de az adaptív immunrendszert szabályozó hatása is ismert. A komplement rendszer mintegy 30 plazma és sejt membrán fehérjéből áll, melyek kölcsönhatása következtében kaszkádszerű aktivációs folyamat alakul ki. A komplement aktiváció elengedhetetlen a szervezet immunvédekezéséhez, azonban kontrollálatlan, nem megfelelő aktiválódása számos betegség kialakulásában játszik szerepet, mint számos kardiovaszkuláris megbetegedés, glomerulonephritis, haemolitikus uraemiás szindróma, angiooedéma, rheumatoid arthritis, psoriasis, sepsis, akut pancreatitis. Ebből érthető, hogy igen lényeges a komplement rendszer aktiválásában és szabályozásában részt vevő tényezők megismerése.

A komplement aktivációnak jelenleg három fő útja ismert. A klasszikus út akkor aktiválódik, ha a C1qantigén-kötő immunglobulinokhoz (IgG és IgM) vagy CRP-hez kötődik. Ezután a C4 és C2 hasítása során a klasszikus út C3 konvertáza, a C4b2b keletkezik. A lektin úton az MBL és fikolinok kötődése a mikroorganizmusok szénhidrát csoportjaihoz indítja el az aktivációs kaszkádot. A MASP-ok a C4 és C2 aktiválásán keresztül szintén a klasszikus út C3 konvertáza, a C4b2b keletkezéséhez vezetnek.

A fikolinok a természetes immunrendszer mintázatfelismerő molekulái, melyek a mikrobiális patogének, apoptotikus és nekrotikus sejtek felszínén található szénhidrátokhoz kötődnek. Két elkülönülő úton hatnak: a MASP (MBL-asszociált

szerin proteáz)-okkal együtt aktiválják a komplementrendszer lektin útját, valamint egy primitív opsonophagocytosis révén [62]. A fikolinok oligomer fehérjék, melyek egy cisztein-gazdag N-terminális régióból, egy kollagénszerű doménből és egy C-terminális globuláris fibrinogénszerű doménből állnak. Ez utóbbi felelős a szénhidrátok megkötéséért [63]. Emberben háromféle fikolint azonosítottak: fikolin-2 (L-fikolin), fikolin-3 (H-fikolin) és fikolin-1 (M-fikolin). A fikolin-2 mRNS-e elsődlegesen a májban expresszálódik, és fehérje terméke kiválasztódik a keringésbe. A fikolin-2 lektin aktivitást fejt ki az N-acetil-glükózamin felé és az 1,3- β -D-glükan felé. A fikolin-3 mRNS-e a májban és a tüdőben expresszálódik. A májban az epecsatornák hámsejtjei és a hepatocyták termelik a fikolin-3-at, majd az epébe és a keringésbe választódik ki. A tüdőben a fikolin-3-at a hörgőhámsejtek, valamint a II. típusú alveoláris hámsejtek termelik, és a bronchusokba és alveolusokba választódik ki. A fikolin-3 az N-acetil-glükózaminhoz, N-acetil galaktózaminhoz és a fukózhhoz kötődik. A fikolin-1 mRNS-e a monocitákban, a tüdőben és a lépben expresszálódik. Fehérje termékét a neutrofil granulociták és monocitákszekretoros granulumaiban, valamint a II. típusú alveoláris hámsejtekben azonosították. A keringésben azonban a fikolin-2-höz és -3-hoz viszonyítva nagyon alacsony szintjei mérhetők. A fikolin-1 az N-acetil-glükózaminhoz, N-acetil galaktózaminhoz és a szialsavhoz mutat kötődést[64].

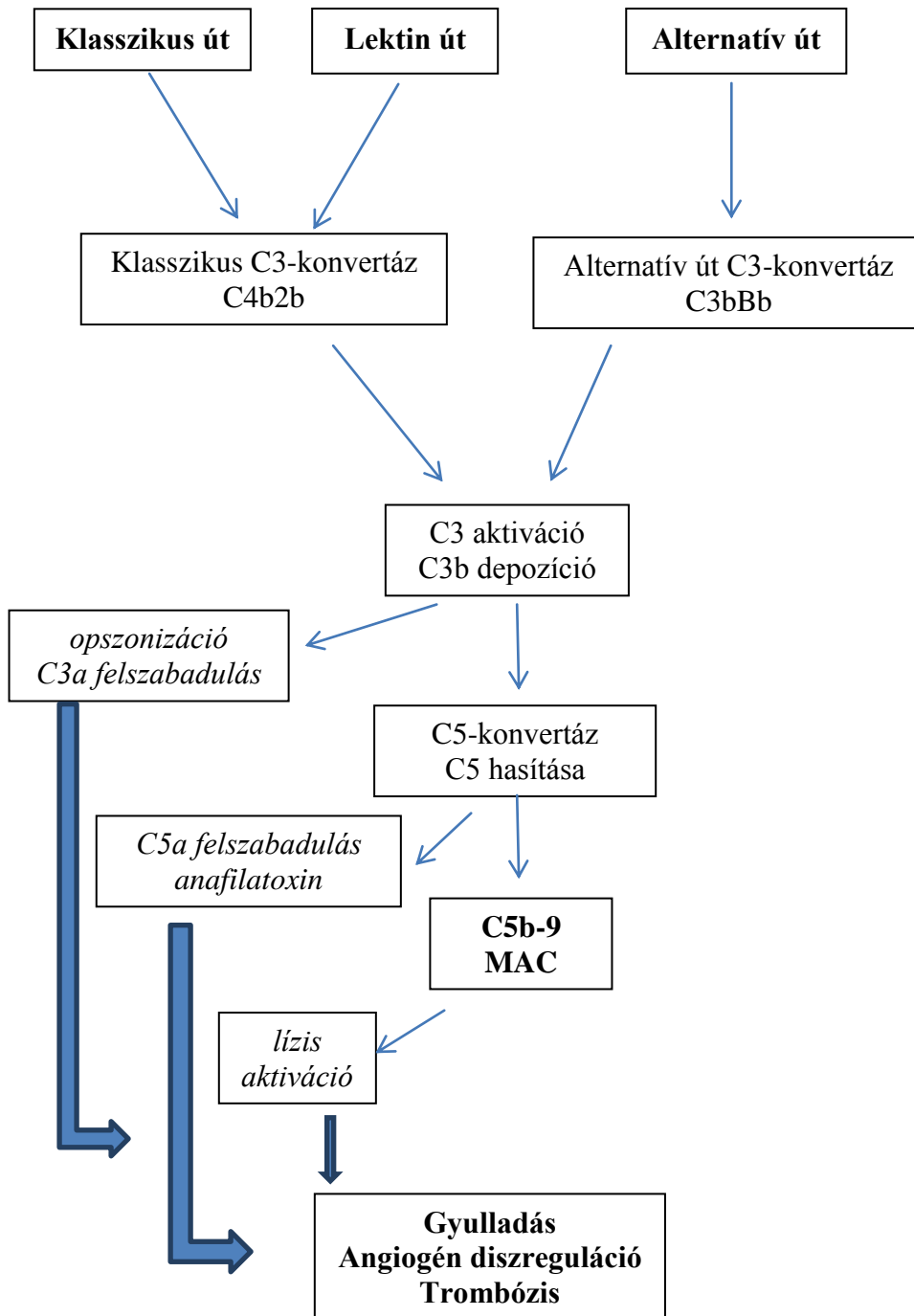
Az alternatív útra a C3 spontán folyamatos, alacsony szintű aktivációja jellemző a plazmában. Amennyiben C3b alakul ki, és az valamely komplement-aktiváló felszínhez kötődik, megkötheti a B faktort, melynek D faktor általi hasítását követően az alternatív út C3 konvertáza, a C3bBb jön létre. Ha properdin kötődik a C3b-hez, az stabilizálja a komplexet, és ez jelentős C3 konvertáz aktivitáshoz vezet. A végső út akkor aktiválódik, ha a C3b komplexet képez a C3 konvertázokkal, és két C5 konvertáz, a klasszikus út C4b2b3b-je és az alternatív út C3bC3bBb-je jön létre. Ezek a konvertázok a C5 hasításán keresztül egy C5b és egy anafilatoxin, a C5a keletkezéséhez vezetnek. A C5b-nek a C6, C7, C8 és C9 molekulákkal való kölcsönhatása vezet végül a C5b-9, más néven a MAC kialakulásához [65].

Az aktív komplement kaszkád végül több úton fejt ki hatását. A C1q, C3b, iC3b és C4b komplement fehérjék opsoninként működnek, tehát a célrészecskékhez kötődve azok komplement-receptor-mediált fagocitózisához vezetnek. Továbbá a komplement-opsonizált immunkomplexek a vörösvértestek felszínén lévő CR1 komplement

receptorhoz is kötődhetnek, ami a lépben és májban történő megsemmisítésükhöz vezet, illetve megakadályozza lerakódásukat a perifériás szövetekben. A komplement aktiváció két anafilatoxin, a C3a és a C5a képződéséhez is vezet, melyeknek fontos szerepe van a gyulladásos folyamatokban. Számos citokin és adhézions molekula expresszióját és felszabadulását indukálják, emellett kemoattraktánsként szolgálnak a fehérvérsejtek számára, valamint fokozzák a vaszkuláris permeabilitást. A C5b-9 (MAC) a sejtmembránokon pórusokat hoz létre, és a nem-magvas célsejtek, mint a vörösvértestek és baktériumok líziséhez vezet. Érdekes módon a magvas sejtek több módon is védekeznek a C5b-9 által mediált lízis ellen, és a C5b-9 hatására citokineket és növekedési faktorokat termelnek, melyek végső soron proliferációjukhoz vezetnek. Végül a C3d, mely a C3b inaktív formájának is tekinthető, a CR2-höz kötődve a B lymphocyták antitest termelésének növekedését okozza [65] (4. ábra).

Mint korábban tárgyaltuk, egészséges terhességben is jellemző a komplement rendszer bizonyos elemeinek fokozott aktivitása. Egészséges terhességben a C3, C4 és CH50 szérumszintje akár 10-50%-os emelkedést is mutathat, továbbá az aktivált komplement fragmentumok: C3a, C4a, C5a magasabb szérumszintje is jellemző a nem terhesekehez képest [66, 67]. Komplement aktivációs termékeket találtak a deciduában, a chorionbolyhokon és subendothelialis lerakódásokként az érfalakban [68]. Azonban a túlzott komplement aktivációt a trophoblast membránon expresszálandó szabályozó fehérjék egészséges terhességben megakadályozzák [69]. Ezek a fehérjék a decay accelerating factor (DAF, CD55), a membrane cofactor protein (MCP, CD46) és a CD59. A DAF és az MCP a C3 aktivációját szabályozza, a CD59 pedig a C5b-9 MAC terminális komplex létrejöttét gátolja [70].

Praeclampsia esetén az élettani terhességhez képest is magasabbnak találták a komplement rendszer aktiváltságát. A Bb, C3a és C5b9 MAC plazmaszintjének az egészséges terhességhez képest praeclampsziában megfigyelt további emelkedése már régóta ismert [71], ami mind a klasszikus, mind az alternatív út aktivációjára utal. A legújabb kutatások pedig azt találták, hogy a praeclampsziás placentában a C5b-9 MAC komplexek nagyobb számban voltak jelen, mint egészséges placenta esetén [72].



4. ábra A komplement rendszer [69], [73]

2. Célkitűzések

1. A praeclampsia kóroki tényezői és patogenezise napjainkban is folyamatos kutatás tárgyát képezik, és a szindróma kialakulásának pontos folyamata még mindig nem kellően tisztázott. A legújabb kutatások szerint a praeclampsia kialakulása során a természetes és adaptív immunrendszer aktiválódásával az anyai szervezetben szisztémás gyulladós reakció jön létre, melynek része az akut fázis reakció. Ennek során a pozitív akut fázis fehérjék plazmaszintje nő, míg a negatív akut fázis fehérjék plazmaszintje csökken. Ezért célunk volt, hogy nagyszámú egészséges terhes, valamint praeclampsiás beteg bevonásával meghatározzuk a keringésben található negatív akut fázis fehérje (AHSG) és pozitív akut fázis fehérje (CRP) koncentrációját. Megvizsgáltuk viszonyukat a vizsgálatban résztvevők klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, valamint vizsgáltuk az AHSG diagnosztikus értékét praeclampsiában.
2. A terhességre specifikus immuntolerancia kialakulásában az immunrendszer aktivációját szabályozó sejteknek, ezen belül a regulátoros T sejteknek jelentős szerepe van. Mivel a praeclampsiára jellemző folyamatok során az immunrendszer természetes és adaptív ága is fokozottabban aktiválódik az egészséges terhességhez képest, feltételezhető, hogy ebben a regulátoros T sejtek csökkent száma és funkciózavara is szerepet játszhat. A Treg sejtek immunreguláló szerepe azonban a különböző alcsoportok között is eltér. Ezért vizsgálatunk során meghatároztuk a CD4+ CD25- FoxP3+Treg alcsoport perifériás gyakoriságát, és annak CD4+ CD25magas FoxP3+Treg alcsoporttal való korrelációját egészséges és praeclampsiás terhesek illetve nem terhes nők esetén. Szintén meghatároztuk az aktivált CD4+ CD25magas FoxP3magas Treg alcsoport arányát a Treg sejteken belül.
3. Az anyai szisztémás gyulladós válasz során az immunrendszer természetes ágának aktiválódásával a komplement rendszer is aktiválódik. Ezért tanulmányunk során megmértük egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsiás várandósok szérumában a komplement aktiváció szabályozásában jelentős szerepet játszó fikolin-2 és fikolin-3 szinteket. Emellett meghatároztuk a komplement aktiváció termékeit (C4d, C3a, SC5b9), az angiogén faktorokat (sFlt-1, PlGF),

valamint az endothel aktiváció (von Willebrand faktor antigén), az endothel sérülés (fibronektin) és a trophoblast-törmelék(szabad magzati DNS) markereit és azok viszonyát a keringő fikolin szintekhez.

3. Beteganyag és módszerek

3.1. A tanulmány résztvevői

Eset-kontroll vizsgálatunkban 93 praeclampsias és 127 normotónias, egészséges, szövődménymentes terhességet viselő grávida részvételével vizsgáltuk a szérum AHSZ és CRP koncentrációkat, a plazma fikolin koncentrációkat vizsgáló tanulmányunkban 60 praeclampsias, 60 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nőt vizsgáltunk, illetve a regulátoros T sejtek gyakoriságának vizsgálatában 20 praeclampsias, 20 egészséges terhes és 12 egészséges nem terhes nő vett részt. A vizsgált pácienseket a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának és a Kútvölgyi Klinikai Tömb Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályának páciensei közül választottuk. Az összes páciens a kaukázusi rasszba tartozott és Magyarország ugyanazon földrajzi régiójában lakott. A vizsgálatból kizártuk a többes terhességet viselőket, a krónikus hipertóniában, diabetes mellitusban, autoimmun betegségben, angiopathiában, vesebetegségben, anyai vagy magzati fertőzésben szenvedőket és a magzati fejlődési rendellenességgel szövődött terhességeket. A vérvétel minden páciensnél éhgyomor mellett történt, egyik terhesnél sem volt megindult szülés vagy burokpedés észlelhető. Az egészséges nem terhes nők a menstruációs ciklus korai follikuláris fázisában voltak (a 3. és 5. ciklusnap között), és egyikük sem alkalmazott hormonális fogamzásgátlást.

Praeclampsiaaként definiáltuk az emelkedett vérnyomást (≥ 140 Hgmm szisztolés és/vagy ≥ 90 Hgmm diasztolés vérnyomás ≥ 2 alkalommal legalább 6 óra különbséggel), mely a 20. terhességi hét után lépett fel korábban normotóniásterhesek esetén, és amelyet szignifikáns proteinuria kísért (≥ 0.3 g/24 óra vagy $\geq 1+$ tesztcsíkon húgyúti fertőzés nélkül). A szülést követő 12 héten belül az összes páciens vérnyomás értéke visszatért a normál tartományba. Súlyosnak tekintettük a praeclampsiaát, ha az alábbi feltételek közül bármelyik fennállt: ≥ 160 Hgmm szisztolés vagy ≥ 110 Hgmm diasztolés vérnyomás, vagy ≥ 5 g/24h (vagy $\geq 3+$ tesztcsíkon) proteinuria. Eclampsiaában vagy HELLP-szindrómában szenvedők nem kerültek beválasztásra. Korai kezdetű praeclampsiaának tekintettük a 34. terhességi hét előtt (betöltött 20. és 33. terhességi hét között) kialakuló praeclampsiaát. Méhenbelüli növekedési retardációt akkor

diagnosztizáltunk, ha az újszülött születési súlya a magyar születési súlypercentilis adatok alapján a terhességi kor és nem szerinti 10 percentilis érték alatt volt.

A vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta, és minden páciensről részletes tájékoztatás után írásos beleegyezést kaptunk. A kutatást a Helsinkii Egyezményben foglaltaknak megfelelően végeztük.

3.2. A vérminták levétele, előkészítése és tárolása

Az anyai vérmintákat alkari vénából vettük natív, EDTA-s és nátrium-citrátos kémcsövekbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), majd szobahőmérsékleten 10 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszókat a mérések elvégzéséig -80 Celsius fokon tároltuk.

A regulátoros T sejtek meghatározásához lítium-heparinos csövekbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) történt a vérvétel.

3.3. Laboratóriumi módszerek

A szérum CRP és AHSZ koncentrációk meghatározásának menete:

A szérum CRP koncentrációkat ultraszenzitív, latex szemcsékkel érzékenyített immunturbidimetriás eljárással mértük 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. A detekciós küszöb 0.07 mg/l, míg az intra/inter-assay variabilitás 6.2 és 142 mg/l átlagértékeknél 1.8/2.9%, illetve 1.5/2.7% volt.

Az AHSZ szérumszinteket radiális immundiffúziós módszerrel mértük meg, kecske anti-humán α_2 -HS glycoprotein IgG frakció (DiaSorin Inc., Stillwater, Minnesota, USA, Cat. No. 81931) alkalmazásával. A standard koncentrációk meghatározására egészséges véradók kevert plazmáját használtuk. Az intra/inter-assay variabilitás 3.6/6.2% volt.

A regulátoros Tsejtek meghatározásának menete:

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) lítium-heparinos csőbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) levett friss vérből sűrűség-grádiens centrifugálással (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Svédország, 27 perc, 400 g, 22 °C) izoláltuk. A sejteket foszfát-pufferelt sóoldattal kétszer átmostuk, majd RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) szuszpendáltuk.

A PBMC sejteket 4 °C-on 30 percig PE Cy7-konjugált CD4 és APC-konjugált CD25 monoklonális antitestekkel (PharMingen, San Diego, CA, USA) inkubáltuk. Mosás után a sejteket Fixációs/Permeabilizációs oldattal fixáltuk, majd Permeabilizációs Pufferrel kezeltük a gyártó előírásának megfelelően (eBioscience, San Diego, CA, USA). Ezután PE-konjugált FoxP3 monoklonális antitesttel (eBioscience) inkubáltuk 4 °C-on 30 percig. Mosást követően a sejteket BD FACSAria áramlási citométerrel (BD Biosciences) analizáltuk. 200000 sejtet rögzítettünk. A limfociták populációját a “Forward Scatter” és “Side Scatter” tulajdonságok alapján különítettük el a PBMC-n belül. Kontrollként izotípus-megfeleltetett PE-konjugált egér IgG1 antitestet használtunk (eBioscience). Az áramlási citometriás méréseink intra-assay variációs együtthatója 25% alatt volt.

A plazma fikolin koncentrációk meghatározásának menete:

A fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszinteket ELISA segítségével (Hycult Biotech, Uden, Hollandia, Cat. No.HK336 és HK340), automata ELISA analizátorral (Elisys UNO, Human GmbH, Wiesbaden, Németország), a használati útmutatónak megfelelően mértük meg. Az anyai plazma C4d, C3a és SC5b9 szintjeit Quidel ELISA kitekkel (San, Diego, California, USA, Cat.No. A008, A015 és A029) határoztuk meg.

A standard laboratóriumi paramétereket (klinikai kémia) automata analizátor segítségével gyári vizsgálati kitekkel határoztuk meg (Cobas Integra 800, Roche, Mannheim, Németország). A von Willebrand faktor antigén (VWF:Ag) plazmaszinteket ELISA(Dakopatts, Glostrup, Dánia), míg a plazma fibronectin koncentrációkat nephelometria (Dade Behring, Marburg, Németország) segítségével mértük meg a kitek gyártói leiratának megfelelően.

A szérum össz sFlt-1 és biológiailag aktív PIGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 05109523 és 05144671)útján határoztuk meg Cobas e 411-es analizátoron (Roche, Mannheim, Németország)[74, 75].

Fiú újszülöttek esetén az anyai plazmából szilícium-dioxid adszorpciós módszerrel kivontuk aDNS-t, ezt követően meghatároztuk a szabad magzati DNS mennyiségét az Y kromoszóma szex-determináló régiójának(SRY) kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciójával (PCR) [76]. A DNS-t 400 µl EDTA-val antikoagulált plazmából vontuk ki High Pure PCR TemplatePreparation Kit (Roche, Mannheim, Németország) segítségével, a gyártó előírásai alapján.A DNS-t 50 µl elúcióspuffer oldattal mostuk ki, amelyből 1 µl-t használtunk mintaként a PCRreakcióhoz.A SYBR Green valós idejű PCR analízishez a LightCycler 1.0 készüléket alkalmaztuk (Roche, Mannheim, Németország). A keringésben található fiú magzati DNS kimutatásához az SRYgén 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-on8 percig, amit 40 ciklus denaturáció (95°C-on5 másodpercig), annealing (60°C-on10 másodpercig)és láncszintézis (72°C-on15 másodpercig) követett, majd 4°C-ra történő hűtés zárt le.A plazmamintában jelenlévő szabad magzati DNS mennyiségének meghatározásához ismert koncentrációjú férfi genomiális DNS-el készítettstandard hígítási görbét használtunk.

3.4. Statisztikai analízis

A folyamatos változók eloszlását a Shapiro-Wilk-féle *W*-teszt segítségével határoztuk meg. Mivel a folyamatos változók nem mutattak normális eloszlást, nem-paraméteres statisztikai módszereket használtunk. A folyamatos változók két csoport közötti összehasonlítására Mann-Whitney-féle *U*-tesztet, míg több csoport közötti összehasonlítására Kruskal-Wallis-félevarianciaanalízistalkalmaztunk. Post-hoc

tesztként az átlagos rangszámok csoportok közötti többszörös összehasonlítását végeztük. A Fisher-féle egzakt tesztet és a Pearson-féle χ^2 tesztet használtuk a kategorikus változók csoportok közötti összehasonlítására. A korrelációs együtthatók kiszámítására a Spearman-féle rangszám korrelációs eljárást alkalmaztuk. A többszörös lineáris regressziós analízist, valamint a kovariancia analízist (ANCOVA) nem-paraméteres módszerként a függő változók logaritmikus transzformációja után végeztük el. Az esélyhányadosokat (odds ratio, OR) és 95% konfidencia intervallum értékeket (CI) logisztikus regressziós analízissel számítottuk ki. A szérum AHSG szint mérés diagnosztikus pontosságát Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe analízissel vizsgáltuk.

A statisztikai vizsgálatokhoz a következő szoftvereket használtuk: STATISTICA (8.0 változat; StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), Statistical Package for the Social Sciences (15.0 változat Windowsra; SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) és MedCalc Windowsra (10.0.1.0. változat; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Az összes statisztikai analízis esetén a $p < 0.05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

A folyamatos változók esetén az adatokat mediánként (interkvartilis tartomány), kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) tüntettük fel.

4. Eredmények

4.1. Az AHSZG és CRP akut fázis fehérjék vizsgálata praeclampsziában

4.1.1. A betegek klinikai jellemzői

A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőit a 6. táblázat mutatja. A két vizsgálati csoport között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az anyai életkor és a dohányosok, valamint a primiparák aránya tekintetében. A testtömeg index (BMI) és a terhességi kor a vérvételkor szignifikánsan magasabb volt a praeclampsziás csoportban, mint a kontroll csoportban. A szisztolés és a diasztolés vérnyomás szignifikánsan magasabb volt, míg a terhességi kor szüléskor, valamint az újszülöttek születési súlya szignifikánsan alacsonyabb volt a praeclampsziás csoportban a kontroll csoporthoz képest. Intrauterin növekedési retardációt nem találtunk a kontroll csoportban, míg a praeclampsziás csoportban ennek gyakorisága 22.6% volt.

6. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás betegek klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétereik

	Egészséges terhes nők (n=127)	Praeclampsziás betegek (n=93)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	28 (25-31)	28 (25-32)	NS ^a
BMI vérvételkor (kg/m ²)	26.0 (23.7-28.0)	29.4 (26.3-32.0)	<0.001 ^a
Dohányzás	2 (1.6%)	5 (5.4%)	NS ^b
Primiparitas	77 (60.6%)	59 (63.4%)	NS ^c
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	110 (105-120)	170 (160-180)	<0.001 ^a
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 (60-80)	104 (100-115)	<0.001 ^a
Terhességi kor vérvételkor (hét)	35 (31-37)	37 (35-39)	<0.05 ^a
Terhességi kor szüléskor (hét)	40 (39-40)	38 (35-39)	<0.001 ^a
Újszülött születési súlya (gramm)	3300 (3100-3800)	2900 (1980-3450)	<0.001 ^a
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	21 (22.6%)	<0.001 ^b
Szérum CRP szint (mg/l)	3.38 (1.69-7.27)	6.71 (2.76-12.69)	<0.001 ^a
Szérum α_2 -HS glikoprotein szint (μ g/ml)	744 (660-816)	660 (612-768)	<0.001 ^a

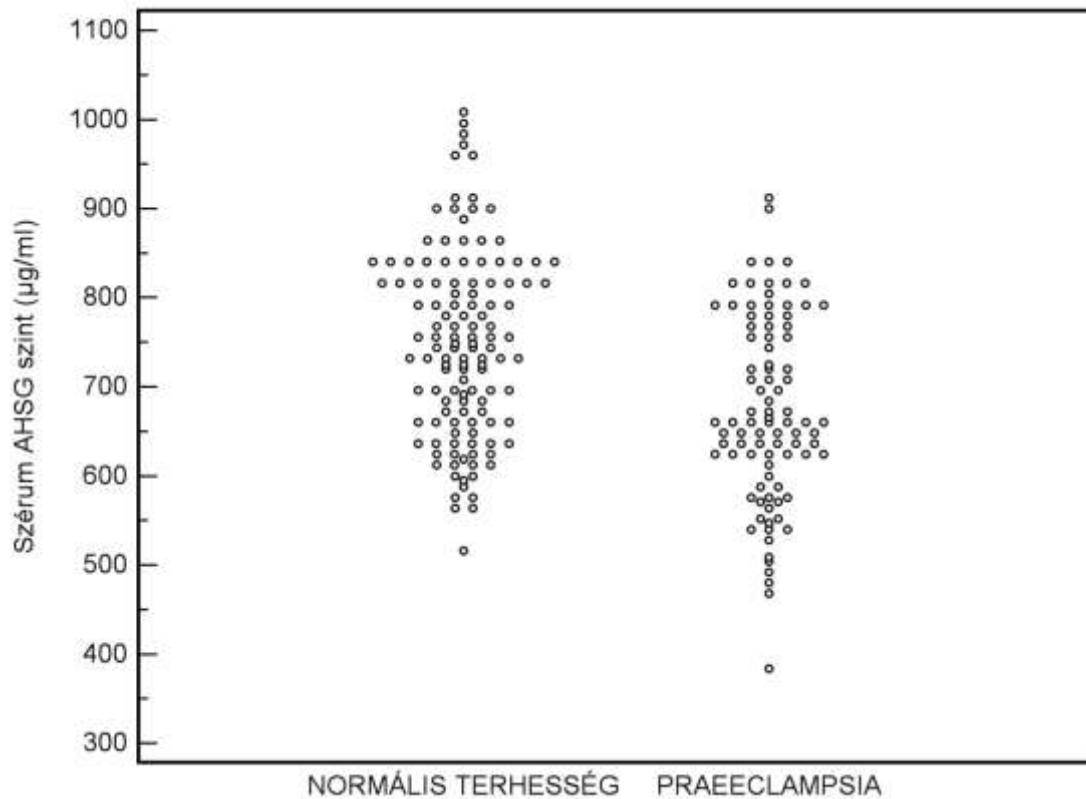
A folyamatos változók esetén az adatokat mediánként (interkvartilis tartomány), kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) tüntettük fel
NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index; CRP: C-reaktív protein

^a Mann-Whitney *U*-teszt

^b Fisher-féle egzakt teszt

^c Pearson-féle χ^2 teszt

4.1.2. Egészséges terhes nők és praeclampsziás betegek szérum α_2 -HS glikoprotein és C-reaktív protein szintjének vizsgálata



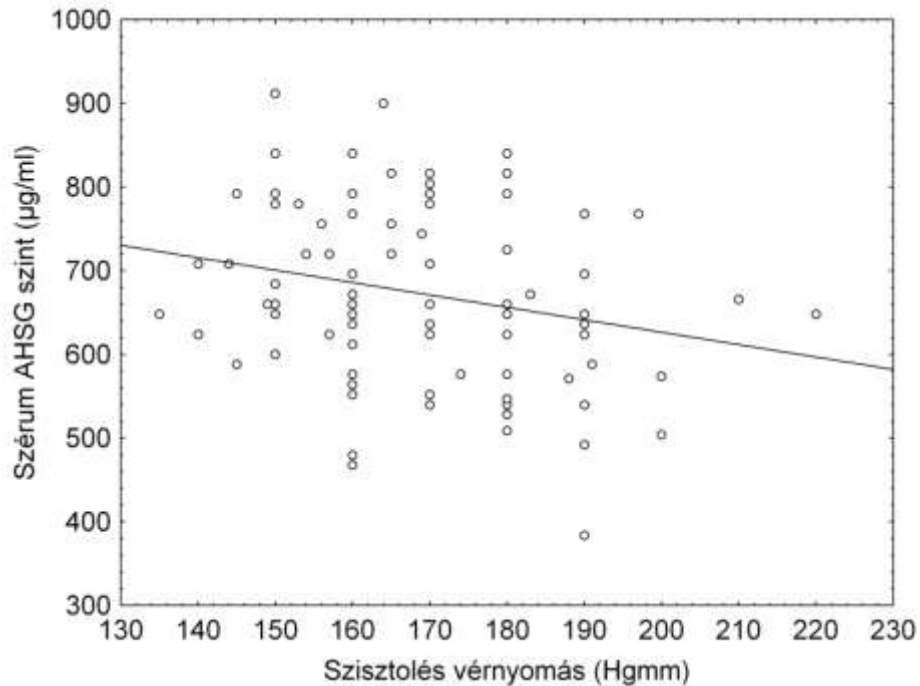
5. ábra Egészséges terhes nők és praeclampsziás betegek szérum α_2 -HS glikoprotein (AHSG) szintje pont diagramon ábrázolva

Amint a 6. táblázatban és az 5. ábrán látható, a szérum CRP szintek szignifikánsan magasabbak, míg a szérum AHSG koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a praeclampsziás betegek esetén, mint a normotóniás, egészséges terheseknél. A két csoport között az AHSG szintekben mért különbség azután is szignifikáns maradt, hogy kovariancia analízissel (ANCOVA) az anyai életkorra, BMI-re és a vérvételkori terhességi korra illesztettük azokat.

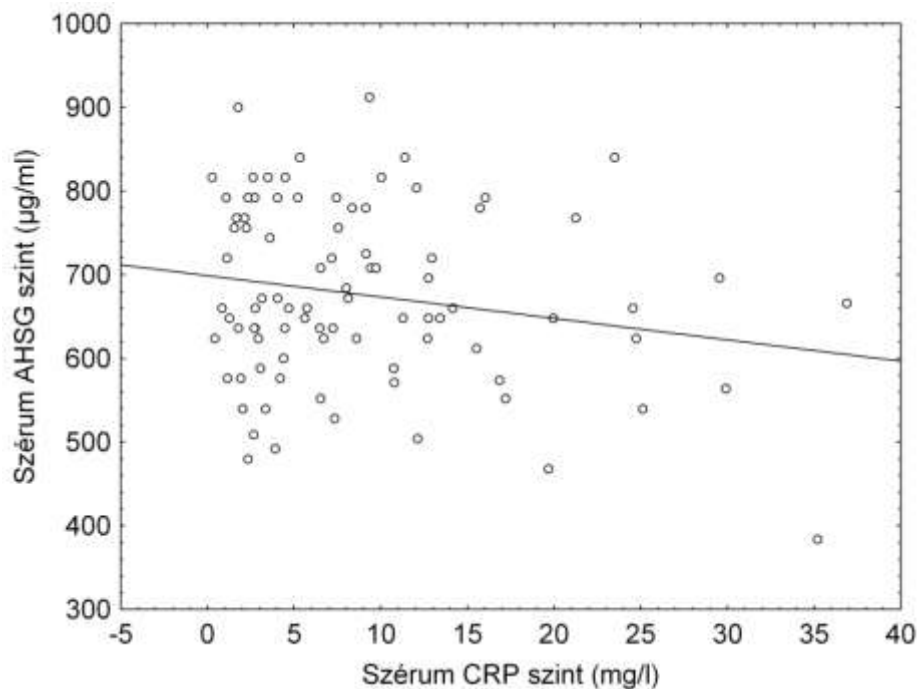
A praeclampsziás csoporton belül nem találtunk szignifikáns különbséget a szérum CRP és AHSG szintekben azon terhesek között, akiknél intrauterin növekedési retardáció fennállt, illetve nem volt megfigyelhető (medián (25-75 percentilis), CRP: 7.30 (2.80-14.24) versus 6.53 (2.74-12.69) mg/l; AHSG: 636 (574-720) versus 660 (624-780) μ g/ml).

4.1.3. A klinikai jellemzők és a szérumszintek összefüggése a szérumszintek AHSG koncentrációkkal praeclampsziában

A Spearman-féle rangszám korrelációs együttható (folyamatos változók) és a Mann-Whitney *U*-teszt (kategorikus változók) segítségével megvizsgáltuk, hogy a praeclampsziás terhesek esetén a klinikai jellemzők és a szérumszintek mutatnak-e összefüggést a szérumszintek AHSG koncentrációkkal. A praeclampsziás csoportban a szérumszintek AHSG szintek szignifikáns fordított korrelációt mutattak a szisztolés vérnyomással (Spearman $R=-0.23$, $p<0.05$; 6. ábra) és a szérumszintek CRP szintekkel (Spearman $R=-0.21$, $p<0.05$; 7. ábra). Ellenben az egyéb klinikai paraméterek (anyai életkor, dohányzás, paritás, BMI és terhességi kor vérvételkor, diasztolés vérnyomás, terhességi kor szüléskor, valamint az újszülöttek születési súlya) és a praeclampsziások szérumszintek AHSG szintjei között nem találtunk összefüggést.



6. ábra Praeclampsziás terhesek α_2 -HS glikoprotein (AHSG) szérumszintje a szisztolés vérnyomás függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0.23$, $p<0.05$)

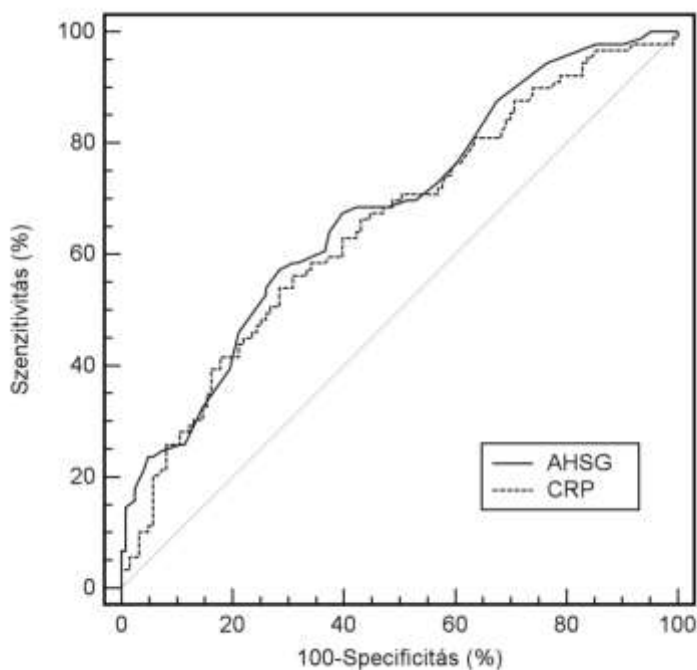


7. ábra Praeclampsziás terhesek α_2 -HS glikoprotein (AHSG) szérumszintje a szérumszintű C-reaktív protein (CRP) szintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0.21$, $p<0.05$)

4.1.4. A szérum AHSG meghatározás diagnosztikus értéke praeclampsziában

A Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe analízist használva megállapítottunk egy határérték AHSG koncentrációt (720 $\mu\text{g/ml}$), melynek segítségével 68.1%-os szenzitivitással és 60.8%-os specificitással elkülöníthetők a praeclampsziás betegek a normotóniás, egészséges terhesektől. Az alacsony AHSG szint (≤ 720 $\mu\text{g/ml}$) szignifikáns összefüggést mutatott a praeclampsziával (odds ratio, OR: 3.32, 95%-os konfidencia intervallum, CI: 1.88-5.86, $p < 0.001$), még az anyai életkorra, BMI-re és a vérvételkori terhességi korra többszörös logisztikus regressziós analízissel történő illesztést követően is (adjusztált OR (95% CI): 3.69 (1.82-7.51), $p < 0.001$).

Ezt követően összehasonlítottuk a szérum AHSG és CRP meghatározás diagnosztikus értékét praeclampsziában. Amint a 8. ábra mutatja, nem volt szignifikáns különbség a ROC görbe alatti területben az AHSG és CRP között (AUC AHSG-re és CRP-re (95% CI): 0.68 (0.61-0.74) és 0.65 (0.58-0.72), $p = 0.61$).



8. ábra A szérum α_2 -HS glikoprotein (AHSG, folyamatos vonal) és C-reaktív protein (CRP, szaggatott vonal) koncentráció Receiver Operating Characteristic (ROC) görbéje a praeclampsziás betegek és egészséges terhes nők elkülönítésére

4.2. A CD4+CD25magas FoxP3+és aCD4+CD25- FoxP3+regulátoros Tsejtek gyakorisága egészséges terhesek és praeclampsiások perifériás vérében

4.2.1. A betegek klinikai jellemzői

A vizsgálatban részt vevők klinikai jellemzőit a 7. táblázat mutatja. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a tanulmányban részt vevő csoportok életkorát és terhesség előtti testtömeg indexét illetően. Továbbá nem volt szignifikáns különbség a praeclampsiás és egészséges terhes nők között a vérvételkori terhességi korban és a primiparák előfordulási gyakoriságában. Azonban, ahogy azt a 10. táblázat is mutatja, a dohányzás gyakorisága, a szisztolés és diasztolés vérnyomás szignifikáns különbséget mutatott a három vizsgálati csoport között. A praeclampsiás csoportban szüléskor szignifikánsan alacsonyabb terhességi kort és születési súlyt észleltünk, mint az egészséges terhesek csoportjában. Az egészséges terheseknél intrauterin növekedési retardáció nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsiás csoportban 7 esetben fordult elő. Kilenc terhesnél alakult ki súlyos praeclampsia és 11 betegnél jelentkezett korai terhességi korban (<34. hét).

7. táblázat

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

	Egészséges nem terhes nők (n=12)	Egészséges terhes nők (n=20)	Praeclampsziás betegek (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)
Dohányzás	3 (25.0%)	0 (0%) ^a	2 (10.0%)
Primiparitas	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

A folyamatos változók esetén az adatokat mediánként (interkvartilis tartomány), kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) tüntettük fel

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 betegek versus egészséges terhes nők

^d p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

4.2.2. A regulátoros T sejt populációk gyakorisága egészséges nem terhes és terhes nőkben és praeclampsziában

Eredményeinket a 9. ábrán foglaltuk össze. A CD4+ CD25magas FoxP3+ sejtek gyakorisága alacsonyabb volt nem terhes nőkben, mint egészséges terheseknél, és magasabb volt egészséges terhesekben, mint praeclampsziásoknál (2.99 (2.41-3.48) % versus 5.02 (4.20-5.46) % versus 2.97 (2.23-3.40) %, $p < 0.001$; 9.a ábra).

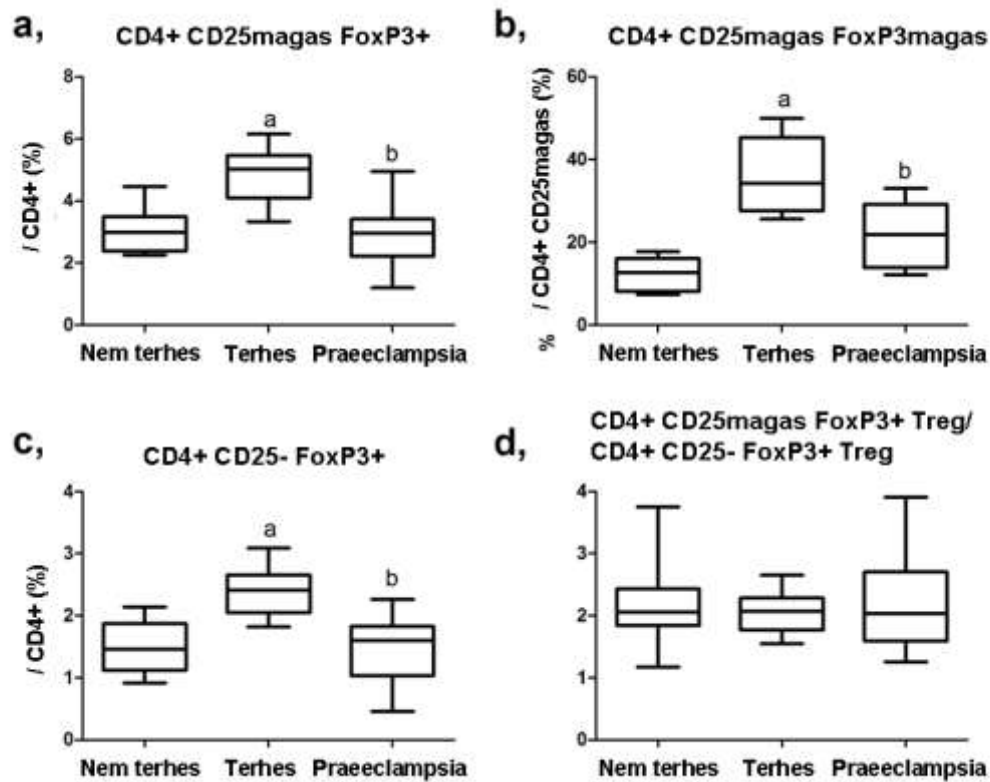
Az aktivált CD4+ CD25magas FoxP3magas Treg sejtek aránya a CD4+ CD25magas sejtek között szintén alacsonyabb volt nem terhes nőkben, mint egészséges terheseknél, és magasabb volt egészséges terhesekben, mint praeclampsziásoknál (12.60 (8.15-16.10) % versus 34.20 (27.60-45.35) % versus 21.90 (13.85-29.20) %, $p < 0.001$; 9.b ábra).

Hasonlóképp, a CD4+ CD25- FoxP3+ sejtek frekvenciája is magasabb volt egészséges terheseknél, mint nem terhes nőknél és praeclampsziásoknál (1.46 (1.17-1.76) % versus 2.41 (2.06-2.65) % versus 1.60 (1.05-1.80) %, $p < 0.001$; 9.c ábra).

A CD4+ sejteken belül a CD4+ CD25magas FoxP3+ és CD4+ CD25- FoxP3+ sejtek arányában, valamint a CD4+ CD25magas sejteken belül az aktivált CD4+ CD25magas FoxP3magas Treg sejtek arányában az egészséges terhesek és praeclampsziások között észlelt különbségek akkor is szignifikánsnak mutatkoztak, ha az adatokat kovariancia analízissel a vérévelkori terhességi korra illesztettük.

A praeclampsziásokon belül nem volt különbség a fenti Treg alcsoportok gyakoriságában korai vagy késői kezdetű praeclampsia esetén (korai praeclampsia: $n=11$), a praeclampsia súlyosságától függően (súlyos praeclampsia: $n=9$), illetve méhenbelüli növekedési retardáció jelenléte esetén ($n=7$).

Továbbá meghatároztuk a CD4+ CD25magas FoxP3+ és CD4+ CD25- FoxP3+ sejtek viszonyát mindhárom vizsgálati csoportunkban. Nem találtunk szignifikáns különbséget a két alcsoport arányában nem terhes, egészséges terhes és praeclampsziás nők között (9.d ábra).



9. ábra Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeeclampsias betegek perifériás vérében található CD4+ CD25magas FoxP3+ (a), CD4+ CD25magas FoxP3magas (b) és CD4+ CD25- FoxP3+ (c) regulátoros T sejtek (Treg) gyakorisága, illetve a CD25magas FoxP3+ és CD25- FoxP3+ Treg alcsoportok aránya (d)

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

^a $p < 0.001$ versus egészséges nem terhes nők

^b $p < 0.001$ versus egészséges terhes nők

4.3. Keringő fikolin-2 és fikolin-3 vizsgálata egészséges terhességben és praeeclampszában

4.3.1. A betegek klinikai jellemzői

A betegek klinikai jellemzőit a 8. táblázat foglalja össze. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a vizsgált csoportok között az életkor tekintetében. Továbbá nem volt szignifikáns különbség a vérévételkor terheségi kor, valamint a paritás

tekintetében a praeclampsziás betegek és az egészséges terhesek között. Ezzel szemben a 11. táblázatban szereplő összes többi klinikai jellemzőben szignifikáns különbség mutatkozott a vizsgált csoportok között. Az egészséges terhesek között nem fordult elő magzati növekedési retardáció, míg a praeclampsziás csoportban ennek előfordulása 18.3% volt. Súlyos praeclampsziát találtunk 21 terhesnél, 5 betegnél pedig korai praeclampszia alakult ki. A praeclampsziás csoportban a multiparák életkora (32 (29-35) vs. 28 (25-31) év, $p<0.001$) és terhesség előtti testtömegindexe (27.2 (25.5-29.0) vs. 23.1 (19.8-26.1) kg/m^2 , $p<0.05$) is szignifikánsan magasabb volt, mint a primiparáké.

8. táblázat Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek klinikai jellemzői

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (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}
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	n.a.	21.0 (19.5-22.6)	25.5 (21.6-28.1) ^d
Dohányzás	14 (23.7%)	0 (0%) ^b	3 (5.0%) ^a
Primiparitas	n.a.	37 (61.7%)	38 (63.3%)
Paritas	n.a.	1 (1-2)	1 (1-2)
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

A folyamatos változók esetén az adatokat mediánként (interkvartilis tartomány),

kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) tüntettük fel

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 betegek versus egészséges terhes nők

^d $p<0.001$ praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

4.3.2. A fikolinok, komplement aktivációs termékek, angiogén faktorok, valamint az endothel aktiváció, endothel sérülés és a trophoblast-törmelék markereinek vizsgálata egészséges nem terhes és terhes nőkben, valamint praeclampsziában

A vizsgált csoportok laboratóriumi paramétereit a 9. táblázat mutatja. Amint a táblázatban látszik, szignifikáns különbség mutatkozott a legtöbb vizsgált laboratóriumi paraméterben a három csoport között, kivéve a szérum aszpartát-aminotranszferáz aktivitást. Amint az 12.a és 12.b ábra mutatja, a fikolin-2 plazmaszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak egészséges terhesekben, mint egészséges nem terhesek esetén, míg a fikolin-3 szintek nem mutattak szignifikáns különbséget a két csoport között. Továbbá praeclampsziás betegeknél mind a fikolin-2, mind a fikolin-3 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint egészséges terhes és nem terhes nők esetén.

A Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe analízis segítségével meghatároztuk azt a fikolin-2 ($<2.84 \mu\text{g/ml}$; szenzitivitás: 70.2%, specificitás: 66.1%) és fikolin-3 ($24.0 \mu\text{g/ml}$; szenzitivitás: 68.3%, specificitás: 54.2%) határértéket, melynek segítségével a praeclampsziás csoport elkülöníthető az egészséges terhesektől. Mind az alacsony fikolin-2, mind az alacsony fikolin-3 szintek szignifikáns összefüggést mutattak a praeclampsziával (OR (95%CI) fikolin-2 esetén: 4.58 (2.07-10.1), $p<0.001$; fikolin-3 esetén: 2.56 (1.21-5.40, $p<0.05$), még azután is, hogy többszörös logisztikus regressziós analízis során az értékeket az anyai életkorra, valamint a vérévelkori testtömeg indexre és terhességi korra illesztettük (adjusztált OR (95% CI) fikolin-2: 8.74 (2.90-26.4), $p<0.001$; fikolin-3: 3.30 (1.24-8.77), $p<0.05$).

A praeclampsziás betegek csoportjában nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjében attól függően, hogy súlyos vagy enyhe, illetve késői vagy korai kezdetű praeclampsia állt fenn, illetve hogy szövődött-e a betegség magzati retardációval vagy sem.

9. táblázat Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek laboratóriumi paramétereit

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (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 AST aktivitás (U/l)	17 (15-20)	19 (17-21)	19 (15-25)
Szérum ALT aktivitás (U/l)	14 (12-17)	12 (10-15) ^a	16 (11-23) ^c
Szérum LDH aktivitás (U/l)	154 (128-170)	158 (138-169)	192 (153-225) ^{b,d}
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}
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}
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 szabad magzati DNS szint (pg/μl)	n.m.	0.002 (0.0-0.172) [§]	0.082 (0.033-0.292) ^{#,c}

Az adatokat mediánként (interkvartilis tartomány) tüntettük fel

n.m.: nem mérve; AST: aszpartát-aminotranszferáz; ALT: alanin-aminotranszferáz; LDH: laktát-dehidrogenáz; sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentaris növekedési faktor; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: deoxiribonukleinsav

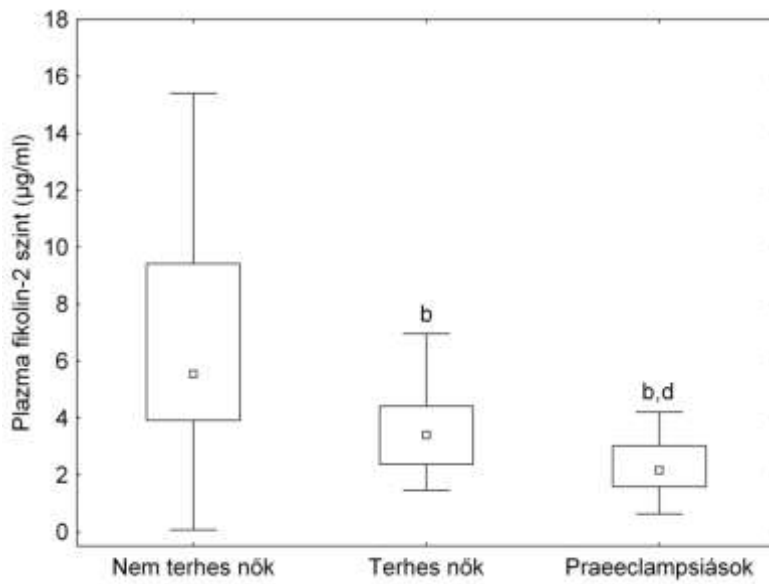
* n=52 † n=58 ‡ n=54 § n=19 # n=33

^a p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

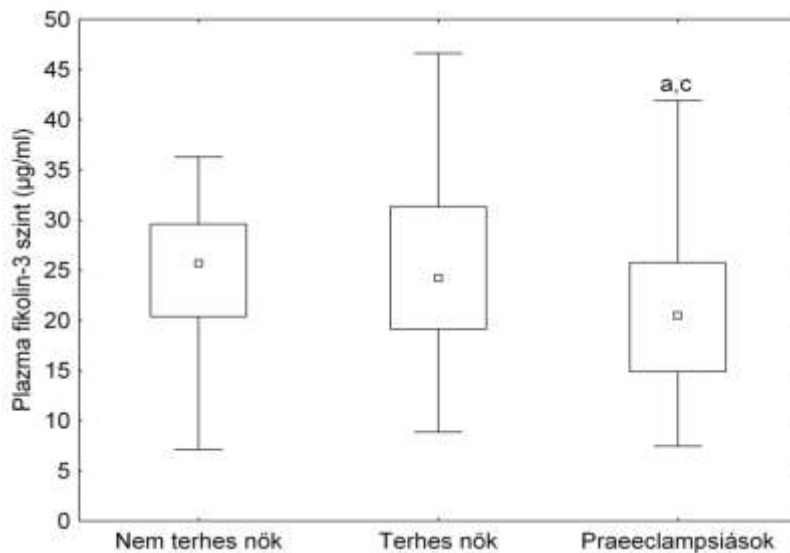
^b p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

^c p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

^d p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők



a)



b)

10. ábra

Fikolin-2 (10.a) és fikolin-3 (10.b) plazmakoncentrációk egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek esetén

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kivéve a kilógó értékeket)

^a $p < 0.05$ versus egészséges nem terhes nők

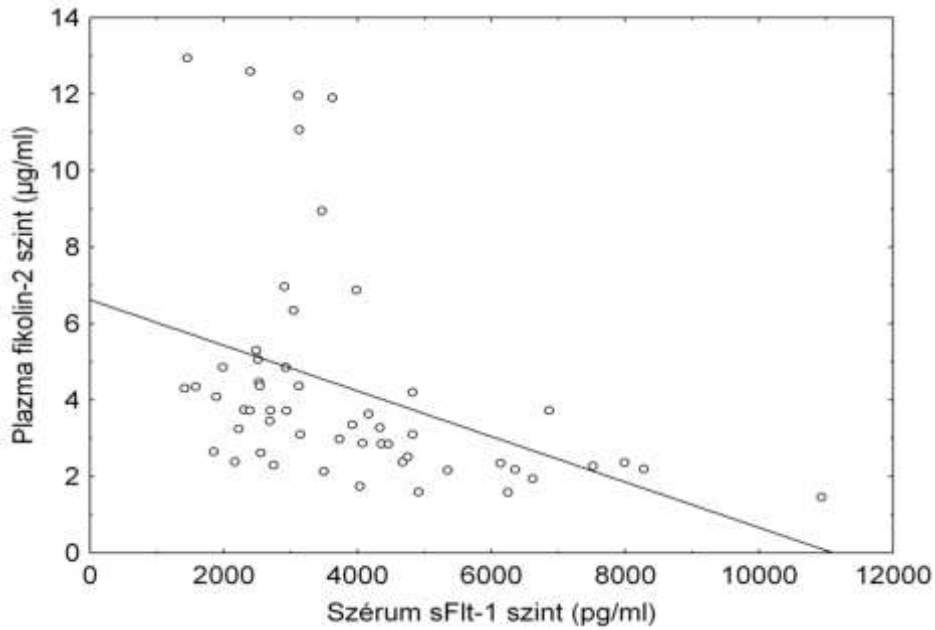
^b $p < 0.001$ versus egészséges nem terhes nők

^c $p < 0.05$ praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

^d $p < 0.001$ praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

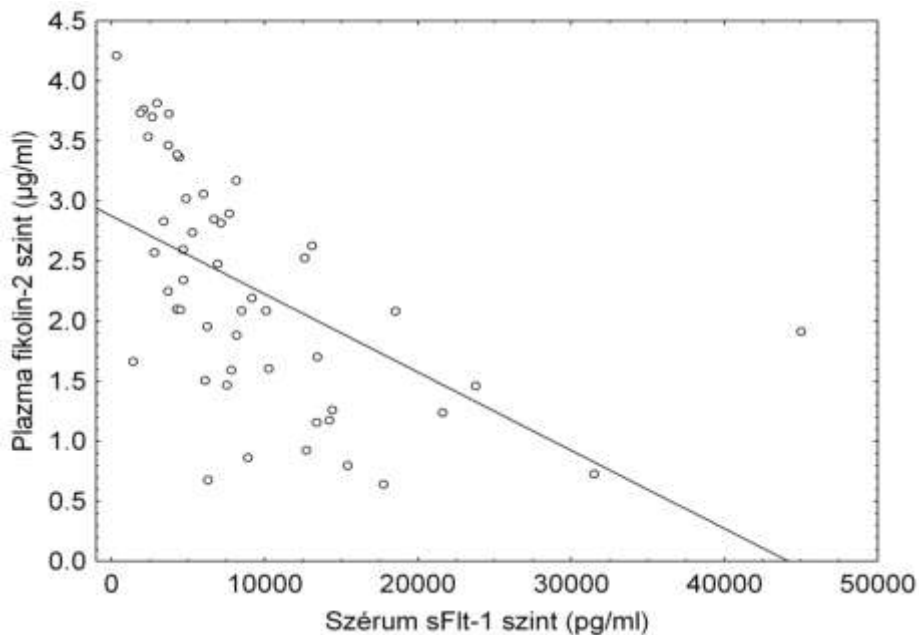
4.3.3. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétere, valamint fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjei közötti összefüggés

Megvizsgáltuk, hogy a vizsgált csoportok plazma fikolin-2 és fikolin-3 szintje mutat-e összefüggést klinikai jellemzőikkel és laboratóriumi paramétereivel. A folyamatos változók esetén a Spearman-féle rangkorrelációs együtthatót számítottuk ki, míg kategorikus változók esetén a Mann-Whitney *U*-tesztet használtuk. Egészséges terhesekben statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a fikolin-2 plazma- és PlGF szérumszintek között (Spearman $R=0.33$, $p<0.05$), míg szignifikáns fordított arányosságot találtunk a fikolin-2 és sFlt-1 szintek között ($R=-0.59$, $p<0.001$; 11. ábra). A praeeclampsziás csoportban a fikolin-2 plazmaszintek szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a PlGF szérumszintekkel ($R=0.34$, $p<0.05$) és szignifikáns fordított arányosságot mutattak a szérumszintű sFlt-1 ($R=-0.72$, $p<0.001$; 12. ábra), karbamid ($R=-0.36$, $p<0.05$) és kreatinin ($R=-0.38$, $p<0.05$) szintekkel, a szérumszintű LDH aktivitással ($R=-0.32$, $p<0.05$), valamint a plazmaszintű VWF:Ag ($R=-0.34$, $p<0.05$), fibronectin ($R=-0.50$, $p<0.001$) és szabad magzati DNS ($R=-0.41$, $p<0.05$) koncentrációkkal. Azonban többszörös lineáris regressziós analízis során szérumszintű sFlt-1 szintekre történő illesztés után csak a fikolin-2 és kreatinin koncentrációk közötti összefüggés maradt szignifikáns (standardizált regressziós koefficiens (β)= -0.41 , $p<0.05$). Nem volt további összefüggés a vizsgált páciensek plazma fikolin-2 és fikolin-3 szintjei, valamint klinikai jellemzői és vizsgált laboratóriumi paramétere – beleértve a komplement aktiváció termékeit is – között egyik vizsgált csoportban sem.



11. ábra

Egészséges terhesek plazma ficolin-2 koncentrációja a szérum szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) szintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0.59$, $p<0.001$)



12. ábra

Praeclampsziás betegek plazma ficolin-2 koncentrációja a szérum szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) szintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével (Spearman $R=-0.72$, $p<0.001$)

5. Megbeszélés

5.1. AHSZG és CRP szérumszintek változása praeclampsziában

Tanulmányunkban azt találtuk, hogy praeclampsziában a szérumszint AHSZG koncentrációk csökkennek és negatív korrelációt mutatnak a szisztolés vérnyomással és a szérumszint CRP szintekkel.

Az AHSZG szérumszintjét számos tényező képes szabályozni. A fehérjét elsősorban a májsejtek termelik, és szérumszintje csökkenést mutat májcirrhosis és hepatocellularis carcinoma esetén a máj csökkent szintetizáló képessége miatt [77, 78]. A pro-inflammatorikus citokinek csökkentik a máj AHSZG termelését, ami arra utal, hogy egy negatív akut fázis fehérjéről van szó [79]. Feltételezhető, hogy az ösztrogének is befolyásolják a fehérje termelését, amire a postmenopausában és ösztrogén kezelés hatására észlelt szérumszint változások utalnak [80]. Továbbá megfigyelték, hogy a csökkent vesefunkció csökkent keringő AHSZG szintekkel jár, és a glomeruláris diszfunkció mértéke korrelál az AHSZG szintjével krónikus vesebetegség esetén [81]. Az AHSZG-t kódoló gén egy pontos nukleotid variációi szintén befolyásolták a fehérje szérumszintjét különböző populációkban [82, 83]. Rosszindulatú vérképzőszervi betegségekben szenvedőknél a fokozott felhasználódás eredményeként is csökkent AHSZG szinteket találtak [84]. Terhesség esetén a fehérje forrása lehet a fetoplacentaris egység is. Az AHSZG nagymértékben expresszálódik a lepényi szövetekben, és passzív transzplacentaris transzportja is feltételezhető [85, 86]. Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy az AHSZG szintek a terhesség előrehaladtával emelkedést mutatnak egészséges terhesség esetén [87].

Eredményeink szerint a praeclampsziában észlelt csökkent AHSZG szintekért – legalábbis részben – az akut fázis reakcióval járó szisztémás anyai gyulladási válasz felelős, amint azt a szérumszint CRP koncentrációval talált fordított összefüggés mutatja. Valóban, a keringő AHSZG szintek számos szöveti károsodással, infekcióval, gyulladással vagy malignitással járó állapotban csökkennek [56, 84, 88, 89]. Azonban más tényezők is hozzájárulhattak eredményeinkhez. Korábban bizonyítást nyert, hogy az AHSZG a makropinocitózis stimulálása révén elősegíti az apoptotikus sejtek makrofág-mediált fagocitózisát *in vitro* [90]. Ebből következően lehetséges, hogy az

anyai keringésbe kerülő trophoblast-törmelék eltakarítása során felhasználódó fehérjék miatt találunk praeclampszában alacsony AHSG szinteket. A vese fokozott fehérjeürítése szintén magyarázattal szolgálhat a csökkent keringő AHSG szintekre praeclampszában [91]. A fehérje szérumban és vizelet szintjei között azonban nem volt összefüggés különböző vesebetegségben szenvedőknél [92]. Korábbi tanulmányok csökkent ösztrogén szinteket és hatást találtak praeclampszában [93, 94], ami szintén alacsonyabb AHSG koncentrációkhoz vezethet. Továbbá, az AHSG gén polimorfizmusainak a szerepét sem vizsgálták még ebben a terhességhez kötött betegségben.

Az AHSG szint meghatározás diagnosztikus értékét a CRP szérumszint méréséhez hasonlónak találtuk praeclampszában. A CRP a szöveti károsodás és a gyulladás érzékeny markere. Számos tanulmány igazolta, hogy szérumszintje praeclampsziásoknál emelkedett az egészséges terhesekéhez képest [95, 96], sőt, a CRP szint emelkedése megelőzi a praeclampszia kialakulását [97]. Az elhízás, amely önmagában is egy gyulladásos állapotnak felel meg, azonban befolyásolhatta ezeket a megfigyeléseket [98, 99]. Bár az AHSG kapcsolatban áll a testtömeggel [100], tanulmányunkban a fehérje alacsony szintje a testtömeg indextől függetlenül összefüggést mutatott a praeclampszia emelkedett kockázatával. Mindazonáltal, a praeclampsziás és egészséges terhesek szérumban AHSG és CRP szintjei közötti nagy átfedés – amint az a szenzitivitási és specifikitási mutatókból is látszik – arra utal, hogy a szisztémás gyulladáson kívül más mechanizmusok is szerepet játszhatnak ezen multifaktoriális kórkép kialakulásában.

A magzati növekedési retardációval szövődött, illetve eutroph magzatot viselő praeclampsziás terhesek szérumban AHSG szintje nem mutatott szignifikáns különbséget. Munkacsoportunk korábban azt találta, hogy az AHSG a TNF- α -val és a leptinnel együtt negatívan szabályozhatja az újszülöttek csontfejlődését [87]. Egy korábbi tanulmányban nem találtak különbséget az anyai, a magzati és az újszülött AHSG koncentrációkban a szövődésmentes és az aszimmetrikus magzati retardációval szövődött terhességek között [86], ami egybevág a mi eredményeinkkel. A koncentráción kívül a fehérje poszttranszlációs módosulása (foszforiláció, glikoziláció) is befolyásolja az AHSG biológiai aktivitását [101, 102]. Intrauterin magzati

retardációval született újszülöttek plazmájában valóban jelentős rendellenességeket találtak a fehérje szialilációjában [102].

Az alacsony keringő AHSG szintek nemcsak a praeclampsia markerei lehetnek, de a kórkép patogenezisében is szerepet játszhatnak. Krónikus vesebetegek esetén az alacsony AHSG koncentrációknak szerepet tulajdonítottak az endothelialis diszfunkció kialakulásában [81, 103], ami praeclampsiaiban is fontos kóroki tényező. Továbbá az AHSG, mint egy ásványi “chaperone”, megelőzheti a lágyszövetek kalcifikációját [104]. A fokozott artériás merevség, melyet az erek meszesedésével hoznak összefüggésbe [105], praeclampsias terhessegekben is megfigyelhető [106]. Ebben a vonatkozásban érdekes, hogy a szisztolés vérnyomás, ami inkább a nagyerek viszkoelasztikus tulajdonságait jellemzi, mint a rezisztenciaerek vazokonstrikióját, fordított arányosságot mutatott az AHSG szintekkel praeclampsias betegeinkben. Számos tanulmány bizonyította az AHSG gyulladásgátló szerepét. A fehérje gátolja a perifériás vérben található limfociták interleukin-2 termelését, mely egy pro-inflammatorikus citokin [107]. Emellett a makrofág deaktivációhoz is AHSG-re, mint opszoninra volt szükség *in vitro*. Egy állatkísérletes modellben az AHSG gátolta a TNF- α szintézisét és a gyulladós reakciót [108]. Továbbá kimutatták, hogy a fehérje elősegíti az apoptotikus sejtek makrofágok általi fagocitózist [90]. Terhességben a nekrotikus és apoptotikus trophoblast sejtek csökkent eltávolítása miatt több lepényi törmelék kerülhet az anyai keringésbe, ami a praeclampsia jellemező kifejezett anyai szisztémás gyulladós válaszreakcióhoz vezethet.

Másrészt a csökkent AHSG szinteknek lehet előnyös hatása is terhességben. A fehérvérsejtek nem megfelelő TGF- β termelése az angiogenezis zavarához és következményes praeclampsiahoz vezethet [109]. Az AHSG a szolubilis endoglinhoz hasonlóan gátolhatja a TGF- β aktivitást [110]. Az inzulin rezisztencia a praeclampsia ismert rizikófaktora [111]. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az AHSG inzulin rezisztenciához vezethet szövődménymentes terhességben és gestatiós diabetesben [87].

Annak ellenére, hogy tanulmányunk nagy esetszámot dolgozott fel, értékét korlátozza eset-kontroll jellege. Annak megítélésére, hogy a csökkenő szérumszintű AHSG koncentrációk megelőzik-e a praeclampsia kialakulását, és így segíthetnek-e ennek a

súlyos terhességi szövődménynek az előrejelzésében, egy prospektív vizsgálatra lenne szükség.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy praeclampsziában a szérum AHSG szintek csökkenése figyelhető meg, amely – legalábbis részben – a kórképben megfigyelt szisztémás gyulladást tükrözi. A keringő AHSG glikoprotein biológiai szerepének tisztázására egészséges terhességben és praeclampsziában azonban további vizsgálatokra van szükség.

5.2. A perifériás vérben található CD4+ CD25magas FoxP3+ és CD4+ CD25- FoxP3+ regulátoros T sejtek gyakorisága szövődménymentes terhességben és praeclampsziában

Tanulmányunkban bemutattuk, hogy a konvencionális CD4+ CD25magas FoxP3+, valamint a nem-konvencionális CD4+ CD25- FoxP3+ Treg alcsoportok gyakorisága is magasabb egészséges terhességek esetén, mint nem terhes nőknél, de alacsonyabb praeclampsziásokban, a nem terhes csoportéval összemérhető szintet érve el.

Számos tanulmány vizsgálta a Treg sejtek gyakoriságát egészséges terhesség és praeclampsia esetén. Heikkinen és mtsai, valamint Somerset és mtsai a perifériás Treg populáció növekedését figyelték meg egészséges koraterhességben. Eredményeik szerint ezen populáció gyakorisága a legmagasabb értéket a második trimeszterben érte el, és folyamatos csökkenést mutatva a posztpartum időszakra a nem terhesekénél alig magasabb szintre esett [28, 112].

A praeclampsziában talált keringő Treg gyakoriságot illetően az adatok nem egybeváogók. Paeschke és mtsai [113], valamint Hu és mtsai [114] összemérhető, míg Sasaki és mtsai [115], Darmochwal-Kolarz és mtsai [116], Prins és mtsai [35], Steinborn és mtsai [36] és a mi munkacsoportunk [117] alacsonyabb Treg frekvenciát igazolt praeclampsziás betegek perifériás vérében, mint egészséges terhesekében. Mikó és mtsai szintén alacsonyabb Treg arányokat találtak praeclampsziában egészséges terhesekhez, valamint nem terhes nőkhöz képest is [118]. Továbbá Sasaki és mtsai igazolták, hogy a Treg sejtek prevalenciája nemcsak a praeclampsziások perifériás vérében, de deciduájában is alacsonyabb egészséges terhesekkel összehasonlítva [115].

A fent említett tanulmányok esetén a Treg sejteket egy sejtfelszíni aktivációs marker, a CD25 alapján (CD4+ CD25magas sejtek), vagy az intracelluláris FoxP3 pozitivitás alapján (CD4+ FoxP3+ vagy CD4+ CD25magas FoxP3+ sejtek) azonosították. Miyara és mtsai további alcsoportokra bontották a Treg sejteket ezen és más markerek alapján [32]. Bemutatták, hogy a teljesen differenciált aktivált CD4+ CD25magas FoxP3magas Treg sejtek válaszkészsége fokozottabb, de proliferációra kevésbé képesek, mint a nyugvó CD4+ CD25magas FoxP3alacsony Treg sejtek. Eredményeink alapján nemcsak általánosságban a Treg sejtek prevalenciája, hanem ezen fokozott válaszkészségű alcsoportnak a gyakorisága is alacsonyabb praeeclampsziában az egészséges terhesekhez képest, ami hozzájárulhat a természetes és adaptív immunrendszer aktiválásához. Ezen megfigyelés egybevág korábban leírtakkal: a CD4+ CD25+ FoxP3magas+ Treg sejtek szignifikánsan csökkent aránya praeeclampsziában alacsonyabb szuppresszív kapacitással társult [36].

Korábban Nishioka és mtsai előrehaladott korú egerekben FoxP3+ szuppresszív sejteket azonosítottak a CD4+ CD25- T sejtek között [119]. *In vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen populáció elhanyagolható volt fiatal kontrollokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a T sejt-mediált immunválasz korhoz kötött csökkenése a CD4+ CD25- T sejt populáció változásának számlájára írható, és nem a szuppresszív CD4+ CD25+ T sejtek működésének fokozódása felel érte. Továbbá eredményeik alapján a FoxP3, nem pedig a CD25 a szuppresszív T sejtek legjobb markere idősödő egerek esetén [119]. A CD4+ CD25- FoxP3+ T sejtek szabályozó szerepét emberben is igazolták [120]. Ez azért érdekes, mert a két korábbi vizsgálat, mely praeeclampsia esetén az egészséges terhesekével összemérhető Treg arányokat talált, a Treg sejtek azonosítására FoxP3-t nem, csak CD25-öt használt markerként.

Tanulmányunkban a CD4+ CD25magas FoxP3+ és a CD4+ CD25- FoxP3+ Treg alcsoportok aránya állandó volt mindhárom vizsgált csoportban, ami azt mutatja, hogy a konvencionális és nem-konvencionális Treg sejtek gyakorisága párhuzamosan változik, és mindkét alcsoport jelenléte a perifériás keringésben egyformán fontos a megfelelő terhességhez kötött immuntolerancia kialakulásában.

Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a FoxP3 expressziója sokkal fontosabb tényező a Treg sejtek funkcióját illetően, és a Treg sejtek jobb markere terhességben, mint a sejtfelszíni IL-2 receptor α -lánc, a CD25.

Végkövetkeztetésként kimondhatjuk, hogy adataink szerint nemcsak a konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ Treg sejtek, hanem a nem-konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ Treg alcsoport aránya is csökken praeclampszában az egészséges terhességben mérthez képest. Mivel ezen alcsoportok szintje párhuzamosan változik a perifériás vérben, ebből arra következtethetünk, hogy nemcsak a konvencionális, de a CD25⁻ nem-konvencionális Treg alcsoportnak is jelentősége van a terhességhez kötött immuntolerancia kialakulásában.

5.3. Keringő fikolin-2 és fikolin-3 szintek egészséges terhességben és praeclampszában

Ebben a tanulmányunkban meghatároztuk egészséges nem terhes, valamint egészséges és praeclampsziás terhes nők fikolin-2 és fikolin-3 plazmaszintjét. A komplement aktiváció termékeinek, az angiogén faktoroknak, valamint az endothel aktiváció, az endothel sérülés és trophoblast-törmelékmarkereinek párhuzamos mérése és viszonyuk meghatározása a fikolin szintekhez segítheti a keringő fikolinok szerepének megértését egészséges terhesség és praeclampszia esetén.

A keringő fikolinok egyik fő szerepe a komplement rendszer aktivációja az effektor MASP-okkal együttműködve a lektin útvonalon keresztül[63]. Ezzel szemben tanulmányunkban a keringő fikolin szintek nem mutattak összefüggést a komplement aktiváció termékeinek koncentrációjával, ami arra utal, hogy a fikolin-mediált lektin út nem játszik lényeges szerepet a szisztémás komplement aktivációban szövődménymentes terhességben és praeclampszában. Helyette, egészséges terhességben a keringő immunkomplexek és a CRP a klasszikus úton képesek aktiválni a komplement rendszert, és ez még kifejezettebb praeclampszia esetén[121-123]. Szintén kimutatták az MBL-mediált lektin út aktivációját normál terhességben[124]. Praeclampsziás betegekben a keringő MBL koncentrációját emelkedettnek találták, és az MBL genotípusok és a praeclampszia közötti összefüggést is kimutatták [125-127]. Ennek ellentmondó adatok is napvilágot láttak azonban [128, 129], és az MBL-MASP2 komplex funkcionális aktivitása korábbi eredményeink szerint nem változik praeclampszában [130]. Nemrég a koraterhességben mért emelkedett Bb komplement aktivációs fragmentum szinteket összefüggésbe hozták a terhesség

folyamán később kialakuló praeclampsiával, ami az alternatív útvonalnak a betegség patogenezisében betöltött szerepére utal[64, 76].

A komplement aktivációban betöltött szerepük mellett a fikolinok direkt opsoninként hatva mediálják a mikroorganizmusok, apoptotikus és nekrotikus sejtek eltávolítását fagocitózis útján[131-135]. A trophoblast apoptosis jellemző normál terhességben, de fokozottan van jelen praeclampsiában, amikor necrosis is szövődik[136-139]. Kimutatták, hogy a fikolinok a praeclampsiás placentában az apoptotikus trophoblast sejtekhez kötődnek[128]. Továbbá a placentából trophoblast-törmelékek is nevezett apoptotikus, valamint élő sejtes és szubcellularis – szabad magzati DNS-t és sFlt-1-et tartalmazó – anyagok szabadulnak fel, és jutnak az anyai keringésbe egészséges terhességben, és – nagyobb mennyiségben – praeclampsiában[140-144]. Ismerve a keringő fikolin-2 és a szabad magzati DNS, valamint sFlt-1 szintek közötti szignifikáns fordított arányosságot, melyet egészséges terhesekben és praeclampsiásokban is megfigyeltünk, kézenfekvőnek tűnik feltételezni, hogy a fikolin-2-nek szerepe lehet a trophoblastból származó anyagoknak az anyai keringésből történő közvetlen eltávolításában. Praeclampsiában a keringő fikolin-2 csökkent szintje (fokozott felhasználás vagy elsődleges hiány miatt) következtében elmaradhat az apoptotikus és nekrotikus lepényi anyagoknak az anyai keringésből történő eltávolítása, ami szerepet játszhat a betegség anyai tüneteinek kialakulásában. Bár a plazma fikolin-3 szintje is alacsonyabb volt praeclampsiásoknál, a keringő fikolin-3 szintje nem mutatott összefüggést a szabad magzati DNS, illetve sFlt-1 szintekkel a vizsgált terhes csoportokban. Ezt az eltérést magyarázhatja a fikolin-2 és fikolin-3 ligandspecificitásában észlelt különbség, tudniillik a fikolin-2 képes felismerni a DNS-t[134]. Lehetséges, hogy a praeclampsiában talált alacsony fikolin-3 koncentráció egyszerűen az apoptotikus placentában való szekvesztráció következménye[128].

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a keringő angiogén faktorok és antagonistáik közötti egyensúly felborulásának alapvető szerepe van a praeclampsia patogenezisében[41, 145]. Korábbi tanulmányunkban igazoltuk, hogy praeclampsiában az emelkedett szérumsFlt-1 és csökkent PlGF szintek összefüggést mutatnak az emelkedett vérnyomással, vese és endotheliális diszfunkcióval, trophoblast degradációval, valamint a terhesség rövidebb időtartamával, a méhenbelüli növekedési

retardációval, továbbá a kórkép súlyosságával és korábbi terhességi korban történő kialakulásával [146]. Jelen tanulmányunkban a plazma fikolin-2 szintek szignifikáns fordított arányosságot mutattak a vese- és májfunkciós értékekkel, valamint az endothel aktiváció és sérülés markereivel praeclampsiasok esetén. Azonban a szérumban sFlt-1 szintekretörténő illesztés után ezek az összefüggések már nem álltak fenn, kivéve a szérumban kreatinin koncentrációt. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a keringő fikolin-2 korszumpció vagy elsődleges hiány (pl. genetikai ok) miatti csökkent szintje indirekt úton, a placentából származó, sFlt-1-et tartalmazó anyagoknak az anyai keringésből való csökkent eltávolítása útján hozzájárulhat a generalizált endothelialis diszfunkcióhoz, ezáltal a kórkép anyai tünetegyüttesének a kialakulásához. Mindazonáltal, a fikolin-2 szinteknek a kreatinin koncentrációval praeclampsiasban észlelt független fordított lineáris kapcsolata utalhat a fikolin-2-nek a vesekárosodásban betöltött közvetlen szerepére. Érdekes, hogy összefüggés mutatkozott IgA nefropátiában a helyi lektin út aktivációjával járó glomeruláris fikolin-2 lerakódások és a vesebetegség súlyossága között [147].

Eredményeink szerint azon terheseknél, akiknél alacsonyabb keringő fikolin-2 vagy fikolin-3 szintek mérhetők, fokozott a praeclampsia kialakulásának kockázata. Korábban is kimutattak kapcsolatot csökkent fikolin-2 és fikolin-3 szintek és bizonyos betegségek, úgymint gyermekkori kombinált allergiás és fertőző légúti betegség [148, 149], bronchiectasia [150], koraszülöttség, alacsony születési súly és perinatalis infekciók [151], szarkoidózis [152], rákos gyermekek esetén lázra és neutropeniára való fokozott fogékonyság [153], valamint újszülöttkori szepszis [154] között. Továbbá kutatócsoportunk nemrég mutatta ki, hogy a korai követés során vett szérumban talált alacsonyabb fikolin-3 szintek az akut ischaemiás stroke súlyosságával és kedvezőtlen kimenetelével mutatnak összefüggést [155]. Bizonyos genetikai variációk hatással vannak a keringő fikolinok mennyiségére és ligand-kötő képességére [149, 156, 157], és összefüggést mutatnak számos kórképpel, úgymint a reumás láz és krónikus reumatikus szívbetegség [158], májtranszplantáció után kialakuló bakteriális és CMV fertőzések [159], valamint immunhiány [160]. Mivel a praeclampsia multifaktoriális betegség, melynek genetikai háttere is van, a fikolin génpolimorfizmusok és a praeclampsia kockázata közötti összefüggés felderítése még további kutatásokat tesz szükségessé.

Tanulmányunkban a praeclampsias betegcsoporton belül a mért fikolin-2 és fikolin-3 szinteket a betegség súlyossága, kialakulásának kezdete és a méhenbelüli növekedési retardáció jelenléte nem befolyásolta, amit magyarázhatunk a praeclampsia komplex patogenezisével. Számos genetikai és környezeti tényező együtthatása szükséges ezen terhességhez kötött betegség teljes klinikai képének a kialakulásához. Korábban bemutattunk számos genetikai és szolubilis faktort, mely összefüggésbe hozható a praeclampsia súlyosságával és szövődményeivel, beleértve a HELLP-szindrómát és a méhenbelüli növekedési retardációt is[161-164]. Az is lehetséges azonban, hogy a tanulmányunk viszonylag alacsony esetszáma miatt az alcsoportok vizsgálata során nem minden összefüggésre sikerült fényt deríteni. Bár a praeclampsia elsődlegesen a primiparákat érintő betegség, multiparáknál is kialakulhat, főleg előrehaladott életkor és túlsúly esetén, mint esetünkben is látható volt.

Összefoglalva, a keringő fikolin-2 szintek csökkennek a terhesség harmadik trimeszterében. További plazma fikolin-2 koncentráció csökkenés figyelhető meg praeclampsiaiban, ami a hipoxiás és oxidatív stressznek kitett placentából az anyai keringésbe kerülő trophoblast-eredetű törmelék csökkent eltávolításán keresztül hozzájárulhat a kórkép anyai tünetegyüttesének a kialakulásához.

6. Következtetések

1. Praeclampsziában a szérumban az AHSG koncentrációk csökkennek és fordított összefüggést mutatnak a szisztolés vérnyomással és a szérumban a CRP szintekkel. A praecclampsziában észlelt csökkent AHSG szintekért az akut fázis reakcióval járó szisztémás anyai gyulladásos válasz lehet felelős.

2. Adataink szerint nemcsak a konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ Treg sejtek, hanem a nem-konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ Treg alcsoport aránya is csökken praecclampsziában az egészséges terhességben mérthez képest, ebből arra következtethetünk, hogy mindkét Treg alcsoportnak jelentősége van a terhességhez kötött immuntolerancia kialakulásában. Eredményeink alapján a FoxP3 expressziója sokkal fontosabb tényező a Treg sejtek funkcióját illetően, és a Treg sejtek jobb markere terhességben, mint a CD25.

3. Egészséges terhesség harmadik trimeszterében a keringő fikolin-2 koncentráció csökkenése figyelhető meg. Praeclampsziában a fikolin-2 szintek további csökkenése tapasztalható, ami hozzájárulhat a kórkép anyai tünetegyüttesének a kialakulásához, mivel a hipoxiás és oxidatív stressz által károsodott praecclampsziás placentából az anyai keringésbe kerülő trophoblast-eredetű anyagok lebontásának hatásfoka csökken.

7. Összefoglalás

A praeclampsia, melyet a terhesség második felében kialakuló magasvérnyomás és proteinuria jellemez, a terhesség súlyos szövődménye. A praeclampsziára jellemző fokozott anyai szisztémás gyulladással járó válaszreakció az immunrendszer adaptív és természetes ágának aktiválódásával, proteázok és pro-inflammatorikus citokinek termelésével, az endothelsejtek, trombociták, az alvadási és komplement rendszer aktiválódásával, valamint akut fázis reakcióval jár. Tanulmányunkban meghatároztuk egészséges terhes nők, valamint praeclampsziás betegek keringésében egy negatív (AHSG) és egy pozitív (CRP) akut fázis fehérje, illetve egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek keringésében a komplement aktivációban és az opszonin-mediált fagocitózisban résztvevő fikolinok, valamint ezzel párhuzamosan a komplement aktiváció termékeinek, angiogén faktoroknak, valamint az endothel aktiváció, az endothel sérülés és trophoblast-törmelékmarkereinek a koncentrációját. Továbbá vizsgáltuk a gyulladással járó reakció szabályozásában résztvevő regulátoros T-sejt alcsoportok (CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ és CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺) gyakoriságát a fenti betegcsoportokban. A negatív akut fázis fehérje, az AHSG szérumszintjei szignifikánsan alacsonyabbak, míg a pozitív akut fázis fehérje, a CRP szérumszintjei szignifikánsan magasabbak voltak praeclampsziás betegek esetén, mint egészséges terheseknél. Adataink szerint nemcsak a konvencionális CD4⁺ CD25^{magas} FoxP3⁺ Treg sejtek, hanem a nem-konvencionális CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ Treg alcsoport aránya is csökken praeclampsziában az egészséges terhességben mérthez képest. Mivel ezen alcsoportok szintje párhuzamosan változik a perifériás vérben, ebből arra következtethetünk, hogy mindkét alcsoportnak jelentősége van a terhességhez kötött immuntolerancia kialakulásában. Praeclampsziában a plazma fikolin-2 koncentrációja csökkenést mutatott, ami a hipoxiás és oxidatív stressznek kitett placentából az anyai keringésbe kerülő trophoblast-eredetű törmelék csökkent eltávolításán keresztül hozzájárulhat a kórkép anyai tünetegyüttesének a kialakulásához.

8. Summary

Preeclampsia, characterized by hypertension and proteinuria developing after midgestation, is a severe complication of human pregnancy. Increasing evidence suggests that an excessive maternal systemic inflammatory response with activation of both the innate and adaptive arms of the immune system, production of proteases and proinflammatory cytokines, activation of endothelial cells, platelets, the coagulation and complement system and an acute phase response is involved in the pathogenesis of the disease. In our study we determined serum concentrations of a negative acute phase protein (AHSG) and a positive acute phase protein (CRP) in preeclamptic and healthy pregnant women, measured circulating levels of ficolin molecules involved in complement activation and opsonin mediated phagocytosis, as well as complement activation products, angiogenic factors and markers of endothelial activation, endothelial injury and trophoblast debris in healthy non-pregnant and pregnant women and preeclamptic patients. We also aimed to determine the peripheral frequency of the non-conventional CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ Treg and conventional CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ Treg subsets in the three patient groups. We found that serum AHSG concentrations were decreased and serum CRP levels were increased in preeclampsia. The frequency of conventional CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs, but also that of the non-conventional CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ Treg subset was found lower in preeclampsia than in normal pregnancy. As these Treg subsets altered simultaneously in the peripheral blood, we conclude that not only conventional Tregs, but also the CD25⁻ non-conventional Treg subset is of importance in the development of pregnancy-specific immune tolerance. Circulating levels of ficolin-2 were decreased in preeclampsia, which might contribute to the development of the maternal syndrome of the disease through impaired removal of the trophoblast-derived material released into the maternal circulation by the hypoxic and oxidatively stressed preeclamptic placenta.

9. Irodalomjegyzék

- [1] (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 183: S1-S22.
- [2] (1996) ACOG technical bulletin. Hypertension in pregnancy. Number 219--January 1996 (replaces no. 91, February 1986). Committee on Technical Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*, 53: 175-183.
- [3] Berg CJ, Mackay AP, Qin C and Callaghan WM.(2009) Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstet Gynecol*, 113: 1075-1081.
- [4] Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J and Atrash HK.(2008) Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*, 21: 521-526.
- [5] Weinstein L.(1982) Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142: 1591-67.
- [6] Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM and Friedman SA.(1993) Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol*, 169: 1000-1006.
- [7] Vatten LJ and Skjaerven R.(2004) Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG*, 111: 298-302.
- [8] Ness RB and Roberts JM.(1996) Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*, 175: 1365-1370.
- [9] Redman CW and Sargent IL.(2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308: 1592-1594.
- [10] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M and Fisher SJ.(2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*, 114: 744-754.

- [11] Burton GJ and Jauniaux E.(2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*, 11: 342-352.
- [12] Jauniaux E, Gulbis B and Burton GJ.(2003) The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review. *Placenta*, 24 Suppl A: S86-93.
- [13] Redman CW.(1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, 12: 301-308.
- [14] Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J and Moffett A.(2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*, 200: 957-965.
- [15] Parham P.(2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5: 201-214.
- [16] Redman CW and Sargent IL.(2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta*, 24 Suppl A: S21-27.
- [17] Borzychowski AM, Sargent IL and Redman CW.(2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*, 11: 309-316.
- [18] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L and Mosmann TR.(1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 14: 353-356.
- [19] Sacks G, Sargent I and Redman C.(1999) An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*, 20: 114-118.
- [20] Sargent IL.(1993) Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet*, 10: 85-102.
- [21] Munz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Schild H and Rammensee HG.(1997) Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med*, 185: 385-391.
- [22] Kelly RW and Critchley HO.(1997) A T-helper-2 bias in decidua: the prostaglandin contribution of the macrophage and trophoblast. *J Reprod Immunol*, 33: 181-187.
- [23] Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C and et al. (1995) Progesterone favors the

development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*, 155: 128-133.

[24] Sacks GP, Studena K, Sargent K and Redman CW.(1998) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol*, 179: 80-86.

[25] Moffett-King A.(2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, 2: 656-663.

[26] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S and Mandelboim O.(2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*, 12: 1065-1074.

[27] Hori S, Nomura T and Sakaguchi S.(2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-1061.

[28] Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM and Drayson MT.(2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112: 38-43.

[29] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C and Mellor AL.(1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281: 1191-1193.

[30] Saito S, Sasaki Y and Sakai M.(2005) CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 65: 111-120.

[31] Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T and Ito M.(2007) Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Semin Immunopathol*, 29: 115-122.

[32] 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 and Sakaguchi S.(2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30: 899-911.

- [33] Saito S and Sakai M.(2003) Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 59: 161-173.
- [34] Saito S.(2010) Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol*, 88: 615-617.
- [35] Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ and Erwich JJ.(2009) Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy*, 28: 300-311.
- [36] Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S and Sohn C.(2008) Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol*, 129: 401-412.
- [37] Redman CW, Sacks GP and Sargent IL.(1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 180: 499-506.
- [38] Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E and Kingdom JC.(2009) Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30: 473-482.
- [39] Knight M, Redman CW, Linton EA and Sargent IL.(1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 105: 632-640.
- [40] Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM and Redman CW.(1993) 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*, 100: 943-949.
- [41] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP and Karumanchi SA.(2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111: 649-658.
- [42] Gabay C and Kushner I.(1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340: 448-454.
- [43] Greer IA, Dawes J, Johnston TA and Calder AA.(1991) Neutrophil activation is confined to the maternal circulation in pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol*, 78: 28-32.

- [44] Redman CW.(2011) Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne*, 32 Suppl 1: S41-44.
- [45] Terrone DA, Rinehart BK, May WL, Moore A, Magann EF and Martin JN, Jr. (2000) Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia. *South Med J*, 93: 768-771.
- [46] Haeger M, Unander M, Norder-Hansson B, Tylman M and Bengtsson A.(1992) Complement, neutrophil, and macrophage activation in women with severe preeclampsia and the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 79: 19-26.
- [47] Perry KG, Jr. and Martin JN, Jr. (1992) Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol*, 35: 338-350.
- [48] Konijnenberg A, Stokkers EW, van der Post JA, Schaap MC, Boer K, Bleker OP and Sturk A.(1997) Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol*, 176: 461-469.
- [49] Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC and Roberts JM.(1991) High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am J Obstet Gynecol*, 165: 895-901.
- [50] Gratacos E, Casals E, Deulofeu R, Cararach V, Alonso PL and Fortuny A.(1998) Lipid peroxide and vitamin E patterns in pregnant women with different types of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 178: 1072-1076.
- [51] Hubel CA.(1998) Dyslipidemia, iron, and oxidative stress in preeclampsia: assessment of maternal and feto-placental interactions. *Semin Reprod Endocrinol*, 16: 75-92.
- [52] Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D and Redman CW.(1995) Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 102: 20-25.
- [53] Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F and Macara LM.(1994) Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol*, 84: 937-940.

- [54] Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P and Engelmann M.(1995) Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions. *Reprod Fertil Dev*, 7: 1573-1580.
- [55] Arnaud P and Kalabay L.(2002) Alpha2-HS glycoprotein: a protein in search of a function. *Diabetes Metab Res Rev*, 18: 311-314.
- [56] Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP and Humbert G.(1979) Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest*, 64: 1118-1129.
- [57] Hruska KA, Saab G, Chaudhary LR, Quinn CO, Lund RJ and Surendran K.(2004) Kidney-bone, bone-kidney, and cell-cell communications in renal osteodystrophy. *Semin Nephrol*, 24: 25-38.
- [58] Srinivas PR, Wagner AS, Reddy LV, Deutsch DD, Leon MA, Goustin AS and Grunberger G.(1993) Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol*, 7: 1445-1455.
- [59] Lewis JG and Andre CM.(1981) Binding of alpha 2HS glycoprotein in peripheral blood monocytes. *Immunol Commun*, 10: 541-547.
- [60] Dziegielewska KM, Mollgard K, Reynolds ML and Saunders NR.(1987) A fetuin-related glycoprotein (alpha 2HS) in human embryonic and fetal development. *Cell Tissue Res*, 248: 33-41.
- [61] Redman CW and Sargent IL.(2009) Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, 30 Suppl A: S38-42.
- [62] Endo Y, Matsushita M and Fujita T.(2007) Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology*, 212: 371-379.
- [63] Endo Y, Matsushita M and Fujita T.(2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 705-712.
- [64] Matsushita M.(2010) Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun*, 2: 24-32.
- [65] Oksjoki R, Kovanen PT, Meri S and Pentikainen MO.(2007) Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Front Biosci*, 12: 4696-4708.

- [66] Abramson SB and Buyon JP.(1992) Activation of the complement pathway: comparison of normal pregnancy, preeclampsia, and systemic lupus erythematosus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 28: 183-187.
- [67] Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, Edwin S, Kim YM, Hong JS and Mazor M.(2005) Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 17: 239-245.
- [68] Tedesco F, Radillo O, Candussi G, Nazzaro A, Mollnes TE and Pecorari D.(1990) Immunohistochemical detection of terminal complement complex and S protein in normal and pre-eclamptic placentae. *Clin Exp Immunol*, 80: 236-240.
- [69] Lynch AM and Salmon JE.(2010) Dysregulated complement activation as a common pathway of injury in preeclampsia and other pregnancy complications. *Placenta*, 31: 561-567.
- [70] Holers VM, Kinoshita T and Molina H.(1992) The evolution of mouse and human complement C3-binding proteins: divergence of form but conservation of function. *Immunol Today*, 13: 231-236.
- [71] Sinha D, Wells M and Faulk WP.(1984) Immunological studies of human placentae: complement components in pre-eclamptic chorionic villi. *Clin Exp Immunol*, 56: 175-184.
- [72] Rampersad R, Barton A, Sadovsky Y and Nelson DM.(2008) The C5b-9 membrane attack complex of complement activation localizes to villous trophoblast injury in vivo and modulates human trophoblast function in vitro. *Placenta*, 29: 855-861.
- [73] Sjoberg AP, Trouw LA and Blom AM.(2009) Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol*, 30: 83-90.
- [74] Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H, Takahashi K, Yoshida M, Matsubara S and Suzuki M.(2010) Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. *Hypertens Res*, 33: 422-427.
- [75] Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B and Stepan H.(2010) An automated method for the

determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 202: 161 e1-161 e11.

[76] Lazar L, Nagy B, Ban Z, Nagy GR and Papp Z. (2006) Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem*, 52: 1599-1601.

[77] Kalabay L, Szalay F, Nemesanszky E, Telegdy L, Jakab L and Romics L. (1997) Decreased serum alpha2-HS-glycoprotein concentration in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*, 26: 1426-1427.

[78] Kalabay L, Jakab L, Prohaszka Z, Fust G, Benko Z, Telegdy L, Lorincz Z, Zavodszky P, Arnaud P and Fekete B. (2002) Human fetuin/alpha2HS-glycoprotein level as a novel indicator of liver cell function and short-term mortality in patients with liver cirrhosis and liver cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14: 389-394.

[79] Daveau M, Christian D, Julen N, Hiron M, Arnaud P and Lebreton JP. (1988) The synthesis of human alpha-2-HS glycoprotein is down-regulated by cytokines in hepatoma HepG2 cells. *FEBS Lett*, 241: 191-194.

[80] Hashimoto S, Miwa M, Akasofu K and Nishida E. (1991) Changes in 40 serum proteins of post-menopausal women. *Maturitas*, 13: 23-33.

[81] Caglar K, Yilmaz MI, Saglam M, Cakir E, Kilic S, Sonmez A, Eyiletten T, Yenicesu M, Oguz Y, Tasar M, Vural A, Ikizler TA, Stenvinkel P and Lindholm B. (2008) Serum fetuin-a concentration and endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract*, 108: c233-240.

[82] Osawa M, Tian W, Horiuchi H, Kaneko M and Umetsu K. (2005) Association of alpha2-HS glycoprotein (AHSG, fetuin-A) polymorphism with AHSG and phosphate serum levels. *Hum Genet*, 116: 146-151.

[83] Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M and Nordfors L. (2005) Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int*, 67: 2383-2392.

[84] Kalabay L, Cseh K, Benedek S, Fekete S, Masszi T, Herjeczki K, Pozsonyi T and Jakab L. (1991) Serum alpha 2-HS glycoprotein concentration in patients with hematological malignancies. A follow-up study. *Ann Hematol*, 63: 264-269.

- [85] Denecke B, Graber S, Schafer C, Heiss A, Woltje M and Jahnen-Dechent W.(2003) Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J*, 376: 135-145.
- [86] Briana DD, Boutsikou M, Gourgiotis D, Boutsikou T, Baka S, Marmarinos A, Hassiakos D and Malamitsi-Puchner A.(2008) Serum fetuin-A/alpha2-HS-glycoprotein in human pregnancies with normal and restricted fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 21: 826-830.
- [87] Kalabay L, Cseh K, Pajor A, Baranyi E, Csakany GM, Melczer Z, Speer G, Kovacs M, Siller G, Karadi I and Winkler G.(2002) Correlation of maternal serum fetuin/alpha2-HS-glycoprotein concentration with maternal insulin resistance and anthropometric parameters of neonates in normal pregnancy and gestational diabetes. *Eur J Endocrinol*, 147: 243-248.
- [88] Kalabay L, Jakab L, Cseh K, Pozsonyi T and Jakab LA.(1990) Correlations between serum alpha 2-HS-glycoprotein concentration and conventional laboratory parameters in systemic lupus erythematosus. *Acta Med Hung*, 47: 53-64.
- [89] Mathews ST, Deutsch DD, Iyer G, Hora N, Pati B, Marsh J and Grunberger G.(2002) Plasma alpha2-HS glycoprotein concentrations in patients with acute myocardial infarction quantified by a modified ELISA. *Clin Chim Acta*, 319: 27-34.
- [90] Jersmann HP, Dransfield I and Hart SP.(2003) Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci (Lond)*, 105: 273-278.
- [91] Shinagawa S and Saitoh M.(1983) A study on proteins contained in urine of gestosis patients. *Biol Res Pregnancy Perinatol*, 4: 140-144.
- [92] Kishore BK, Gejyo F and Arakawa M.(1983) Alpha 2HS-glycoprotein in the serum and urine of patients with renal diseases. *Postgrad Med J*, 59: 304-307.
- [93] Molvarec A, Ver A, Fekete A, Rosta K, Derzbach L, Derzsy Z, Karadi I and Rigo J, Jr. (2007) Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens Res*, 30: 205-211.
- [94] Rahman SA, Hingorani V and Laumas KR.(1975) Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placentae from normal and toxæmic pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 4: 333-341.

- [95] Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P and Lopez-Jaramillo P.(2001) Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 75: 243-249.
- [96] Ustun Y, Engin-Ustun Y and Kamaci M.(2005) Association of fibrinogen and C-reactive protein with severity of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 121: 154-158.
- [97] Tjoa ML, van Vugt JM, Go AT, Blankenstein MA, Oudejans CB and van Wijk IJ.(2003) Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod Immunol*, 59: 29-37.
- [98] Belo L, Santos-Silva A, Caslake M, Cooney J, Pereira-Leite L, Quintanilha A and Rebelo I.(2003) Neutrophil activation and C-reactive protein concentration in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 22: 129-141.
- [99] Qiu C, Sorensen TK, Luthy DA and Williams MA.(2004) A prospective study of maternal serum C-reactive protein (CRP) concentrations and risk of gestational diabetes mellitus. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 18: 377-384.
- [100] Lavebratt C, Wahlqvist S, Nordfors L, Hoffstedt J and Arner P.(2005) AHSG gene variant is associated with leanness among Swedish men. *Hum Genet*, 117: 54-60.
- [101] Haglund AC, Ek B and Ek P.(2001) Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem J*, 357: 437-445.
- [102] Karamessinis PM, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Makridakis M, Vougas K, Fountoulakis M, Vlahou A and Chrousos G.(2008) Marked defects in the expression and glycosylation of alpha2-HS glycoprotein/fetuin-A in plasma from neonates with intrauterine growth restriction: proteomics screening and potential clinical implications. *Mol Cell Proteomics*, 7: 591-599.
- [103] Caglar K, Yilmaz MI, Saglam M, Cakir E, Kilic S, Eyiletten T, Sonmez A, Oguz Y, Oner K, Ors F, Vural A and Yenicesu M.(2007) Endothelial dysfunction and fetuin A levels before and after kidney transplantation. *Transplantation*, 83: 392-397.
- [104] Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M and McKee MD.(2008) Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med (Berl)*, 86: 379-389.

- [105] Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ and London GM.(2001) Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*, 38: 938-942.
- [106] Tihtonen KM, Koobi T and Uotila JT.(2006) Arterial stiffness in preeclamptic and chronic hypertensive pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 128: 180-186.
- [107] Jakab L, Kalabay L, Pozsonyi T and Cseh K.(1991) The effect of the alpha 2-HS-glycoprotein on the mitogen-induced lymphoblastic transformation and IL-2 production. *Acta Physiol Hung*, 77: 25-31.
- [108] Ombrellino M, Wang H, Yang H, Zhang M, Vishnubhakat J, Frazier A, Scher LA, Friedman SG and Tracey KJ.(2001) Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock*, 15: 181-185.
- [109] Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M and Sasaki Y.(2007) The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*, 28: 192-209.
- [110] Demetriou M, Binkert C, Sukhu B, Tenenbaum HC and Dennis JW.(1996) Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J Biol Chem*, 271: 12755-12761.
- [111] Sibai B, Dekker G and Kupferminc M.(2005) Pre-eclampsia. *Lancet*, 365: 785-799.
- [112] Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A and Lassila O.(2004) Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*, 136: 373-378.
- [113] Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Casalis PA, Dudenhausen JW, Volk HD and Zenclussen AC.(2005) Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol*, 54: 384-389.
- [114] Hu D, Chen Y, Zhang W, Wang H, Wang Z and Dong M.(2008) Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87: 190-194.

- [115] Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J and Saito S.(2007) Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 149: 139-145.
- [116] Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzalak B and Oleszczuk J.(2007) Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 58: 39-45.
- [117] Toldi G, Svec P, Vasarhelyi B, Meszaros G, Rigo J, Tulassay T and Treszl A.(2008) Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87: 1229-1233.
- [118] Miko E, Szereday L, Barakonyi A, Jarkovich A, Varga P and Szekeres-Bartho J.(2009) Immunoactivation in preeclampsia: Vdelta2+ and regulatory T cells during the inflammatory stage of disease. *J Reprod Immunol*, 80: 100-108.
- [119] Nishioka T, Shimizu J, Iida R, Yamazaki S and Sakaguchi S.(2006) CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J Immunol*, 176: 6586-6593.
- [120] Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE and Ansell SM.(2007) CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells. *Blood*, 110: 2537-2544.
- [121] Derzsy Z, Prohaszka Z, Rigo J, Jr., Fust G and Molvarec A.(2010) Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol*, 47: 1500-1506.
- [122] Feinberg BB, Jack RM, Mok SC and Anderson DJ.(2005) Low erythrocyte complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression in preeclamptic gestations. *Am J Reprod Immunol*, 54: 352-357.
- [123] Feinberg BB.(2006) Preeclampsia: the death of Goliath. *Am J Reprod Immunol*, 55: 84-98.
- [124] van de Geijn FE, Roos A, de Man YA, Laman JD, de Groot CJ, Daha MR, Hazes JM and Dolhain RJ.(2007) Mannose-binding lectin levels during pregnancy: a longitudinal study. *Hum Reprod*, 22: 362-371.
- [125] Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigo B, Szabo G, Papp Z, Linhares IM and Witkin SS.(2007) 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*, 13: 281-285.

[126] 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 and Papp Z.(2008) A role for mannose-binding lectin, a component of the innate immune system in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 60: 333-345.

[127] Celik N and Ozan H.(2008) Maternal serum mannose-binding lectin in severe preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 35: 179-182.

[128] Wang CC, Yim KW, Poon TC, Choy KW, Chu CY, Lui WT, Lau TK, Rogers MS and Leung TN.(2007) Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia. *Clin Chem*, 53: 42-52.

[129] van de Geijn FE, Dolhain RJ, van Rijs W, Hazes JM and de Groot CJ.(2007) Mannose-binding lectin genotypes and pre-eclampsia: a case-control study. *Hum Immunol*, 68: 888-893.

[130] Csuka D, Molvarec A, Derzsy Z, Varga L, Fust G, Rigo J, Jr. and Prohaszka Z.(2010) Functional analysis of the mannose-binding lectin complement pathway in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 87: 90-96.

[131] Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M and Mizuochi T.(1996) A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem*, 271: 2448-2454.

[132] Taira S, Kodama N, Matsushita M and Fujita T.(2000) Opsonic function and concentration of human serum ficolin/P35. *Fukushima J Med Sci*, 46: 13-23.

[133] Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M and Fujita T.(2005) Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology*, 209: 689-697.

[134] Jensen ML, Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO and Garred P.(2007) Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol*, 44: 856-865.

[135] Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P and Garred P.(2007) The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum*, 56: 1598-1607.

- [136] Nelson DM.(1996) Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta*, 17: 387-391.
- [137] Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS and Baker PN.(2001) Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 184: 1249-1250.
- [138] Jones CJ and Fox H.(1980) An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. *Placenta*, 1: 61-76.
- [139] Huppertz B.(2008) Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*, 51: 970-975.
- [140] Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ and Redman CW.(1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*, 45: 184-188.
- [141] Johansen M, Redman CW, Wilkins T and Sargent IL.(1999) Trophoblast deportation in human pregnancy--its relevance for pre-eclampsia. *Placenta*, 20: 531-9.
- [142] Redman CW and Sargent IL.(2008) Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*, 29 Suppl A: S73-77.
- [143] Guller S, Tang Z, Ma YY, Di Santo S, Sager R and Schneider H.(2011) Protein composition of microparticles shed from human placenta during placental perfusion: Potential role in angiogenesis and fibrinolysis in preeclampsia. *Placenta*, 32: 63-69.
- [144] Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, Zsengeller Z, Edmunds L, Jeyabalan A, Hubel CA, Stillman IE, Parikh SM and Karumanchi SA.(2012) Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension*, 59: 256-264.
- [145] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP and Karumanchi SA.(2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350: 672-683.
- [146] Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B and Rigo J, Jr. (2010) Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. *Hypertens Res*, 33: 892-898.

- [147] Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, Stahl GL, Matsushita M, Fujita T, van Kooten C and Daha MR. (2006) Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 17: 1724-1734.
- [148] Atkinson AP, Cedzynski M, Szemraj J, St Swierzko A, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, Matsushita M, Turner ML and Kilpatrick DC. (2004) L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol*, 138: 517-520.
- [149] Cedzynski M, Nuytinck L, Atkinson AP, St Swierzko A, Zeman K, Szemraj J, Szala A, Turner ML and Kilpatrick DC. (2007) Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin Exp Immunol*, 150: 99-104.
- [150] Kilpatrick DC, Chalmers JD, MacDonald SL, Murray M, Mohammed A, Hart SP, Matsushita M and Hill A. (2009) Stable bronchiectasis is associated with low serum L-ficolin concentrations. *Clin Respir J*, 3: 29-33.
- [151] Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M, Macdonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Matsushita M, Szemraj J, Turner ML and Kilpatrick DC. (2009) Two factors of the lectin pathway of complement, l-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Mol Immunol*, 46: 551-558.
- [152] Svendsen CB, Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Milman N, Garred P, Laursen IA, Christiansen M and Kroghfelt KA. (2008) Ficolins and Mannose-Binding Lectin in Danish patients with sarcoidosis. *Respir Med*, 102: 1237-1242.
- [153] Schlapbach LJ, Aebi C, Hansen AG, Hirt A, Jensenius JC and Ammann RA. (2009) H-ficolin serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in paediatric cancer patients. *Clin Exp Immunol*, 157: 83-89.
- [154] Schlapbach LJ, Mattmann M, Thiel S, Boillat C, Otth M, Nelle M, Wagner B, Jensenius JC and Aebi C. (2010) Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis. *Clin Infect Dis*, 51: 153-162.
- [155] Fust G, Munthe-Fog L, Illes Z, Szeplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Szeplaki Z, Prohaszka Z, Skjoedt MO and Garred P. (2011) Low ficolin-3

levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*, 8: 185.

[156] Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Fujita T, Matsushita M and Garred P.(2005) Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet*, 14: 1651-1658.

[157] Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Ma YJ, Hansen BE, Koch C, Madsen HO, Skjodt K and Garred P.(2008) Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. *Mol Immunol*, 45: 2660-2666.

[158] Messias-Reason IJ, Schafranski MD, Kremsner PG and Kun JF.(2009) Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Exp Immunol*, 157: 395-399.

[159] de Rooij BJ, van der Beek MT, van Hoek B, Vossen AC, Rogier Ten Hove W, Roos A, Schaapherder AF, Porte RJ, van der Reijden JJ, Coenraad MJ, Hommes DW and Verspaget HW.(2011) Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol*, 55: 800-807.

[160] Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Honore C, Madsen HO, Permin H and Garred P.(2009) Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. *N Engl J Med*, 360: 2637-2644.

[161] Molvarec A, Prohaszka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Fust G, Karadi I and Rigo J, Jr. (2007) 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*, 73: 172-179.

[162] Molvarec A, Jermendy A, Nagy B, Kovacs M, Varkonyi T, Hupuczi P, Prohaszka Z and Rigo J, Jr. (2008) Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *Clin Chim Acta*, 392: 52-57.

[163] Molvarec A, Rigo J, Jr., Lazar L, Balogh K, Mako V, Cervenak L, Mezes M and Prohaszka Z.(2009) Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic

inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*, 14: 151-159.

[164] Rosta K, Molvarec A, Enzsoly A, Nagy B, Ronai Z, Fekete A, Sasvari-Szekely M, Rigo J, Jr. and Ver A. (2009) Association of extracellular superoxide dismutase (SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 142: 134-138.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Molvarec A, Kalabay L, Derzsy Z, Szarka A, **Halmos A**, Stenczer B, Arnaud P, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. (2009) Preeclampsia is associated with decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein (fetuin-A) concentration. *Hypertens Res*, **32**: 665-669. (IF: 2.426)
2. **Halmos A**, Rigó J Jr, Szijártó J, Füst G, Prohászka Z, Molvarec A. (2012) Circulating ficolin-2 and ficolin-3 in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, **169**:49-56. (IF: 3.409)
3. Toldi G, Saito S, Shima T, **Halmos A**, Veresh Z, Vasarhelyi B, Rigo J Jr, Molvarec A. (2012) The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, **68**:175-180. (IF: 3.317)

Az értekezés témájától független közlemények

1. Urbancsek J, Hauzman E, Fedorcsák P, **Halmos A**, Dévényi N, Papp Z. (2002) Serum human chorionic gonadotropin measurements may predict pregnancy outcome and multiple gestation after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **78**:540-542. (IF: 3.202)
2. **Halmos A**, Hargitai B, Demeter A, Papp Z. (2005) Praenatalisan diagnosztizált placentaris chorioangioma. *Magy Nőorv L*, **68**:53-55.
3. Sziller I, Nguyen D, **Halmos A**, Hupuczi P, Papp Z, Witkin SS. (2005) An A> G polymorphism at position-670 in the Fas (TNFRSF6) gene in pregnant women with pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Mol Hum Reprod*, **11**:207-210. (IF: 3.191)
4. **Halmos A**, Fekete T, Csabay L, Belics Z, Szabó I, Csapó Zs. (2006) Chorioangiomával szövődött terhességek klinikánk 15 éves anyagában. *Magy Nőorv L*, **69**:115-119.

5. Sziller I, Hupuczi P, Normand N, **Halmos A**, Papp Z, Witkin SS. (2006) Fas (TNFRSF6) gene polymorphism in pregnant women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets and in their neonates. *Obstet Gynecol*, **107**:582-587. (IF: 3.813)
6. **Halmos A**, Bán Z, Tóth M, Rigó J Jr. (2009) Hypophosphatasiát hordozó asszony két terhességének esete *Magy Nőorv L*, **72**:189-191.

Összegzett impakt faktor: 19.358

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni Rigó János professzor úrnak, aki támogatásával és segítségével mindvégig biztosította kutatási munkám eredményességét.

Hálával és köszönettel tartozom Dr. Molvarec Attila egyetemi adjunktus úrnak, témavezetőmnek, aki a kezdetektől az utolsó lépésekig szakértelemmel és gondossággal kísérte végig és segítette munkámat.

Köszönetet mondok Szijártó Jánosnak, Toldi Gergelynek, Prohászka Zoltánnak, Nagy Bálintnak, Lázár Leventének, Makó Veronikának, Cervenak Lászlónak, Walentin Szilviának és Szigeti Antalnénak a laboratóriumi meghatározásokban nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak, akik támogatásukkal lehetővé tették tudományos munkám végzését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom türelmét, és a munkához szükséges nyugodt háttér biztosítását.