

A B típusú natriureticus peptid szerepének vizsgálata súlyos praeclampsia kialakulásában

Dr. Szabó Gábor

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy Bálint Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Kiscsitári István Ph.D., osztályvezető főorvos,
Dr. Szabó Viktória Ph.D., klinikai orvos

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hernádi László Ph.D., osztályvezető főorvos,
Dr. Patócs Attila Ph.D., egyetemi docens,

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	5
Táblázatok jegyzék	6
Rövidítések jegyzéke	8
1. Bevezetés	10
1.1. A natriureticus peptidek szerepe praeclampsziában	11
1.2. A natriureticus peptidcsalád tagjainak molekulaszervezete és az őket kódoló gének jellemzői	15
1.3. A natriureticus peptidek szöveti eloszlása és génexpressziója	18
1.4. A natriureticus peptidek hatásmechanizmusa és receptorai	20
1.5. A natriureticus peptidek szekrécióját befolyásoló tényezők	22
1.6. A natriureticus peptidek fő biológiai hatásai	24
1.7. A BNP élettani szintjeinek változása az életkor és nem függvényében	28
1.8. A natriureticus peptidek etiológiai szerepe nem szülészeti kórképek hátterében	29
1.8.1. Szívelégtelenség	29
1.8.2. Akut miokardiális infarktus	31
1.8.3. Magas vérnyomás, bal kamra hipertrófia	31
1.8.4. Szupraventrikuláris tachycardia	32
1.8.5. Pulmonáris hipertónia	32
1.8.6. Szeptikus shock	33
1.8.7. Akut és krónikus veseelégtelenség	33
1.8.8. Cerebrális sóvesztő szindróma	33
1.8.9. Májcirrózis	34
2. Célkitűzések	35
3. Módszerek	37
3.1. A vizsgálatok helyszíne	37
3.2. A vizsgálatokba bevont betegek	37
3.3. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n polimorfizmusának vizsgálata	38
3.3.1. Genomiális DNS izolálása perifériás vérből	38

3.3.2. A (TTTC) _n polimorfizmus meghatározása	40
3.4. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének meghatározása	44
3.5. Biokémiai markerek	47
3.6. Statisztikai módszerek	48
3.7. A vizsgálatok etikai vonatkozásai	49
4. Eredmények	50
4.1. A vizsgálatokba bevont betegek jellemzése	50
4.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának meghatározása súlyos praeclampsiás és egészséges terhesek között	51
4.3. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának meghatározása súlyos praeclampsiás és egészséges terhesek között	53
4.4. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek meghatározása súlyos praeclampsiás és egészséges terhesek között	56
4.5. A natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei közötti összefüggések vizsgálata	58
4.6. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek között	60
4.6.1. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek között	60
4.6.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek között	61
4.6.3. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek összehasonlítása a korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek körében	63
4.7. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus és az intrauterin magzati retardáció közötti kapcsolat vizsgálata súlyos praeclampsiás terhesek körében	63

4.7.1. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának és az intrauterin magzati retardáció előfordulásának vizsgálata súlyos praeclampsziás terhesek között	64
4.7.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának és az intrauterin magzati retardáció előfordulásának vizsgálata súlyos praeclampsziás terhesek között	65
4.7.3. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek vizsgálata az intrauterin magzati retardáció függvényében	69
4.8. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek és a praeclampsia klinikai tüneteinek illetve a betegséget jellemző laboreltérések közötti összefüggések vizsgálata	69
4.9. A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának (cut-off point) meghatározása súlyos praeclampsziás betegeknél	74
5. Megbeszélés	77
5.1. A natriureticus peptid prekursor B gén promoter régiójában leírt (TTTC) _n nukleotid szekvencia polimorfizmus szerepe	78
5.2. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintek jelentősége praeclampsziában	80
5.3. A korai kezdetű praeclampsia és a B típusú natriureticus peptid kapcsolata	81
5.4. A méhen belüli retardáció és a B típusú natriureticus peptid kapcsolata	83
5.5. A B típusú natriureticus peptid és a szérum összfehérje szint kapcsolata	86
5.6. A B típusú natriureticus peptid diagnosztikai jelentősége és prognosztikai szerepe	87
6. Következtetések	90
7. Összefoglalás	93
8. Summary	95
9. Irodalomjegyzék	97
10. Saját publikációk jegyzéke	115
10.1. A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények	115
10.2. Egyéb közlemények jegyzéke	116
11. Köszönetnyilvánítás	118

Ábrajegyzék

1. ábra:	A natriureticus peptidek szerkezete	16
2. ábra:	A DNS izolálására alkalmazott High Pure PCR Template Isolation kit	40
3. ábra:	ABI 9700 Thermal Cycler készülék	41
4. ábra:	ABI 3130 Genetic Analyser génszekvenáló készülék	42
5. ábra:	Natriureticus peptid prekursor B gén hosszpolimorfizmus analízis GeneScanner program segítségével.	43
6. ábra:	Triage Meter többfunkciós mérőeszköz	46
7. ábra:	Egyszerhasználatos, eldobandó BNP-re specifikus műanyag reagensbetét Triage Meter készülékhez	46
8. ábra:	A Triage Meter BNP-re specifikus EPROM chipje	47
9. ábra:	A genotípusok eloszlása a vizsgált súlyos praeclamsiás és a normotóniás kontroll csoportokban	55
10. ábra:	Normotóniás terhesek és súlyos praeclamsiás betegek plazma BNP szintjeinek összehasonlítása	58
11. ábra:	Normotóniás terhesek és korai-, illetve késői kezdetű praeclamsiás betegek plazma BNP szintjeinek összehasonlítása	71
12. ábra:	A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának meghatározása korai kezdetű praeclamsiás és egészséges terhesek között ROC görbe analízissel	75
13. ábra:	A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának meghatározása késői kezdetű praeclamsiás és egészséges terhesek között ROC görbe analízissel	76

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat:	A natriureticus peptidcsalád tagjainak termelődési helye, molekuláris súlya és natriureticus hatása	11
2. táblázat:	A natriureticus peptidek élettani hatásai a különböző szervekben	28
3. táblázat:	A vizsgálatban részt vevő páciensek klinikai adatai	51
4. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása praeclampsiás és egészséges gravidák között	52
5. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések genotípus eloszlása praeclampsiás és egészséges gravidák között	54
6. táblázat:	A 11 homozigóta és a 11 heterozigóta genotípusok eloszlásának összehasonlítása a vizsgált csoportokban	56
7. táblázat:	A plazma BNP szintek összehasonlításában részt vevő páciensek klinikai adatai	57
8. táblázat:	Az NPPB gén 5' régiójában található (TTTC) _n tandem polimorfizmus genotípusainak és a BNP plazmaszintjeinek összehasonlítása	59
9. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása korai és késői kezdetű praeclampsiások között	61
10. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések genotípus eloszlása korai és késői kezdetű praeclampsiások között	62
11. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása súlyos praeclampsiások között az intrauterin magzati retardáció függvényében	65
12. táblázat:	A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések genotípuseloszlása súlyos praeclampsiások között az intrauterin magzati retardáció függvényében	66

13. táblázat: A 11 homozigóta és a 11 heterozigóta genotípusok eloszlásának összehasonlítása az intrauterin magzati retardáció függvényében	68
14. táblázat: A plazma BNP szintek és a klinikai paraméterek összehasonlításában részt vevő páciensek klinikai adatai	70
15. táblázat: Az egészséges terhesek és a praeclampsiás betegek biokémiai labor paramétereinek értékei	73

Rövidítések jegyzéke

ACE	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
ACTH	adrenokortikotróp hormon
ANP	pitvari (atriális, A-típusú) natriureticus peptid
AT-1	angiotenzin II 1-típusú receptorai
AT-1AA	angiotenzin II 1-típusú receptorai ellen termelődött agonista
antitestek	
AVP	arginin vazopresszin
BMI	testtömegindex (body mass index)
BNP	agyi (brain, B-típusú) natriureticus peptid
cGKI	cGMP dependens kináz-1
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CI	konfidencia-intervallum (confidence interval)
CNP	C-típusú natriureticus peptid
CV	variációs koefficiens (coefficient of variation)
DIC	disszeminált intravaszkuláris koaguláció (disseminated intravascular coagulation)
DNP	dendroaspis natriureticus peptid
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EOP	korai kezdetű (early onset) praeclampsia
HELLP	hemolízis, emelkedett májenzimek, illetve csökkent vérlemezkeszám által jellemzett kórkép (h aemolysis, e levated liver enzymes, l ow p latelet count)
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
IUGR	méhen belüli magzati növekedési retardáció (intrauterine growth restriction)
IUGR 3 percentilis	3 percentilis alatti súllyal világra jött újszülöttek
IUGR 10 percentilis	10 percentilis alatti súllyal világra jött újszülöttek

LOP	késői kezdetű (late onset) praeclampsia
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
MBL	mannóz-kötő lektin (mannose-binding lectin)
MSH	melanocytákat stimuláló hormon
NEP	neutrális endopeptidáz
NPPB	natriureticus peptid prekursor B gén
NPR	natriureticus peptid receptor
NT-proANP	ANP prohormon N-terminális fragmentje
NT-proBNP	BNP prohormon N-terminális fragmentje
NYHA	New York Heart Association
OR	esélyhányados (odds ratio)
PAI-1	plazminogen aktivátor inhibitor-1
PE	praeclampsia
PP13	placentáris protein 13 (galectin 13)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PIGF	lepényi (placentáris) eredetű növekedési faktor (placental growth factor)
POMC	proopiomelanokortin
RAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system)
ROC	receiver operating characteristic
sflt-1	szolubilis fms-szerű tirozin receptor-1
SSCP	egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálat (single-strand conformation polymorphism)
STR	rövid tandem ismétlődések (small tandem repeats)
TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)
TNF	tumor nekrozis faktor
VASP	vazodilatátor stimulált foszfoprotein
VEGF	vaszkuláris endotél eredetű növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

1. Bevezetés

A natriureticus peptidcsaládot több szerkezetileg hasonló molekula alkotja. Ezek közé tartozik az atrialis natriureticus peptid (ANP), a B (brain) típusú natriureticus peptid (BNP), a C típusú natriureticus peptid (CNP), valamint a dendroaspis natriureticus peptid (DNP), illetve az urodilatin. Ezek a molekulák a szervezet folyadéktereinek homeosztázisának fenntartásában, illetve a vérnyomás szabályozásban is jelentős szerepet játszanak. Az 1950-es években születtek az első eredmények, melyek megalapozták a feltételezést, hogy a szív endokrin funkciókkal is rendelkezik. Kirsch már 1956-ban elektronmikroszkóppal emlősállatok – tengerimalacok – pitvari szívműködésében olyan granulomákat írt le, melyek jelentős hasonlóságot mutattak az endokrin sejtek szekréciónak granulumaival [1]. Ebben az évtizedben más kutatók leírták, hogy a negatív nyomású lélegeztetés és a megemelkedett vértérfogat hatására fokozódó vizeletelválasztás a bal pitvar ballonos tágításával is kiváltható kutyákban [2]. A hatást a pitvarban elhelyezkedő feszülésreceptoroknak tulajdonították [3].

Később De Bold és mtsai. feltételezték, hogy a pitvari szívműködésben talált granulomák nem katekolaminok hanem peptidok vagy fehérjék tárolására szolgálhatnak [4]. 1981-ben De Bold és munkatársai kísérletükben pitvari miokardiumból készült oldatot infundáltak patkányokba és nagymértékű, gyors diureticus és natriureticus válaszreakciót észleltek. A pitvari miokardiumból készített kivonat hatására a nátriumkiválasztás harmincszorosára, a vizeletelválasztás egyidejűleg tízszeresére emelkedett a kísérleti állatokban. A szerzők a megfigyelést a pitvari szívműködés kivonatának a vese tubuláris nátrium-reabszorpciójára kifejtett gátló hatásával magyarázták. A kamrából származó szívműködés kivonatok esetében nem találtak hasonló változást [5]. A reakcióért felelős, 28 aminosavból álló peptid (atrialis natriureticus peptid, ANP) molekulászerkezetét Kangawa és Matsuo 1984-ben írta le [6].

A B típusú natriureticus peptidet (BNP) 1988-ban Sudoh és munkatársai izolálták először sertésagyból, innen kapta az elnevezést [7]. Később azonban igazolták, hogy a 32 aminosavból álló molekulát főleg a balkamra szívműködés sejtjei termelik. Az ezt követő években a natriureticus peptidcsalád újabb tagjait írták le. Ezek közé tartozik az 1990-ben felfedezett C típusú natriureticus peptid (CNP) [8]. Ez egy 22 aminosavból álló peptid, mely elsősorban a központi idegrendszerben és az erek endotél sejtjeiben

fordul elő. A vérplazmában szintje alacsony. A 38 aminosavból álló dendroaspis natriureticus peptidet (DNP) a zöld mamba (*Dendroaspis angusticeps*) mérgéből izolálták először 1992-ben [9]. Ez a molekula az emberi szervezetben a pitvari szívizomsejtekben és a vérplazmában mutatható ki. A vesetubulusok sejtjeiben az ANP prekursorának (proANP) speciális hasadása révén egy 32 aminosavból álló polipeptid, az urodilatin jön létre, mely a vesében fejt ki hatását (1. táblázat).

A család minden tagja nagy molekulásúlyú polipeptid prekursorokból jön létre. Ezek a prekursorok intracellulárisan átalakulásokon, hasításokon mennek keresztül és így érik el a biológiailag aktív formájukat. Habár a prekursor prohormonok különböző gének termékei, mindegyik molekula tartalmaz egy 17 aminosavból álló cisztein-cisztein diszulfidkötést tartalmazó gyűrűt. A gyűrű aminosav molekuláiból 11 identikus [10].

	Elsődleges termelődési hely	Molekuláris súly (Da)	Natriureticus hatás
ANP	Pitvari miokardium	3078	+
BNP	Kamrai miokardium	3462	+
CNP	Endotél sejtek, Központi idegrendszer	2198	-
DNP	Pitvari miokardium, Kígyóméreg	4191	+
Urodilatin	Vese	3503	+

1. táblázat: A natriureticus peptidcsalád tagjainak termelődési helye, molekuláris súlya és natriureticus hatása

1.1. A natriureticus peptidek szerepe praeclampszában

A praeclampsia napjainkban is a terhesség alatt kialakuló egyik legsúlyosabb kórkép, melynek előfordulási aránya 5-7% [11]. A praeclampsia, mint többszervi betegség, a placentációra adott kóros vaszkuláris reakció következtében létrejövő számos anyai és magzati tünetként jelentkezik. A szisztémás érellenállás növekedése, a vérárvadási rendszer aktivációja, a trombocita aggregáció fokozódása és az endotél

sejtek működési zavara részei a kórképnek. Az anyai szövődmények között kiemelhető az agyvérzés, agyödéma, eclampsia, lepényleválás, a DIC, a HELLP szindróma illetve a bal szívfelelétlenség kapcsán kialakuló tüdőödéma. A magzatokat leggyakrabban veszélyeztető szövődmények a súlyos praeclampsziában 60%-os arányt meghaladó koraszülés és a 15% feletti méhen belüli retardáció [12]. A magzati tünetegyüttes hátterében az uteroplacentáris keringés beszűkülése, a méhen belüli hipoxiát, krónikus magzati distresszt és végzetes esetben intrauterin magzati elhalást okozó nutritív és oxidatív zavar áll.

Az utóbbi évtizedek során a praeclampsia incidenciája nem csökkent a témában indult számos vizsgálat és kutatás ellenére [13]. A számos kórélettani folyamat részleteinek megértése tudományos kihívást jelent. Ismereteink szerint a praeclampsia felosztásában elkülöníthetünk egy anyai (maternális) és egy lepényi (placentáris) betegséget [14]. A maternális formában, a már a terhesség előtt mikrovaszkuláris eltérésekkel rendelkező, vagy arra hajlamos (krónikus magas vérnyomás, diabetes mellitus, stb. által érintett) anyai szervezet és az egészséges lepény kölcsönhatása révén alakulnak ki a tünetek. A lepényi formában, a hipoxiás körülmények között kialakult, kórosan fejlődő, oxidatív stressznek kitett placenta tehető felelőssé a betegség létrejöttéért. A kórkép megjelenésének ideje alapján megkülönböztethető a 34. terhességi hét betöltése előtti „korai kezdetű” (early onset) és az ezután kialakuló „késői kezdetű” (late onset) praeclampsia. A két kórkép szövődmenyprofilja eltérést mutat [15,16].

A praeclampsia rizikótényezői közé tartozik az anya kórelőzményében fennálló krónikus betegségeken kívül, a családi anamnézisében szereplő - lánytestvérnél, vagy édesanyánál jelentkező – praeclampsia. A 20 év alatti, illetve 35 év feletti anyai életkor szintén kockázati tényező. A primiparitás a praeclampsziások között gyakrabban fordul elő. Ez a jelenség ismert a praeclampsia patológiájában és számos vizsgálat próbálta a különböző immunológiai faktoroknak a kórkép patogenezisében játszott szerepének mértékét megmagyarázni [17,18]. Az immunológiai modell szerint a praeclampsia az anya és a magzat, mint két genetikailag különböző szervezet kapcsolatának zavara.

A vaszkuláris és az immunológiai elméletek kapcsolata a betegség kialakulásának korai fázisában a citotrofoblaszt sejtekre az anyai immunrendszer atípusos, kifejezett immunválasza, valamint ezzel párhuzamosan az anyai spirális

artériák átalakulásának, illetve a citotrofoblaszt invázióinak, decidualizációinak a nem megfelelő mértéke.

A citotrofoblasztok epiteliális-endoteliális átalakulásának (switching) hiánya kóros placentációhoz vezet, amennyiben a „pseudovasculogenesis” zavara miatt az artériák kapacitása szűk, érellenállása magas marad. A lepény vérellátása ezáltal elégtelenné válik. A következményes hipoxiás és reperfüziós, reoxigenizációs epizódok váltakozása a károsodott sejtekből oxidatív szabad gyökök felszabadulását váltja ki, ami fokozza a lepényi károsodást, csökkentve a sejtek fehérjeszintézisét és az endoplazmatikus retikulum működését [19,20]. A betegség második fázisában a fenti folyamatok hatására a szinciotrofoblaszt rendszer károsodik és az intervillózus térből az anyai keringésbe számos törmelék jut be („toxinok”-toxaemiás elmélet). Az anyai szervezet erre a folyamatra gyulladásos mediátorok, citokinek felszabadításával reagál, melynek apoptotikus hatása van. A törmelékben a szinciotrofoblaszt membrán részek, illetve szabad magzati DNS mellett számos lepényi eredetű antiangiogén faktor is található. Ilyenek a vaszkuláris eredetű növekedési faktor (VEGF) receptorának szolubilis formája (szolubilis fms-szerű tirozin receptor-1, sFlt-1), illetve a szolubilis endoglin. Az előbbi a VEGF mellett a placentáris eredetű növekedési faktort (PlGF), az utóbbi a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) molekulákat megkötve bír antiangiogén hatással. A praeeclamsiás betegek kifejezett gyulladásos válaszreakciója az endotélsejtek károsodása és a társuló vazokonstriktió révén vezet a klinikai tünetek megjelenéséhez [21].

Az endotélsejtek fokozott aktivációja, illetve károsodása az érösszehúzó hatással bíró endotelin-1 felszabadulásához vezet. Ez a molekula in vitro kísérletekben az erek endotélsejtjeinek proliferációját és migrációját gátolja, in vivo pedig működésbeli zavarukhoz vezet. Az endotelin-1, a natriureticus peptidok szintézisének fontos kiváltó tényezője. Normotóniás terhességben az endotelin-1 szint nem változik a terhesség előtti állapothoz képest. Praeeclamsiás terhességben, illetve HELLP szindrómában szignifikánsan emelkedett endotelin-1 szinteket találtak [22,23,24,25].

A terhesség ideje alatt megemelkedik a renin, az angiotenzin II és az aldoszteron plazmaszintje. A decidua, illetve a placenta is forrása a fenti molekuláknak. A normotóniás várandós nők refrakterek ezekre a funkcionális átalakulásokra. Ennek az ellenállásnak a hátterében valószínűleg a megemelkedett prosztaglandin és prosztaciklin

szintek miatt kialakult csökkent angiotenzin szenzitivitás állhat. Így a megemelkedett intravaszkuláris térfogat ellenére a balkamra végdiasztolés nyomás nem növekszik számottevően. Praeclampsziában ez az egyensúly eltolódik. Az értágító mechanizmusok beszűkülése, érösszehúzódáshoz, vazokonstrikciónhoz vezet. Jóllehet a praeclampsziás terheseknél a renin, az angiotenzin I és aldosteron szint alacsonyabb, mint az egészségeseknél, de a praeclampsziások mellékvesekérge és érrendszere érzékenyebb az angiotenzin II-re. Praeclampsziásoknál az angiotenzin II 1-típusú (AT-1) receptora a bradykinin receptorral együtt heterodimer, aktív formában fordul elő, ellentétben a normotóniás terhesek kevésbé aktív monomer receptor formájával [26,27]. A trofoblaszt sejtek membránja praeclampsziásokban gazdag az angiotenzin II 1-típusú (AT1) receptoraiban. A termelődött agonista antitestek (AT1-AA) a receptoron keresztül számos gén aktivitását befolyásolják, így a plazminogen aktivátor inhibitor-1, (PAI-I) és az sFlt-1 génét is. Praeclampsziás terhességekben az angiotenzin II termelődését serkenti a szinciotrofoblasztokban is képződő kimáz enzim működésének fokozódása. A kimáz (kimotripsinszerű szerin proteáz) enzim az angiotenzin II, angiotenzin-konvertáló enzimtől (ACE) független létrehozása mellett az endotelin-1 képződésében is részt vesz [28,29].

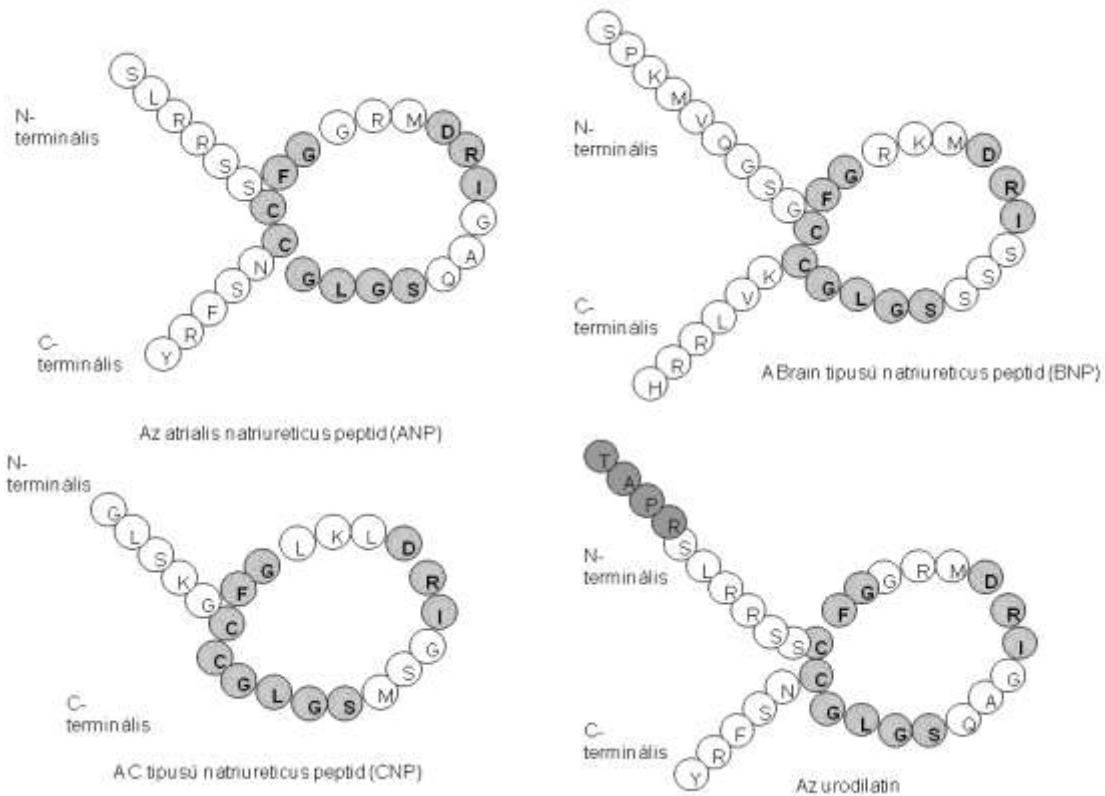
Egészséges gravidáknál a BNP plazmaszintje hasonló az egészséges nem terhes nőkéhez, a 20 pg/ml alatti szintet nem haladja meg. Az egymást követő trimeszterekben a BNP termelődése nem mutat jelentős ingadozást. A terhesség alatt jelentkező magas vérnyomás (gesztációs hipertónia) során a plazma BNP szintjének szignifikáns emelkedését írták le a normotenzívekhez képest [30]. Súlyos praeclampsziás betegeknek a BNP szintje emelkedett és jól korrelál a kamrai túlterhelődéssel [31,32,33,34]. Tihtonen és munkatársai praeclampsziás, krónikus hipertóniás és normotenzív gravidákat összehasonlítva, a praeclampsziások között találták a legmagasabb Nt-pro-ANP és Nt-pro-BNP plazmaszinteket a terhesség harmadik trimeszterében [35]. Ebben a terhességi korban a CNP szintje nem emelkedett a praeclampsziás terhes nők vérében, de az Nt-pro-CNP igen [36,37]. A natriureticus peptid precursor B gén 5' széli régiójában a TTTC nukleotid szekvencia tandem ismétlődését írták le korábban, amely összefüggésben áll nők körében az esszenciális magas vérnyomással [38]. Ennek az NPPB gén promoter régiójában található mikroszatellita polimorfizmusnak a praeclampsziában betöltött szerepét, illetve a génpolimorfizmusnak és a BNP

plazmaszintjének a kapcsolatát tudomásunk szerint előttünk más még nem vizsgálta [39,40].

1.2. A natriureticus peptidcsalád tagjainak molekulaszervezete és az őket kódoló gének jellemzői

A natriureticus peptidek génjei nagyfokú hasonlóságot mutatnak felosztásukban, exon-intron elrendeződésükben. Ezek a jellegzetességek közös eredetükre utalnak. Míg az alapvetően szívben keletkező ANP és BNP génje az 1. kromoszómán, egymástól viszonylag kis távolságra található, addig az eltérő működést, elsősorban idegrendszeri hatást kifejtő peptidet, a CNP-t kódoló gént a 2. kromoszómán elkülönülten írták le [41].

A molekulák szerkezetében a 17 aminosavból álló cisztein-cisztein diszulfidkötést tartalmazó gyűrű jelenti a közös pontot. Ez elengedhetetlen feltétele a receptorokhoz való kötődésnek. Az amino-, vagy a karboxi-terminálishoz közeli, a gyűrűn kívül elhelyezkedő aminosavak – láncok – számottevően különböznek az egyes molekulák között. A CNP esetében a karboxi-terminális lánc teljesen hiányzik. A BNP esetében a karboxi-terminális lánc összetétele befolyásolja a működést és az egyes fajok között jelentős eltérések mutatkoznak (1. ábra).



1. ábra: A natriureticus peptidek szerkezete

A világosszürkével jelzett aminosavak a gyűrű homolog szekvenciáit jelzik.

Az ANP génje az 1. kromoszómán helyezkedik el és három exont tartalmaz. Az első exon az 5' vég nem transzlálódó régióját, egy 25 aminosavból álló szignálpeptidet és a proANP első 16 aminosav részletét kódolja. A második számú exon a proANP szekvenciájának nagyrészt tartalmazza. Végül a harmadik exon a terminális tirozint és a 3' nem transzlálódó régiót kódolja. Az ANP gén transzkripciója során létrejött mRNS a 151 aminosavból álló preproANP-vé transzlálódik. Erről egy 25 aminosavból álló szignálpeptid eltávolításra kerül és így jön létre a proANP (γ ANP). A pitvari és a kamrai szövetekben ez az ANP forma található. A 126 aminosavból felépülő proANP-t (γ ANP), biológiailag inaktív propeptidet az endoplazmatikus retikulum endoproteázai (membrán szerin proteázok, corin) hasítják a szekréció során. Ezáltal létrejön az aktív C-terminális fragmens (99-126) az úgynevezett alfa-ANP (α ANP) [42,43]. A körülbelül 3000 Dalton molekulásúlyú α ANP a plazmában gyorsan eliminálódik, felezési ideje 3-4 perc. Az N-terminális fragmens (1-98), Nt-proANP felezési ideje lényegesen hosszabb:

60-120 perc. Súlyos szívelégtelenségben izolálták a miokardiumból és a plazmából az α ANP antiparallel dimerjét (β ANP) [44].

A vesetubulusok hámsejtjeiben a proANP poszttranszlációs átalakítása különbözik a többi szövettől, az N-terminálishoz 4 aminosav kapcsolódik, így jön létre a speciális ANP forma: az urodilatin [45].

Miközben az ANP molekuláris szerkezete viszonylag megőrződött a különböző emlős fajokban, a BNP szerkezetében jelentős különbségeket találtak felfedezése közben. Sertésben 26-, kutyában 45-, míg emberben 32 aminosavból álló peptid a keringésben található, domináns biológiailag aktív forma [46]. A BNP génje, a natriureticus peptid precursor B gén az 1. kromoszómán található kb. 8 kilobázispár távolságra az ANP génjétől. Az ANP-hez hasonlóan szintén három exont tartalmaz. Az első exon a 26 aminosavból álló szignálpeptidet és a proBNP első 15 aminosavat kódolja. A második exon a proBNP szekvenciájának döntő részét tartalmazza. Végül a harmadik exon a terminális aminosavat és a 3' nem transzlálódó régiót kódolja.

A 3' nem transzlálódó régióban egyedi, ismétlődő ATTTA szekvenciamotívumot találtak. Habár ennek az ATTTA motívumnak a szerepe nem teljesen ismert, jelentőségét a mRNS féléletidejének szabályozásában látják. Hasonló szekvenciák gyakoriak interferonok, limfokinek génjeiben, ahol a génexpresszió az élettani változások hatására növekszik és a stimulus megszűntével gyorsan lecsökken [47].

A natriureticus peptid prekursor B gén transzkripciója során szintetizálódott mRNS transzlációja során a kamrai szívmuszkulációban a BNP 134 aminosavból álló prekursora (preproBNP) jön létre. Ez először egy 108 aminosavból álló proBNP inaktív prekuzorra és a 26 aminosavat tartalmazó szignálpeptiddé bomlik. A proBNP továbbhasítódik az N terminális 76 aminosavból álló fragmensére (Nt-proBNP) és a 32 aminosavból álló biológiailag aktív BNP-re. A BNP felezési ideje körülbelül 20 perc. Az Nt-proBNP felezési ideje jelentősen hosszabb: 60-120 perc. Ellentétben az ANP-el a pitvari és a kamrai szövetek mind a proBNP-t, mind a BNP-t tartalmazzák. A pitvarokban a 32 aminosavból álló BNP a domináns (kb. 60%), míg a kamrákban a 108 aminosavból álló proBNP fordul elő magasabb koncentrációban (kb. 60%). Feltételezések szerint a proBNP hasítása BNP-é és N-terminális proBNP-é a trans-Golgi membránban történik. Lényeges azonban, hogy a proBNP is kimutatható az emberi

vérplazmában, illetve súlyos szívelégtelenségben a plazma proBNP/BNP aránya megnövekedett [48].

A CNP-t a BNP-hez hasonlóan először sertésagyban mutatták ki. A CNP gyűrűszerkezete nagyon hasonló, részben homológ az előző két molekulával. Jellegzetes különbség azonban a karboxi-terminális lánc hiánya. A CNP szerkezetileg a legkonzervatívabb a natriureticus peptidcsaládon belül a különböző fajokat összehasonlítva, ezért feltételezik, hogy a CNP a legősibb tagja a natriureticus peptidcsaládnak, és az ANP ill. a BNP belőle keletkezhetett génduplikációval [49]. A CNP génje a 2. kromoszómán található és szintén 3 exont tartalmaz. Az első exon 23 aminosavból álló szignálpeptidet és a proCNP első 7 aminosavát kódolja. A második exon a proCNP szekvenciájának többi részét tartalmazza. A harmadik exon a 3' nem transzlálódó régiót kódolja. A transzkripció során szintetizálódott mRNS transzlációja a 126 aminosavból álló preproCNP-t hozza létre. Az első 23 aminosav szignálpeptidként hasítódik le. A maradék 103 aminosav a proCNP. A proCNP prekursorból endoproteázok enzimatis müködése hatására keletkezik az utolsó 22 aminosavból a CNP. A CNP az érett, biológiailag legaktívabb forma, főként az idegrendszerben és az endotéliumban termelődik. Egy másik végtermék, a trans-Golgi membránban elhelyezkedő furin endoproteáz hasító aktivitása révén létrejövő -a proCNP C terminálisának 53 aminosavát tartalmazó- CNP-53 forma. A CNP-53 az egyéb szövetekben előforduló leggyakoribb molekulaforma. A CNP-53-ból CNP-t létrehozó valószínűleg extracelluláris enzim jelenleg még nem ismert.

1.3. A natriureticus peptidok szöveti eloszlása és génexpressziója

Az atrialis natriureticus peptidet először a pitvari miometrium sejtjeiben izolálták (1. táblázat). Alacsonyabb koncentrációban a vesében és a szív kamrai izomsejtjeiben is kimutatták. A miokardiumhoz képest a vesékben az ANP szintje elhanyagolható. Az ANP szöveti koncentrációja a szíven belül a pitvarokban 250-1000-szer magasabb a kamrákéhoz képest. Állatkísérletekben, újszülötteknél a kamrai ANP szint még jelentős, azonban a megszületés után a kontraktilis fehérjék izoformáinak váltásával párhuzamosan az ANP szint lecsökken. Súlyos szívelégtelenségben ismét megemelkedik a kamrák ANP termelése.

Az ANP és a BNP termelésének és ürítésének hatásos kiváltó stimulusa a szívüregek feszülése. A kiváltó inger erősödésével a szekréció gyakorisága fokozódik. A pitvarokból szabályozottan, intracelluláris granulumok útján szekretálódnak. Az ANP közvetlen a pitvari sejtek granulumaiból szecernálódik és a rövid felezési idő miatt gyorsan változik a vérben koncentrációja. Az ANP génjének proximális 5' régiójában számos olyan régiót írtak le, mely transzkripciós faktorok kötődési helyének számít. Ezek egyesével, de összhatásukban is hozzájárulnak a szívizomsejtek alap-, illetve indukált ANP termelésének. Az 5' régióban a promoter régió mellett egyéb szekvenciákat is találtak (hipoxiára-, glükokortikoidokra-, vagy éppen idegrendszeri restriktív faktorra válaszoló), melyek az ANP gén transzkripcióját indukálják [50,51,52].

Tartós kamrai feszülés, nyomásnövekedés esetén főleg a balkamra szívizomsejtjeiből proBNP és BNP szekretálódnak a vérbe. A BNP szekréciójának kontrollja transzkripciós szinten zajlik és a génexpresszió fokozódásához hosszan tartó stimulációt igényel. Jóval hosszabb ideig emelkedett a szintje a vérben az ANP-hez képest. A transláció során a proBNP glikolizációja történik. Hét különböző aminosav ismert glikolizációs helyként. Amennyiben ez a 71. (threonin) aminosavon is megtörténik, a proBNP nem hasad tovább BNP-vé [53]. A B típusú natriureticus peptid szintézisét fokozó tényezők között a tachycardia mellett, a glükokortikoidok, pajzsmirigyhormonok, endotelin-1 és az angiotenzin II szerepelnek. Az endotelin-1 és az angiotenzin II a hemodinamikus aktivitástól függetlenül növeli mindkét hormon szintézisét.

A natriureticus peptid precursor B gén 5' széli régiójában, a promoter régióban számos transzkripciós faktor számára alkalmas kötődési helyet találtak [54]. Ezek mellett leírtak pajzsmirigyhormonokra-, érfeszülésre reaktív, illetve aktivált T sejt nukleáris faktorkötő területeket is az 5' széli régió egyéb részein.

A C típusú natriureticus peptid paracrin hormonként fejti ki hatását, az emberi vérplazmában koncentrációja nagyon alacsony. Nagy mennyiségben termelődik az agyban. A cerebrospinalis folyadékban a CNP emelkedett koncentrációban fordul elő, illetve az Nt-pro-CNP/CNP arány szignifikánsan magasabb a vérplazmához képest [55]. Ezért korábban neuropeptidként tartották számon, később azonban kimutatták vesében, csontszövetben, illetve az endotél által termelődve erek falában, valamint a szívben és a

vér különböző sejtjeiben, makrofágokban is. Az ANP-től és a BNP-től eltérően a CNP-t a szívben nem szívizomsejtek, hanem fibroblastok termelik, így génexpressziója különbözik az előzőekétől. A CNP szekréciónak főleg növekedési faktorok és citokinek szabályozzák (tumor necrosis faktor α , interleukin-1, lipopoliszacharidok, fibroblast növekedési faktor, transzformáló növekedési faktor- β). Szöveti károsodás, vagy hypoxia esetén szintén megfigyelték a CNP szintjének emelkedését. A CNP génjének transzkripciós szabályozása kevésbé ismert az előző két hormon génjéhez képest, azonban a promotor régióban olyan guanin-citozin (GC) gazdag területet írtak le, melyek DNS -hez kapcsolódó, illetve leucin cipzár fehérjék kötődési helye (transzformáló növekedési faktor- β által stimulált (TSC22D1) fehérje) [56].

1.4. A natriureticus peptidek hatásmechanizmusa és receptorai

A natriureticus peptidek három speciális receptoron keresztül fejtik ki hatásukat (NPR). Ezek az A-, B- és C típusú receptorok. Mindegyik sejt felszíni receptor, melyek közül az A- és a B típusúak egy darab transzmembrán doménnel rendelkező receptorok. Ezek G-fehérjékhez kapcsolódnak és más receptoroktól eltérően egyetlen molekulából állnak, ami tartalmazza a receptor működéséhez szükséges összes domént: két extracelluláris ligandkötő-, valamint tirozin kináz és guanilát-cikláz hatású intracelluláris doméneket. Ezek a guanozin trifoszfátot ciklikus guanozin monofoszfáttá (cGMP) alakítják át. A tirozin-kináz szerű modul szabályozza a hozzá kapcsolódó guanilát-cikláz aktivitását. A natriureticus peptidek kötődésekor a receptor citoplazmatikus doménjének konformációja megváltozik, ATP kötődik a tirozin-kináz szerű doménhez, ennek hatására aktiválódik a guanilát-cikláz és megemelkedik a sejten belül a szolubilis cGMP szintje [57,58]. A cGMP sejten belüli másodlagos hírvivő, ami a cGMP-függő proteinkinázokat aktiválja, és így különböző fehérjék foszforilálásán ill. gének transzkripcióján keresztül közvetíti a natriureticus peptidek hatásait a sejt funkcióira. A guanilát-cikláz domén az ATP kötődését követően szintén allosterikus változáson megy keresztül, ami csökkenti a receptor affinitását a ligandhoz. Ennek következményeként a natriureticus peptid gyorsan disszociálódik a receptorról és a cGMP termelődése abbamarad [59]. A receptor és a ligand gyors összekapcsolódása és szétválása teszi lehetővé a sejt funkciók gyors változását a lokális natriureticus

peptidkoncentrációnak megfelelően [60]. A natriureticus peptidek A- és B típusú receptorai a receptoraktiválódás kapcsán nem internalizálódnak, így nem játszanak szerepet a peptidek keringésből történő eltávolításában, így nem következik be receptor downreguláció [61]. Ugyanakkor hosszan tartó magas natriureticus peptidkoncentráció vagy proteinkináz C hatására a guanilat-cikláz receptorok defoszforilálódnak és ezzel deszenzitiválódnak.

Az A- és B típusú receptorok felelősek a legtöbb ismert biológiai hatásért. Az A típusú receptor génje az ANP és a BNP génjéhez hasonlóan az 1., míg a B típusú receptor génje a 9. kromoszómán helyezkedik el. Az ANP és a BNP főleg az A típusú, a CNP a B típusú receptorhoz kötődik. Az A típusú receptorok legnagyobb számban a nagyerekben, míg a B típusú receptorok a szívben fordulnak elő. Ezen kívül nagy számban találhatók meg a különböző szövetekben, többek közt a vesében, a tüdőben [62]. A proBNP sokkal kevésbé hatékony guanilat-cikláz funkcióval rendelkezik a BNP-hez képest [63].

A C típusú receptorok génje az 5. kromoszómán található. Ezek a receptorok fordulnak elő a szövetekben a legnagyobb számban. A vesékben és az erek falában arányuk meghaladja a 95%-ot. Nem tartalmaznak intracelluláris domént és guanilat-cikláz működéssel sem rendelkeznek. A keringésből eltávolítják a natriureticus peptideket, clearance receptorként működnek. Extracelluláris doménjük jelentős egyezést mutat a guanilat-cikláz receptorok hasonló doménjével. A receptor nagy affinitással köti a natriureticus peptidcsalád minden tagját, mivel elég öt meghatározott aminosavval rendelkezniük a peptidgyűrűben a kapcsolódás létrejöttéhez [64,65]. A kapcsolódás létrejötte után a receptor-ligand komplex internalizálódik és a natriureticus peptidek a lizoszómák segítségével lebomlanak. Ezután a receptorok visszakerülnek a sejt külső felszínére [66].

A clearance receptorokon kívül a neutrális endopeptidázok (NEP) bontják le a natriureticus peptideket [67]. Ezek a cink metallopeptidáz enzimek a natriureticus peptidek gyűrűszerkezetét nyitják fel, ezáltal inaktíválva a molekulát. Szöveti eloszlásukat tekintve: az endotél sejtekben, simaizomsejtekben, szívizomsejtekben, a vese tubulusok hámsejtjeiben, illetve az agyban és a fibroblasztokban találhatóak. Élettani körülmények között ez a mechanizmus feltehetőleg alárendelt szerepet játszik a natriureticus peptidek eliminációjában. Emelkedett peptidszintek esetén azonban a

natriureticus peptidek nagyobb hányada bomlik le enzimatikusan [68]. A neutrális endopeptidázok legnagyobb affinitással a CNP-t bontják, ezt követi az ANP, jóval kifejezettebben a BNP-nél.

Kis mértékben a glomeruláris filtráció is hozzájárul a natriureticus peptidek eltávolításához a keringésből [69]. A peptidek plazmaszintjét a szekréciónak és a szövetekben végbemenő eliminációnak különbsége határozza meg.

1.5. A natriureticus peptidek szekréciónak befolyásoló tényezők

A natriureticus peptidek szintézisét jelentősen befolyásolja az endotelin, mely egy parakrin regulációs faktor. Az ANP szekréciónak endotél sejtek és szívizomsejtek közös sejt kultúrájában több mint kétszeresére emelkedik [70]. Ezt a változást az endotelin közvetlen, dóziszfüggő hatásának tulajdonítják, ami fokozza a natriureticus peptidek génjének átíródását és a hormonok szekréciónak [71,72]. Az endotelin másik hatása, a fokozott falfeszülés által kiváltott nátriuretikus peptidfelszabadulás szabályozása. Emelkedett pitvari transzmurális nyomás esetén, illetve endotelin egyidejű alkalmazásakor megfigyelték, hogy az egyes stimuláló hatások összeadódnak. Ezzel szemben az endotelin receptor kompetitív inhibitora jelentősen csökkenti a fokozott falfeszülés által kiváltott pitvari ANP elválasztást [73]. In vivo kísérletekben az endotelin receptor antagonistája gátolta a nyomásterhelés kapcsán a pitvarban a BNP mRNS szintjének emelkedését, a kamrai géntranszkripciónak azonban változatlan maradt [74].

Az endotelinnel ellentétes hatású nitrogén-monoxid (endothelium-derived relaxing factor) a nátriuretikus peptidek elválasztásának parakrin szabályozásában szintén fontos tényező. Nitrogén-monoxid inhibitor adagolása a bazális ANP felszabadulást in vitro és in vivo is növeli [75]. Állatkísérletekben a nitrogén-monoxid szintézis gátlása emeli a folyadékterhelésre bekövetkező ANP szekréciónak is [76]. Kísérletes eredmények alapján az endotelin és a nitrogén-monoxid egymást kiegészítő szerepet játszanak a fokozott falfeszülés hatására bekövetkező ANP szekréciónak lokális modulálásában: az endotelin fokozza a kiváltott szekréciónak választ, ezzel ellentétesen a nitrogén-monoxid csökkenti azt [77].

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerhez tartozó angiotenzin II infúziója hipertóniások között megemelte mind az A-, mind a B típusú natriureticus peptid koncentrációját a vérben. Ennek az emelkedésnek a háttérében az artériás vérnyomás és az afterload növekedése állhat. Az angiotenzin II hatására növekedett ANP koncentráció a jobb pitvari nyomás emelkedésével [78]. Egy másik kutatócsoportnál az ANP koncentráció a bal kamrai végdiasztolés nyomással mutatott összefüggést [79]. Az in vitro kísérletek eredményei ugyanakkor ellentmondásosak. Egyes kutatók az angiotenzin II hemodinamikai hatásai következményének tekintik a peptidszekrécióna kifejtett hatást, mivel izolált szíven, szabályozott nyomási és áramlási paraméterek mellett, angiotenzin II adagolás hatására nem találtak emelkedést a peptidszintekben [80]. Más kísérletek szerint azonban az angiotenzin II a hemodinamikai változásoktól függetlenül fokozza a nátriuretikus peptidek elválasztását [81,82].

In vitro kísérletek szerint az alfa-receptor agonista fenilefrin fokozza a szívizomsejtek natriureticus peptid szekréciónját, míg a béta-adrenerg agonista izoproterenol nem befolyásolja azt [83,84]. Más vizsgálatokban az alfa-agonisták mellett a protein-kináz C aktivátorai is hasonló hatásokkal rendelkeznek, viszont a bétaagonisták és a protein-kináz A aktivátorai gátolják az ANP szekréciónját [85]. In vivo az adrenalin hatására megemelkedő ANP szekréciónt mind az alfa-, mind a beta-receptor antagonistája csökkentette [86]. Izolált, intakt szívpitvarban izoproterenol hatására az ANP felszabadulás megemelkedik, amit magyarázhat a béta-aktiváció inotrop és kronotrop hatása [87]. Sertéseken végzett vizsgálat szerint a fenilefrin hatására létrejövő ANP szintemelkedés a pitvari nyomás változása nélkül megy végbe, illetve bétaagonista adagolásakor az ANP szekréciónja az emelkedő pitvari nyomás ellenére csökken az izoproterenol direkt hatása miatt [88]. Humán vizsgálatokban azt találták, hogy béta-blokkoló gyógyszerek alkalmazása esetén megemelkedik a natriureticus peptidek szintje, ami szerepet játszhat a béta-blokkolók terápiás hatásainak közvetítésében [89,90]. Az emelkedett hormonszintekhez hozzájárul, hogy béta-blokkoló kezelés hatására csökken a natriureticus peptidek clearance receptorának expressziója a tüdőben és az aortában. Ezáltal megnő a natriureticus peptidek féléletideje [91]. Más vizsgálatokban ugyanakkor a béta-blokkoló kezelés hatására nem változott a BNP szintje [92], tartós kezelés esetén pedig a hemodinamikai változások következtében a natriureticus peptidek szintjének csökkenése várható [93]. A fenti

szabályozó folyamatokon kívül számos egyéb tényező áll még kölcsönhatásban a natriureticus peptidrendszerrel. A pajzsmirigyhormonok [94,95] és a glükokortikoidok [96,97] hatására fokozódik a natriureticus peptidek szekréciója in vitro és in vivo egyaránt. A natriureticus peptidrendszer kapcsolata egyes citokinekkel (TNF, IL-1, IL-6) és növekedési faktorokkal valószínűsíti, hogy a szív endokrin működése összefügg a szívizomban zajló gyulladásos és átépülési folyamatokkal is [98].

A natriureticus peptidek negatív visszacsatolás útján saját képződésüket, felszabadulásukat is befolyásolják.

1.6. A natriureticus peptidek fő biológiai hatásai

A natriureticus peptidek a különböző célszerveiken számos biológiai hatást fejtenek ki (2. táblázat). Az ANP és a BNP élettani hatása nagyon hasonló. Ezek között vannak perifériás hatások, úgymint a natriuresis fokozása, vazodilatáció, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlása. Az endotél-, simaizom- és a szívizomsejtek osztódása elleni működés szintén a natriureticus peptidek keringésre gyakorolt hatásaként jelentkeznek. A centrális hatások közé tartoznak a szomjúságérzet és sóétvágy csökkentése, presszor központ gátlása és az ACTH illetve a vazopresszin termelésének blokkolása.

A natriureticus peptidek az erek simaizomzatának ellazulását, ezáltal tónusuk csökkenését okozzák. Az ANP elsősorban a prekapillaris arteriolák, kisebb részben az extrakapillaris vénák relaxációjával fejti ki a vérnyomáscsökkentő hatást. A vénás visszaáramlás mérséklődésével csökken a preload és az afterload, a cardiac output valamint az artériás vérnyomás is, anélkül azonban, hogy reflex tachycardia alakulna ki. Ez a frekvenciamérséklődés valószínűleg a nervus vagus afferenseinek ingerlése révén a központi vegetatív idegrendszer szimpatikus efferenseinek blokkolása, valamint az autonóm idegvégződések catecholamin felszabadulásának csökkenése révén valósul meg. A vénás rendszer befogadóképessége is növekszik. Az ANP növeli az endotélium permeabilitását a plazma számára. Ezáltal az erekből folyadék jut ki az extravaszkuláris térbe, növekszik a hematokrit és a plazmafehérjekoncentráció. Az érrendszerrel kapcsolatos tulajdonságokkal párhuzamosan a hipovolémiát fokozza az ANP vesében kifejtődő diureticus és natriureticus hatása. Az ANP -akut hipervolémia, plazmatérfogat

növekedés esetén- élettani válaszként- fokozza a só- és a vízkiválasztását a vesékben. Krónikus hipervolémia esetén ez a mechanizmus kevésbé jelentős [99].

Az ANP a preglomeruláris erek tágításával és az efferens arteriolák tónusának emelésével a glomeruláris kapillárisokban növeli a nyomást, ezáltal a glomeruláris filtrációs rátát. A mesangialis sejtek tónusa is változik. A peptid hatására a sejtek kontraktilis elemei elernyednek és a glomerulus bazális membrán két átellenes pontja távolodik egymástól, ennek hatására a kapillárisok felülete és a filtráció mértéke megnövekedik.

Ezzel párhuzamosan az ANP csökkenti a tubulo-glomeruláris visszacsatolást, gátolva az angiotenzin II hatását. Ezen túl azonban az ANP közvetlenül is csökkenti a belső velő gyűjtőcsatornáiban a nátriumionok felszívódását. A vesében a vérátáramlás mennyisége nem változik az ANP hatására, azonban emelkedett plazmakoncentráció mellett a véráram főként a cortex mélyebb rétegeibe és a medullába irányul.

Az ANP felfedezése után rövid időn belül igazolták, hogy a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeiben a guanilat-cikláz útvonalon keresztül az aldoszteron termelését közvetlenül gátolja. Ez a hatás mind a nyugalmi hormon kiválasztást, mind az agonisták által indukált szekréciónak érinti [100,101,102].

Az ANP az agyban is kifejti a testfolyadék homeosztázisát befolyásoló hatását. Elsősorban a hypothalamusban és az agytörzs azon területein mutatható ki a peptid, ahol a vérnyomásszabályozás központjai találhatóak és az ANP receptorai kimutathatók. Itt is a guanilil cikláz útvonalon keresztül közvetíti a biológiai hatást. A pitvari feszülés által a szívből kiváltott ANP szekréció nagymértékben csökken az agyi szabályozás kiesésekor. Hipervolémia esetén a baroreceptorok feszülése a jobb pitvarban, a carotis-aorta sinusokban, illetve a vesékben módosítja az agytörzs és ezzel a hypothalamus afferenciáját. A hypothalamus ANPerg neuronjai a neurohypophysisen keresztül az oxytocin szekréciónak eredményeznek, mely a jobb pitvarba jutva ANP felszabadulást vált ki. A hypophysealis portális keringésbe jutó ANP gátolja az ACTH szekréciónak, ezáltal nem csak a kortizol, hanem kisebb mértékben közvetlenül az aldoszteron termelődését is. Az ACTH hatásos ingere az aldoszteron szekréciónak. Habár a nyugalmi aldoszteronszekréció mértéke az adenohipophysis hiányában nem csökken, de a nátriumhiány által kiváltott aldoszteronszekréciós válasz kialakulásához szükség van az ACTH szintjének emelkedésére. Valószínűleg nemcsak az ACTH hanem annak

prohormonjából, a proopiomelanokortinból (POMC) létrejövő peptidek közül a melanocytákat stimuláló hormonok (γ -MSH peptid) is részt vesznek a mellékvese zona glomerulosa sejtjeinek, így az aldoszteron kiválasztásának szabályozóiként. Állatkísérletekben hipophysectomia után MSH peptidek hatására ismét megindult a hiponatrémiára az aldoszteron szekréció [103]. Továbbá az ANPerg neuronok gátolják az arginin vazopresszin (AVP) kibocsátását, így fokozva a diuresist és csökkentve az ACTH termelődését is. A hypothalamicus ANPerg neuronok aktivációja a folyadék- és sóbevitel csökkenését eredményezi. Ez az olfactorius rendszer ANP neuronjainak sóízérzést befolyásoló hatása. Feltehetőleg az agyi ANP neuronok a plexus chorioideusok és az agyi erek permeabilitását is befolyásolják [104].

A BNP natriureticus és hipotenzív hatása jóval erősebb az ANP-nél. Mindkét peptid hasonlóan csökkenti a plazma renin aktivitását és az aldoszteron szekréciót. A BNP a miokardiumot relaxáló, valamint antiproliferatív és antifibrinolitikus hatással is rendelkezik. Direkt módon -az extracelluláris szignál kötődés, kináz jelátviteli úton- a szív fibroblasztjait gátolja a fibrotikus folyamatok megindításában. A transzformáló növekedési faktor- β gén gátlása akadályozza a fibrózist (1 típusú kollagén, fibronectin, CTGF, PAI-1 és a TIMP3), a miofibroblaszt átalakulást (simaizom aktin 2 és a nem izom miozin nehéz lánc), a proliferációt (PDGFA, IGFI, FGF18 és IGFBP10) és a gyulladást (COX2, IL6, TNF α indukálta 6-os fehérje és a TNF szupercsalád 4 tag) [105].

A BNP szérumszintjének emelkedését írták le a következő kórképekben: magas vérnyomás, krónikus szívelégtelenség, hiperaldoszteronizmus, primer pulmonáris hipertenzió, tüdőembolia, akut veseelégtelenség. A natriureticus peptid precursor B gén az 1. kromoszómán található. Az elmúlt időszakban számos variánst, „single nucleotid” polimorfizmust írtak le, melyben az emelkedett natriureticus peptid szint alacsonyabb szisztolés és diasztolés vérnyomásértékekkel társult [106].

Az elmúlt években új tanulmányok igazolták a natriureticus peptidek energiaháztartásban játszott szerepét. A natriureticus peptidek cGMP szintnövelő működésükkel fokozzák a zsírsejtekben a lipolysist, a zsírsavak oxidációját, fokozzák az adiponectin szekrécióját. Ezzel párhuzamosan a vázizomsejtekben aktiválják a peroxiszóma poliferátor-aktivált receptor γ coactivator (PGC)-1 α és a peroxiszóma poliferátor-aktivált receptor (PPAR)- δ géneket, melyek a mitokondriális biogenesis fő

szabályozói. Zsírban gazdag diéta mellett az A- és B típusú natriureticus peptid receptorok downregulációja figyelhető meg, miközben a C típusú receptorok expressziója nő. A cGMP szint csökkenésével mérséklődő lipolysissal párhuzamosan ektópiás zsírszövet megjelenése, illetve inzulinrezisztencia növekedés következik be [107].

Az endotélium által termelt CNP mind az artériák, mind a vénák tágításában szerepet játszik. Ellentétben a család többi tagjával lokálisan fejti ki hatását. A CNP nem fejti ki számottevő natriuresist. Antifibrotikus-, antihyperproliferatív- és antihypertrófiás hatása jelentős az erek sérülés után meginduló új intima képződésében és a szívben a miokardiális infarktus után kezdődő remodelling megelőzésében. Ez a hatás egyrészt a cGMP függő hatásmechanizmuson, másrészt az endotelin-1 termelésének gátlásán keresztül érvényesülhet.

A szenzoros neuronok axonélágazódásának, ezáltal az idegsejtek fejlődésének és összekapcsolódásának fontos eleme a CNP. A gerincvelő hátsó szarvának neuronális prekursor sejtjei által termelt CNP a B típusú receptorokon kiváltott guanilat-cikláz jelátviteli kaszkád segítségével indítja el a szenzoros neuronok axonjainak kapcsolódását a gerincvelőhöz [108]. A CNP szerepét írtak le az enchondralis csontosodás folyamatában is.

Az urodilatin a vesében lezajló nátriumkiválasztás fontos szabályozója. Kizárólag ebben a szervben fejti ki hatását jelen ismereteink szerint. Az ANP-től eltérően a belső velő gyűjtőcsatornáinak hámsejtjeinél nem a bazolaterális, hanem az apikális membránfelszínén gátolja a nátriumionok felszívódását [109].

2. táblázat: A natriureticus peptidek élettani hatásai a különböző szervekben

Célszerv	Élettani hatások
Vese	1. A glomerulusok afferens arterioláinak vazodilatációja, efferens arteriolák vazokonstrikciója, glomeruláris filtrációs ráta (GFR) növekedés 2. Natriuresis fokozása: a proximális tubulusokban a Na ⁺ , H ⁺ cserélő enzimek, a distális tubulusokban a Na ⁺ Cl ⁻ ko-transzporterek és a gyűjtőcsatornában a Na ⁺ csatornák gátlásával. 3. Diuresis fokozása: a gyűjtőcsatornák apicalis membránján az arginin vazopresszin (AVP) indukálta aquaporin-2 felvételének gátlása
Szív	1. Preload csökkentése. Ezáltal a cardiac output esése. 2. A szív remodellingjének megakadályozása
Érrendszer	1. Vazorelaxáció 2. A kapilláris permeabilitás növelése
Endokrin rendszer	1. Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlása 2. Szimpatikus idegrendszer blokkolása 3. AVP termelés gátlása 4. Endotelin termelés csökkentése
Mitogenesis	1. Az érfal simaizom sejtjeinek osztódás gátlása 2. A szívben található fibroblasztok - növekedési faktor közvetített - hipertrofia gátlása

1.7. A BNP élettani szintjeinek változása az életkor és nem függvényében

Korábbi vizsgálatok alapján születés után közvetlenül a natriureticus peptidek szintje jelentősen megemelkedik, majd a születést követő időszakban gyorsan csökken [110,111]. A BNP szintje a megszületés utáni első napon 100 pg/ml felé emelkedik a magzati keringés perinatális átalakulása, illetve a megnövekedett kamrai nyomás- és volumenterhelés következményeként. A placenta megszületése kapcsán feltehetőleg csökken clearance receptorok száma és a nátriureticus peptidek az újszülött élettani folyadékvesztésben is részt vesznek. Az első hét végére a BNP szint 50 pg/ml alá esik egészséges újszülöttekben. Ezt követően a BNP szintek a vizsgálatok alapján megközelítik a felnőtt normálértékeket, és nem változnak jelentősen a növekedés során. Más kutatások szerint a csökkenés folyamatos a gyermekkor folyamán. Pubertás előtti gyermekekben nem találtak szignifikáns hormonszint eltérést a különböző neműeknél [112]. Mindkét nemben 10 pg/ml alatti BNP értékeket figyeltek meg. A serdülőkorú gyermekeket érintő kutatások eredményei ellentmondásosak. Felnőtt nők körében a

férfiakhoz, illetve a pubertás előtti lányokhoz képest magasabb BNP szinteket írtak le, mely a 20 pg/ml szintet nem haladta meg.

1.8. A natriureticus peptidek etiológiai szerepe nem szülészeti kórképek háttérében

A natriureticus peptidek felfedezésük óta diagnosztikai-, terápia-, illetve prognosztikai céllal számos kórállapotban, kardiovaszkuláris kórképben felhasználásra kerülnek különböző mértékben. A laboratóriumi és ágy melletti tesztek elterjedésével legnagyobb mértékben a B típusú natriureticus peptid klinikai alkalmazása vált a hétköznapi ellátás részévé.

1.8.1. Szívelégtelenség

Az ANP felfedezése után rövid időn belül leírták a molekula szívelégtelenségben emelkedett értékét, akár tünetmentes pácienseknél is. Súlyos szívelégtelenségben mind az ANP, mind a BNP szintje megemelkedik, kórképtől függően szekrécións jellemzőik megváltoznak [113]. A natriureticus peptidek expressziója és kiválasztása zavart szenved, ezáltal a plazmában hosszabb ideig és részlegesen lebontott állapotban található. Így az emelkedett peptid szint nem jelent egyenértékű működésnövekedést. Ezenkívül a magas natriureticus peptid koncentráció a receptorszint downregulációját okozza, csökkentve a hormonválaszt. A BNP szintjének szívelégtelenségben mért értéke jól korrelál a tünetekkel és a NYHA stádium beosztásával. A 35% alatti ejekciós frakciót mutató krónikus szívelégtelenség miatt kezelt páciensek 3 éves nyomonkövetése során a vérplazma BNP koncentrációja volt a hirtelen halál egyetlen független indikátora. A plazma BNP szintjének vizsgálata tünetmentes balkamra elégtelenség kimutatására alkalmas [114]. Így egészséges emberek szűrésére, illetve más kardiológiai betegségben szenvedő páciensek diagnosztikai markerjeként felhasználható. A sürgősségi betegellátásban ágy melletti BNP gyorstesztetek kerültek használatba akut dyspnoe, fulladás esetén a kongesztív szívelégtelenség differenciáldiagnózisa céljából. Terápia célból a kilencvenes évek közepén rekombináns ANP-t alkalmaztak a szívelégtelenség kezelésére. Később

igazolták, hogy az ANP ilyen esetekben emeli a szívre ható szimpatikus idegi aktivitást és fokozza a balkamra remodellingjét. A humán BNP szintetikus rekombináns formája, a nesiritide elfogadott készítmény a szisztolés működészavar kapcsán kialakuló pangásos szívelégtelenségben. Klinikai vizsgálatok a nesiritide alkalmazása után gyors érelenállás- és tüdőkapilláris „wedge” nyomáscsökkenést írták le [115]. Mellékhatásként, szövödményként a vesefunkció romlása, illetve a mortalitás növekedése jelentkezhethet. A gyógyszert intravénás formában lehet alkalmazni. Számos hemodinamikai, neurohormonális, luzitróp és remodelling ellenes kedvező hatása mellett előnyös, hogy nem okoz szívritmuszavarokat.

Másik támadáspont a natriureticus peptideket lebontó neutrális endopeptidázok gátlása. Ilyen hatóanyag a candoxatrilat, mely állatkísérletekben hatékonyan mutatkozott szívelégtelenség kezelésében. A neutrális endopeptidáz gátlók gyors vérnyomásesést okoznak, azonban tartós hatásuk csekély. Ebben szerepet játszik, hogy a neutrális endopeptidázok az angiotenzin II és az endotelin lebontását is végzik, így ezen enzimek gátlása közvetetten vérnyomásemelkedést okoz. A neutrális endopeptidáz gátlók önálló alkalmazása ezért nem széleskörű. A neutrális endopeptidáz (vazopeptidáz) blokkolók angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlókkal történő kombinációja terápiás előnyt jelent. Ilyen hatóanyag az omapatrilát, mely mindkét fenti enzimet gátolja [116]. Ezen, szívelégtelenségben és magas vérnyomásban is hatékony gyógyszer alkalmazásának legnagyobb korlátja a mellékhatások (pl. angiooedema) magas aránya.

A szívelégtelenség során alkalmazott diuretikumok és angiotenzin konvertáló enzim gátló gyógyszerek az afterload és a balkamra feszülésének csökkentése révén fejtik ki hatásukat, így a kisebb mértékű balkamra feszülésre a kamra kevesebb BNP termeléssel válaszol. Az aldosteron receptor antagonistá spironolakton emeli a plazma renin aktivitást, azonban csökkenti a natriureticus peptidek (ANP, BNP) koncentrációját [117]. A furoszemid dózisfüggően serkenti a renin-angiotenzin-aldosteron rendszert, a disztális tubulusokban kifejtett hatása azonban független az aldosteron hatásától. Furoszemid kezelés mellett a plazma renin aktivitás növekedésével egyidőben az ANP szintjének csökkenését írták le [118,119]. Állatkísérletekben a BNP és a furoszemid együttes alkalmazásakor a BNP fokozta a furoszemid vízhajtó és nátriumürítő hatását, ezzel ellentétesen mérsékelte a furoszemid

által kiváltott aldosteron szekréciót [120]. A hidroklorotiazid használata során a renin-angiotenzin-aldosteron rendszer működése fokozódik, azonban az ANP koncentrációja növekszik esszenciális hipertóniások között [121].

1.8.2. Akut miokardiális infarktus

Az ANP plazmaszintje akut miokardiális infarktus esetén a tünetek jelentkezésekor már megemelkedett és ezután csökkenni kezd. Ezzel ellentétesen a plazma BNP értékek a korai tünetek jelentkezésekor, a klinikai felvételnél bár magasak, de tovább emelkednek az infarktus első 12-24 órájában [122]. Ezután átmeneti csökkenés következik be, majd öt-hét nappal később ismételt emelkedés után csúcsot ér el a BNP szintje. Az akut fázis ezen második csúcspontjának magassága prognosztikus markere a kialakuló bal kamra elégtelenségnek, illetve remodellingnek. A krónikus fázisban a plazma BNP sikeres korai koronária reperfúzió esetén normalizálódik. Amennyiben a kamrafunkció jelentősen károsodik, remodelling alakul ki, ennek mértékével párhuzamosan szignifikánsan emelkedett marad a BNP szintje, jelezve a hipoxiát, az intracelluláris acidózist és a miokardium feszülését. A 100 pg/ml plazma BNP szint felett a miokardiális infarktus és a kardiovaszkuláris mortalitás kockázata négyszeresére emelkedik.

Akut miokardiális infarktus során az ischaemia és a reperfúzió kapcsán a koronáriaerek és a miokardium károsodik. Ebben a folyamatban az aktivált neutrofil granulociták szerepét igazolták. Az ANP és a BNP modulálja a neutrofil granulociták működését. Az endotél sejteket pusztító citotoxikus ágensek ellen az ANP védő hatást fejt ki és gátolja neutrofil granulociták kitapadását az érbelhártyához. Átmeneti koronária elzáródás kapcsán alkalmazott ANP, illetve urodilatin a reperfúzió során kialakult nekrosis mértékét jelentősen csökkentette [123,124].

1.8.3. Magas vérnyomás, bal kamra hipertrófia

A plazma ANP és BNP szintje magas vérnyomásban szenvedő pácienseknél magasabb a normotenzívekhez képest. A magas vérnyomásos betegek között azoknak, akiknél a bal kamra hipertrófia kialakult, ezek az értékek még nagyobbak. Japán szerzők

korábban esszenciális hipertóniás pácienseknél emelkedett BNP szintet találtak a normotenzív egyedekéhez képest. Más kutatók eredményei szerint balkamra koncentrikus hipertrófiás páciensekhez szignifikánsan magasabb BNP értékek társulnak, mint az excentrikus kamra hipertrófiásokhoz, vagy a normál balkamra működésű esszenciális hipertóniásokhoz, illetve a koncentrikus remodellingen átesett páciensekéhez [125]. Hatékony vérnyomáscsökkentő kezelést követően a balkamra tömeg csökken, és ezzel párhuzamosan a plazma BNP szintek is csökkennek. Ezek alapján a plazma BNP vizsgálata hatékony a bal kamra hipertrófia szűrésére. Magas vérnyomás miatt kezelt betegeknél béta blokkolók alkalmazása esetén a BNP szint növekedése és pitvarfibrilláció kialakulásának gyakorisága emelkedését figyelték meg [126].

1.8.4. Szupraventrikuláris tachycardia

Az ANP, Nt-proANP plazmaszintje a paroxizmális szupraventrikuláris tachycardia során emelkedett [127,128]. Sikeres rádiófrekvenciás abláció során az Nt-proANP szintje csökken, így prognosztikus markerként a kezelés eredményének nyomon követésére alkalmas [129]. Pitvarfibrilláció során az Nt-proBNP szintje magas. Krónikus pitvarfibrillációban a BNP szint emelkedése a balkamra működésével áll összefüggésben [130,131].

1.8.5. Pulmonáris hipertónia

A jobbkamra fokozott terhelése emeli a páciensek ANP és BNP szintjeit. Pitvari sövényhiány esetén az ANP, míg pulmonáris hipertenzió esetén a BNP szintje növekszik meg jelentősen [132]. Amennyiben a két kórkép együtt jelentkezik, a BNP emelkedés a domináns. Az ANP és a BNP szintje pulmonáris hipertóniás betegeknél összefüggést mutat a pulmonaris artériás középnyomással, a jobb pitvari nyomással, a balkamra végdiasztolés nyomásával és az összpulmonáris ellenállással. Amennyiben prostaglandin származékok alkalmazása után az összpulmonáris ellenállás csökken, az ANP és a BNP szintje is mérséklődik. Akut tüdőembóliában a plazma BNP szintje emelkedett. Az emelkedés szintje összefüggésben áll a jobbkamra terheléssel, illetve a

megnövekedett mortalitással. A különböző kórképek az etiológiájuktól függetlenül a jobbkamra túlterhelését okozva, annak mértéke szerint emelik a natriureticus peptidek szintjét. A fentiek szerint a BNP szintje jól tükrözi a kardiovaszkuláris betegségek súlyosságát, az alkalmazott gyógyszeres kezelés hatékonyságát és a páciensek prognózisát.

1.8.6. Szeptikus shock

Súlyos szepszis és szeptikus shock következményeként a szívizom működésének csökkenése alakulhat ki. Ezeknél a betegeknél mind az ANP-, mind a BNP szintjét emelkedettnek találták. A plazma ANP az interleukin-6-al (IL-6) együtt korrelált, míg a BNP plazma szintje a kardiális indexhez igazodott. Ezek alapján a BNP a balkamra funkcióját jelzi, míg az ANP az IL-6 termelődésével együtt változik szepszisben.

1.8.7. Akut és krónikus veseelégtelenség

Akut veseelégtelenségben mind az ANP, a BNP és a CNP, valamint az urodilatin szintjei is megemelkednek. Sikeres vesetranszplantáció esetén (amennyiben a beteg állapota miatt nincs szükség hemodialízisre) a natriureticus peptid szintek visszatérnek az egészséges normál tartományba. Az ANP és az urodilatin akut veseelégtelenségben történő alkalmazása nem vált hatékony terápiás eszközzé. A BNP jótékony hatású glomeruláris károsodás, illetve glomeruláris hipertrófia esetén, de tubuláris nekrozis kialakulásakor nem effektív [133].

1.8.8. Cerebrális sóvesztő szindróma

Ez a tünetegyüttes intrakraniális történésekhez (pl. koponyatrauma, subarachnoideális vérzés, illetve egyéb központi idegrendszeri betegségek) kapcsolódó nagymértékű renális só- és folyadékvesztéssel járó kórkép. Hipovolémia, hiponatrémia és poliuria kialakulása jellemzik. Miközben a szérum aldoszteronszint csökkent és az esetek egy részében a plazma arginin vazopresszin szint alacsony, a BNP szérumszintje

emelkedett. A BNP szerepe a szindróma kialakulásában és a diagnózis felállításában számottevő [134,135].

1.8.9. Májcirrózis

Előrehaladott májbetegségekben, ascites mellett az atriális natriuretikus peptid szintje emelkedik. Ennek hátterében valószínűleg a megnövekedett plazmatérfogat áll [136]. Az ANP emelkedését májcirrózis kapcsán kialakult kardiomiopátiában is megfigyelték. Folyamatos ANP terápia gátolja a hepatociták fibrotikus átalakulását, fibrózis létrejöttét. Májtranszplantációs műtéten átesett pácienseknél bekövetkező akut veseelégtelenség, oliguria, illetve az alkalmazott kacsdiuretikumok hatástalansága esetén alacsony dózisu ANP kezeléssel a hemodialízis megelőzhető [137].

2. Célkitűzések

1. Vizsgálataink célja volt a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus meghatározására alkalmazható új módszer - fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis - kifejlesztése.

2. Módszerünkkel a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus eloszlását terveztük megállapítani egészséges és súlyos praeclampsias terhesek között.

3. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének meghatározására használt - ágy mellett végezhető, szendvics fluoreszcens immunoassay elvű - módszer, szülészeti klinikai gyakorlatba való alkalmazhatóságát vizsgáltam.

A következő kérdésekre kerestem választ:

4. Magasabb-e a B típusú natriureticus peptid plazma koncentrációja súlyos praeclampsias terhesek esetében az egészségesekhez képest?

5. A natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei között megfigyelhetők-e összefüggések?

6. Korai és késői kezdetű súlyos praeclampsias terhesek körében különbözik-e a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus eloszlása?

7. Van-e különbség a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeiben korai és késői kezdetű súlyos praeclampsias terhesek körében?

8. A natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus eloszlása eltér-e az intrauterin magzati retardációval szövődött súlyos praeclampsias terheseknél az eutróf magzatok szüleihez képest?

9. Magasabb-e a B típusú natriureticus peptid plazmaszintje az intrauterin magzati retardációval szövődött súlyos praeclampsias terhesek körében?

10. Kimutatható-e összefüggés praeclampsias betegek esetében a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei illetve a praeclampsia klinikai tünetei és a betegséget jellemző laboreltérések között?

11. Meghatározható-e vágópont (cut-off point) a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjében a súlyos praeclampsias betegeknél?

3. Módszerek

3.1. A vizsgálatok helyszíne

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján végeztük. Az Intézet a progresszív betegellátás csúcsán elhelyezkedő, így országos ellátást nyújtó, terciér intézmény, melyben a szülészeti és nőgyógyászati, ezek között a terhesspatológiai kórképek ellátásának teljes spektruma megtalálható az asszisztált reprodukciós beavatkozásoktól az invazív genetikai diagnosztikáig. A Magyarországon működő legnagyobb kapacitású Neonatális Intenzív Centrum is a Klinikán található. A vizsgált időszakban évente átlagosan 3700-3800 nő szült az intézményben. Ezek közül 75 és 100 közötti volt a praeclampsziások száma egy-egy évben. Súlyos praeclampsia 45-55 esetben fordult elő közöttük. A natriureticus peptid prekursor B gén polimorfizmusának és a B típusú natriureticus peptidszintek meghatározása az Intézet Genetikai Laborjában történt.

3.2. A vizsgálatokba bevont betegek

A Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 235 egészséges terhést és 220 praeclampsziás pácienszt vizsgáltunk. A vizsgálatainkba bevont terhesek 2006. június 30. és 2010. december 31. között szültek Klinikánkon. A terhességi kor a 8-12. héten történő ultrahang-szűrővizsgálat szerint került meghatározásra. A többes terhességek, fejlődési rendellenesség vagy kromoszóma-rendellenesség diagnózisával terhelt terhességek kizárásra kerültek. A vizsgálatokban részt vett várandósok a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Várandósambulanciáján és Szülőszobáján kerültek kiválasztásra. A következő csoportokat határoztam meg:

1. Praeclampsziások, ezen belül korai és késői kezdetű praeclampsziás terhesek.
2. Kontroll várandós nők.

A Klinikánk Várandósambulanciáján jelentkező egészséges várandósok között az önként jelentkező szinguláris terhesektől vettünk vért. Részletes anamnézis felvétel történt előzményben szereplő krónikus magas vérnyomás, praeclampsia, vesebetegség,

illetve cukorbetegség irányában. Amennyiben a terhesség során magas vérnyomás jelentkezett a páciens kizártuk a kontrollcsoportból.

A súlyos praeclampsias terhes nőknél a 20. hét után jelentkező legmagasabb vérnyomásérték meghaladta a 160/110 Hgmm értéket két egymástól eltérő időpontban mérve (4 óra-1 hét különbséggel). A vizelet fehérjetartalma 5000 mg/24 óra feletti volt. Ezeknél a pácienseknél a vérmintákat a praeclampsia diagnózisának felállításakor, a gyógyszeres kezelés, illetve transfúzió megkezdése előtt vettük [138]. A praeclampsiaiban szenvedő várandósok egyéb kórképekben (pl. gestációs diabetes, asthma bronchiale stb.) nem szenvedtek, illetve ezeknek megfelelő gyógyszeres kezelésben nem részesültek.

Korai kezdetű praeclampsias páciensek esetében a kialakult súlyos praeclampsia tünetei a terhesség 20. és 34. hete között kezdődtek, míg a késői kezdetű praeclampsias terheseknél a kórkép a 34. terhességi hét betöltése után fejlődött ki.

Az intrauterin magzati növekedési retardáció (IUGR) megállapításánál a Központi Statisztikai Hivatal által készített születéskori testtömeg és testhossz standardok táblázatát használtuk [139]. Méhen belüli magzati növekedési retardációval érintetteknek az adott terhességi hétre jellemző, nemre egyeztetett 10 percentilis alatti súllyal világra jött újszülötteket (IUGR10 percentilis) tekintettük. A súlyos magzati növekedési retardáció diagnózisát az adott terhességi hétre jellemző, nemre egyeztetett 3 percentilis alatti súllyal világra jött újszülötteknél (IUGR3 percentilis) állítottuk fel.

3.3. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n polimorfizmusának vizsgálata

3.3.1. Genomiális DNS izolálása perifériás vérből

A vizsgált személyektől etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó kémcsőbe 3 milliliter perifériás vért vettünk. A praeclampsias pácienseknél a vérmintákat a praeclampsia diagnózisának felállításakor, a gyógyszeres kezelés megkezdése előtt vettük le, a kontrollcsoport tagjainál a vérvétel egy harmadik trimeszteri rutin laborvizsgálat kapcsán történt. A levett mintákat EDTA tartalmú kémcsőbe gyűjtöttem majd tíz percig 3000 fordulatszámmal centrifugáltam le és a

felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottam. A DNS minták izolálására High Pure PCR Template Isolation kitet (Roche, Mannheim, Németország) használtam a gyártó útmutatása szerint (2. ábra). A fehérvérsejtek genomiális DNS-ét 0,2 ml mintából vontam ki [140, 141].

Az izolálás során 1,5ml Eppendorf csőbe mértem 40 μl Proteinase K enzimet 200 μl Binding Puffert (6M guanidine-HCl, 10mM urea, 10mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25°C)), majd az elegyhez hozzáadtam 200 μl vérmintát. Összekeverés után $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig inkubáltam. Ezt követően az elegyhez mértem 100 μl isopropanolt. Az összekeverést követően szilika oszlopra mértem a mintát, majd egy percig 8000 fordulatszámmal centrifugáltam le. Az oszlop megköti a DNS molekulákat, a PCR-t gátló anyagokat a kit mosófolyadékaival távolítottam el, ezért az oszlopot 500 μl Inhibitor Removal Pufferrel (5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl, pH 6,6 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)) mostam át (centrifugálás 1 perc, 8000 fordulatszám). Ezt követően 500 μl Wash Pufferrel (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)) mostam át az oszlopot (centrifugálás 1 perc, 8000 fordulatszám). A mosási szakaszt még egyszer megismétltem, majd a centrifugálás végén teljes sebességgel még további 10 másodpercig centrifugáltam az oszlopot a maradék mosófolyadék eltávolítására.

A tisztítás végeztével 200 μl $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os Elution Pufferrel (10mM Tris-HCl, pH 8,5 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)) oldottam le az oszlopról a tiszta DNS-t. A tisztított mintát steril 1,5ml-es Eppendorf csőben tároltam a vizsgálatig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.



2. ábra: A DNS izolálására alkalmazott High Pure PCR Template Isolation

3.3.2. A (TTTC)_n polimorfizmus meghatározása

Az izolált DNS mintákból az e célból szintetizált forward (5'-6-FAM-AAG GAG GCA CTG GGA GAG AGG GGA ATT-3') és reverse (5'-AAT TAG CTG GGC ATG GTG GCA GGCG-3') oligonukleotid primerek segítségével, fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszerrel meghatároztam a TTTC szekvencia ismétlődő egységeinek a számát.

A PCR csőbe 10 µl Qiagen Multiplex PCR mix (Qiagen, Hilden, Germany) és 0,3 -0,3 µM primerek, valamint 1 µl minta került összemérésre, 20 µl végtérfogatba. A polimeráz láncreakció futtatási paraméterei a következő voltak:

A kezdeti 10 percig tartó 95 °C-on végzett denaturáció után a polimeráz láncreakciót 32 ciklusban során a következő PCR környezetben végeztük: 30 másodpercig 95 °C-on (denaturálás), 30 másodpercig 60 °C-on (primer kitapadás-

anneláció) és újabb 30 másodpercig 72 °C-os hőmérsékleten (láncosszabbítás-
extenzió). A végső extenzió 72 °C-on 10 percig zajlott. A PCR reakciót ABI 9700 PCR
készülékkel végeztem (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (3. ábra).



3. ábra: ABI 9700 Thermal Cycler készülék

A célzott DNS szakasz sokszorosítását követően, a PCR termék 4µl-éhez 19 µl formamidot és 0,5 µl of GeneScan 500-ROX Size Standard festéket (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) adtam. A keveréket 95 °C-os hőmérsékleten denaturáltuk 5 percig és újabb 5 percig 4 °C-on hűtöttem. A kapilláris elektroforézist POP7 gél alkalmazásával ABI 3130 Genetic Analyzer gépen végeztem (PE Applied Biosystems) (4. ábra).

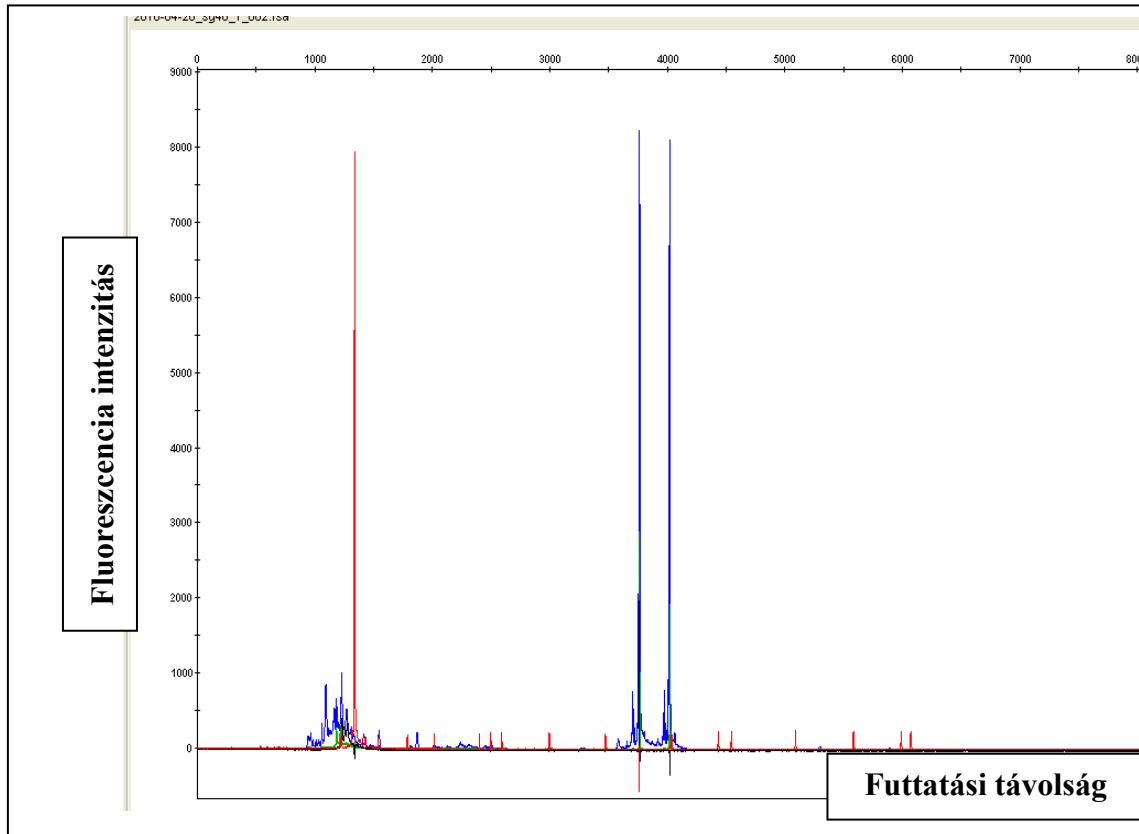


4. ábra: ABI 3130 Genetic Analyser génszekvenáló készülék

A kapilláris: 10-100 μm belső átmérőjű, 36 cm hosszú cső, melynek belső felülete vagy természetes állapotú vagy valamilyen inaktiváló réteggel van bevonva. A fluoreszcens festékkel jelölt DNS minta a kapillárisban lévő gélben vándorol, méret szerint elválasztódik, a kisebbek előbb haladnak el a detektor előtt, a nagyobbak később. A mintában található PCR termék méretének meghatározásához a festékben méretmarkerek - a mintától eltérő színű, ismert méretű fragmensek – találhatók (5. ábra).

Az elektroforézis az alábbi beállítással működött: Injekciós idő: 16 másodperc, injekciós feszültség 1200V. A géllal töltött kapillárisban a minta 39 perc 40 másodpercig futott 15000V feszültségen, 60 °C-os munkahőmérsékleten.

Az eredményeket a Genemapper Analysis szoftver (PE Applied Biosystems) analizálta. A kapilláris elektroforézis rendszer lehetővé teszi, hogy 1 bázispár pontossággal meghatározzuk a keletkezett PCR termék méretét.



5. ábra: Natriureticus peptid prekursor B gén hosszpolimorfizmus analízis GeneScanner program segítségével

Az eltérő hosszúságú, jelölt DNS termék a gélben az elektromos feszültség hatására méret szerint eltérő mértékben vándorol és a különböző termékek egyértelműen elválnak egymástól. Az ismeretlen hosszúságú terméket párhuzamosan futtatva ismert hosszúságú molekulastandarddal (piros csúcsok) a vándorlás mértéke alapján a termék (kék csúcsok) hossza kiszámítható. A függőleges tengelyen a fluoreszcencia intenzitás mértéke, a vízszintes tengelyen a futtatási távolság látható. A grafikonon a bal oldali kék oszlop a 16-os ismétlődésű, a jobb oldali kék oszlop a 19-es ismétlődésű allélnak felel meg.

3.4. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének meghatározása

A TTTC szekvenciák meghatározásával párhuzamosan a fenti csoportokból 50 egészséges terhes és a 220 súlyos praeclampsziás páciens vérében meghatároztam a plazma BNP szintet. A praeclampsziás pácienseknél a vérmintákat a praeclampszia diagnózisának felállításakor, a gyógyszeres kezelés megkezdése előtt - a DNS polimorfizmus vizsgálat mintáival egyidőben, de attól független kémcsőben - vettük. A levett mintákat EDTA tartalmú kémcsőbe gyűjtöttem majd tíz percig 3000 fordulatszámmal centrifugáltam le és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottam. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének meghatározásához a vizsgálat előtt az EDTA tartalmú plazma mintákat először felolvasztottam $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ -os vizes fürdőben 30 - 60 percen keresztül. A reagensbetétbe történő betöltés előtt a csőben lévő mintákat óvatosan körülbelül három másodpercen keresztül megforgattuk.

Ezután 250 μl plazmából immunfluoreszcens módszerrel (Triage BNB test, Biosite Diagnostics Incorporated, San Diego, California, USA) meghatároztam a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjét. A Triage BNP teszt egy szendvics fluoreszcens immunoassay [142,143,144]. A rendszer egy többfunkciós mérőeszközből - ez a Triage Meter (6. ábra), és egy egyszerűhasználatos, eldobandó műanyag reagensbetétből áll (7. ábra). A módszer EDTA-antikoagulált vérplazma mintákban rekombináns egér antitestek felhasználásával egyszerre alkalmazza a standard immunoassay technikát a BNP célfehérje kvalitatív és kvantitatív kimutatására. A reagensbetét két különböző BNP specifikus monoklonális antitestet tartalmaz. Az egyik antitest a reagensbetét szilárd belső felszínén rögzített (capture zone), míg a másik antitest oldott állapotban fluoreszcens nanorészecskékhez konjugált (detection). Az eszközbe integrált ellenőrző mechanizmusokat terveztek, pozitív és negatív kontrollokkal együtt. Ezek biztosítják a teszt megbízhatóságát és a reagensek helyes működését. Az EDTA tartalmú vérplazmát pipetta felhasználásával, a reagensbetét megadott mintafellevő helyébe (port) cseppentjük. A vérplazma a reagensbetét preformált diagnosztikus útvonalán, kapilláris elv alapján folyik végig és feloldja a fluoreszcens nanorészecskéket. A mintában található BNP hozzákötődik a nanopartikulumokhoz kötődő antitestekhez és multivalens komplexet hoznak létre. Ezek a komplexek az immobilizált antitestek által elfogásra kerülnek, az úgynevezett elfogási

zónában (capture zone). A diagnosztikus útvonal mentén az ellenőrző rendszerek számára elkülönített zónák találhatóak. A reagensbetétet a plazma betöltése után a mérőeszközbe (Triage Meter) helyeztem. A BNP plazmakoncentrációjának mennyiségi meghatározása 5 to 5000 pg/ml tartományban történik. Az eredmény a mérőeszköz monitorán körülbelül 15-20 perc múlva jelenik meg és kinyomtatásra kerül. A kalibrációhoz szükséges információkat egy BNP-re specifikus EPROM chip (az úgynevezett code chip module) közvetíti a mérőeszköznek (8. ábra).

A mérési tartományon kívül eső értékeket a legközelebbi hozzátartozó határértékként jeleníti meg a monitoron. Például bármely < 5 pg/ml érték 5 pg/ml-ként és bármely > 5000 pg/ml érték 5000 pg/ml értékként kerül feltüntetésre. A Triage Meter automata módon monitorizálja az immunoassay progresszióját és jelzi a BNP koncentrációját annak befejeztével. A BNP meghatározási módszerek pontosságát tanulmányozó 2005 - 2011 között végzett vizsgálat alapján az ezzel készülékkel több mint 750 mintában meghatározott BNP értékek szóródási együtthatója (variációs koefficiens, CV) 19,6% volt [145]. A gyári adatok alapján a teszt 8,8-11,6% intra-assay és 9,9-12,2% inter-assay pontossággal rendelkezik 71,3 és 4087,9 pg/ml értékek között [142].



6. ábra: Triage Meter többfunkciós mérőeszköz



7. ábra: Egyszerhasználatos, eldobandó BNP-re specifikus műanyag reagensbetét Triage Meter készülékhez



8. ábra: A Triage Meter BNP-re specifikus EPROM chipje

3.5. Biokémiai markerek

A TTTC polimorfizmus és a BNP plazmaszintek meghatározásával párhuzamosan a fenti csoportokból 40 egészséges terhes és 20 korai kezdetű-, illetve 20 késői kezdetű súlyos praeclampsias páciens vérében meghatároztam a vérkép elemeit (fehérvérsejt- és vérlemezkeszámot, illetve a hemoglobin és hematokrit értékeket), szérum elektrolitszinteket (Na^+ , K^+ , Cl^-) valamint a vesék működését jellemző paramétereket (karbamid, kreatinin, húgysav és összfehérje szinteket). A praeclampsias pácienseknél a vérmintákat a praeclampsia diagnózisának felállításakor, a gyógyszeres kezelés megkezdése előtt - a DNS polimorfizmus vizsgálat és a BNP plazmaszint meghatározásának mintáival egyidőben, de attól független kémcsőben - vettük. A levett mintákat EDTA tartalmú kémcsőbe gyűjtöttem majd tíz percig 3000 fordulatszámmal centrifugáltam le és a felhasználásig $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on lefagyasztottam. A praeclampsias betegek felvétele kapcsán 24 órán keresztül tartó vizeletgyűjtést végeztünk és a mintákból a vizeletben ürített fehérjemennyiségét határoztuk meg. A standard laboratóriumi paraméterek meghatározása a Semmelweis Egyetem Központi

Laboratóriumában autoanalizátorok segítségével történt. A vérképet Advia 120 Hematology System (Advia Centaur BNP, Siemens Healthcare Diagnostics, TarryTown, NY 10591-5097, USA) készüléssel vizsgálták. A karbamid, húgysav, szérum elektrolit és összfehérje, valamint a 24 órás vizeletfehérjeürítés mértékének meghatározására Beckman Coulter AU5800 System (Beckman Coulter, Inc. Diagnostics Division Headquarters 250 South Kraemer Boulevard Brea, CA 92821-6232, USA) készüléket használtak. A kreatinin mérés nem-enzimatis, kinetikus Jaffe módszerrel történt.

3.6. Statisztikai módszerek

A folyamatos változók az átlagérték \pm standard deviáció (SD), vagy a medián érték (interkvartilis tartomány, IQR) feltüntetésével jellemeztem szükség szerint. A statisztikai számítások elvégzésére a STATISTICA szoftver csomagot használtam (version 8; StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). A normális eloszlás meghatározására a Shapiro-Wilks tesztet végeztem. Tekintettel, arra, hogy a folyamatos változók nem a normális eloszlást mutatták, ezért nem paraméteres (non-parametric) statisztikai módszereket alkalmaztam. A különböző folyamatos változók összefüggéseire és a betegcsoportok adatainak összehasonlítására Mann-Whitney U próbát, Fischer exact tesztet és Pearson Chi négyzet (χ^2) tesztet végeztem, ahol $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak. A kategorikus elemek összehasonlítására, így az allélek és genotípusok gyakoriságának vizsgálatára Pearson Chi négyzet (χ^2) tesztet végeztem. A BNP plazmaszintek összehasonlítására Mann-Whitney U próbát, kettőnél több csoport összevetése esetén Kruskal-Wallis tesztet használtam. A lehetséges együtttható változók, zavaró tényezők adjusztálása céljából többváltozós logisztikus regressziót végeztem. A BNP plazma szintek és a betegek klinikai tüneteinek, illetve laboratóriumi paramétereinek összefüggését vizsgálva Spearman féle rangkorrelációs együttthatókat számoltam. Súlyos praeclamspiás betegeknél a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének vágópont (cut-off point) meghatározására ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízist végeztem.

3.7. A vizsgálatok etikai vonatkozásai

A vizsgálat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történt. A részletes betegtájékoztatást követően minden résztvevő beleegyező nyilatkozatot írt alá, melyben a tájékoztatás tényét rögzítettük. Perifériás vérből a vizsgálati mintavétel egy szokványos vérvétel kapcsán történt. A betegek számára külön megterheléssel nem járt a kutatásban való részvétel. A betegeket nem érte semmilyen hátrány és megkülönböztetett ellátás, amennyiben nem járultak hozzá a vizsgálatokban való részvételükhöz. Vizsgálataink a Helsink Deklaráció legfrissebb verziójában rögzített elveknek megfelelően zajlottak. A betegek ellátása minden tekintetben a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján szokásos protokollok szerint folyt. A betegek személyes és klinikai adatait a vizsgálatok során végig anonim módon kezeltem.

4. Eredmények

4.1. A vizsgálatba bevont betegek jellemzése

Vizsgálatainkba összesen 455 terhest vontunk be. A súlyos praeclampsziával kezelt betegek csoportjába 220 fő, a kontrollcsoportba 235 egészséges terhes tartozott. A páciensek főbb demográfiai és az újszülöttek perinatális adatait a 3. táblázat tartalmazza.

Az anyai életkor tekintetében az egészséges és a súlyos praeclampsziával kezelt terhesek között szignifikáns eltérés nem mutatkozott. Mindkét csoportban a dohányzók –naponta legalább 1 szál cigarettát elszívók- aránya igen magas, egyaránt 20% feletti volt. A súlyos praeclampsziával kezelt betegeknek a terhesség felismerésekor mért testtömege nagyobb volt a normotenzívékéhez viszonyítva. A terhesség alatti testsúlygyarapodásban nem találtunk szignifikáns különbséget az egészséges és a súlyos praeclampsziás terhesek között. Beteganyagunkban a súlyos praeclampsziások között az először szülők aránya magasabb volt az egészséges terhesekhez képest.

A súlyos praeclampsziás betegek esetében szüléskor a terhességi kor alacsonyabb, így a koraszülések aránya szignifikánsabb magasabb volt az egészségesekéhez képest. Az újszülöttek születési súlya részben a koraszülések nagyobb aránya, részben a több mint tízszeres magzati növekedési retardációs gyakoriság miatt a súlyos praeclampsziás csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt. Az újszülöttek megszületés utáni 1 és 5 perces Apgar értékeit megvizsgálva mindkét paraméter esetében a normotenzív terhesek esetében magasabb volt a súlyos praeclampsziásokéhoz képest.

Az egészséges terhesek között a császármetszés frekvenciája 35,3%, míg a praeclampsziásoknál 92,7% volt.

3. táblázat: A vizsgálatban részt vevő páciensek klinikai adatai

A folyamatos változóknál medián értéket adtunk meg (interkvartilis tartomány). A nem folyamatos változóknál átlagértéket és szórást.

	Praeclampsia n=220	Kontroll n=235	p érték
Anyai életkor (év)	30 (27-34)	31 (28-34)	NS
Terhesség előtti BMI (kg/m²)	23,4 (21,5-25,8)	22,1 (20,2-24,9)	p<0,001
Primiparitás (%)	147 (66,8)	108 (45,9)	p<0,0001
Dohányzás (%)	45 (20,5)	52 (22,1)	NS
Terhességi hét szüléskor	34 (31-37)	39 (38-40)	p<0,001
Magzati születési súly (g)	1850 (1235-2695)	3270 (3020-3660)	p<0,001
IUGR (%)	65 (29,5)	6 (2,6)	p<0,0001
Súlyos IUGR (%)	28 (12,7)	1 (0,4)	p<0,0001
Apgar 1 perc	8,13 ±1,37	8,97 ±0,44	p<0,0001
Apgar 5 perc	9,24 ±1,31	9,93 ±0,27	p<0,0001

4.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának meghatározása súlyos praeclampsias és egészséges terhesek között

A kapilláris elektroforézis rendszer segítségével meghatároztuk az NPPB gén (TTTC)_n mikroszatellita polimorfizmusának allél eloszlását a kontroll és a praeclampsias csoportokban (4. táblázat). A tetranukleotid ismétlődések száma szerint összesen 12 féle allélt találtunk a 8 és 20 ismétlődés közti tartományban. A leggyakoribb allélek mindkét csoportban a 11 és a 16 ismétlődést mutatóak voltak mindkét vizsgálati csoportban. Az egészségesek között mind a 12 féle allél kimutatható volt, a praeclampsiasok között csak 10 félélt találtunk. Ebben a csoportban a 8-os és 20-os ismétlődésű allél nem fordult elő. Ez a két allél azonban az egészséges terhesek között is csak igen csekély hányadban volt megtalálható.

4. táblázat: A natriureticus peptid B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása praeclampsias és egészséges gravidák között

Csoport/Allél	Praeclampsia n*=440 (%)	Kontroll n*=470 (%)
8	0	3 (0,64)
10	3 (0,68)	20 (4,26)
11	265 (60,23)	225 (47,87)
12	20 (4,55)	42 (8,94)
13	11 (2,5)	12 (2,55)
14	5 (1,14)	9 (1,91)
15	2 (0,45)	7 (1,49)
16	110 (25)	114 (24,26)
17	12 (2,73)	22 (4,68)
18	6 (1,36)	5 (1,06)
19	6 (1,36)	8 (1,7)
20	0	3 (0,64)

*: Az n érték az allélszámot és nem a páciensek számát jelöli. Autoszómális kromoszóma génjeként személyenként két allél található.

Az allélek eloszlása szignifikánsan különbözik a vizsgált csoportokban ($p=0,0002$). A 11-es ismétlődésű allél előfordulása alacsonyabb az egészséges kontrollcsoportnál (47,87%) a praeclampsiasokéhoz képest (60,23%) ($p=0,0002$). Ezzel ellentétben a 10-es ismétlődésű allél frekvenciája az egészséges kontroll csoportban magasabb a praeclampsiasokhoz képest (4,26%, illetve 0,68%) ($p=0,0005$). Hasonló a 12-es ismétlődésű allél gyakorisága a kontroll csoportban a praeclampsiasokhoz képest (8,94%, illetve 4,55%) ($p=0,0118$). A 16-os ismétlődésű

allél frekvenciája 24,26% volt az egészséges várandósok és 25% a súlyos praeclampsias betegek között ($p>0,05$).

4.3. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának meghatározása súlyos praeclampsias és egészséges terhesek között

Az 5. táblázat az NPPB gén (TTTC)_n mikroszatellita polimorfizmusának teljes genotípus eloszlását ábrázolja a kontroll és a praeclampsias csoportokban. A várandósokat vizsgálva összesen 35 féle genotípust írtunk le. Ezek közül a súlyos praeclampsias betegekben mindössze 20 féle, míg a kontrollcsoport várandósainál 32 féle genotípus fordult elő. A leggyakoribb genotípusok mindkét vizsgálati csoportban a 11 homozigóták és a 11:16 genotípusúak voltak. Az egészségesek között a harmadik leggyakoribb genotípus 16 homozigótáké, míg a súlyos praeclampsiasok között a 11:12 genotípussal rendelkezőké volt.

Ez az eloszlás (9. ábra) szignifikáns eltérést mutatott a vizsgált csoportokban ($p=0,027$). A 10-es ismétlődést hordozó genotípusúak szignifikánsan kevesebben voltak a súlyos praeclampsiasok között, a kontroll csoportéhoz képest ($p=0,032$). A demográfiai változók (terhesség előtti BMI, anyai életkor, primiparitás, dohányzás) adjusztálása után, a számított esélyhányados 0,19 (95% CI: 0,04-0,87) volt. Hasonlóképpen a 12-es ismétlődést hordozó genotípusúak szintén szignifikánsan kevesebben voltak a praeclampsiasok között, az egészséges terhesekhez képest ($p=0,037$). Az adjusztált esélyhányados ebben az esetben 0,53 (95% CI: 0,29-0,96). A 11-es ismétlődést hordozó genotípusúak előfordulási gyakorisága a praeclampsiasok között szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontrollokhoz képest ($p<0,001$). Az adjusztált esélyhányados 2,91 (95% CI: 1,75-4,84). A súlyos praeclampsias betegek közel 90%-a hordozta a 11-es ismétlődésű allélt (87,7%).

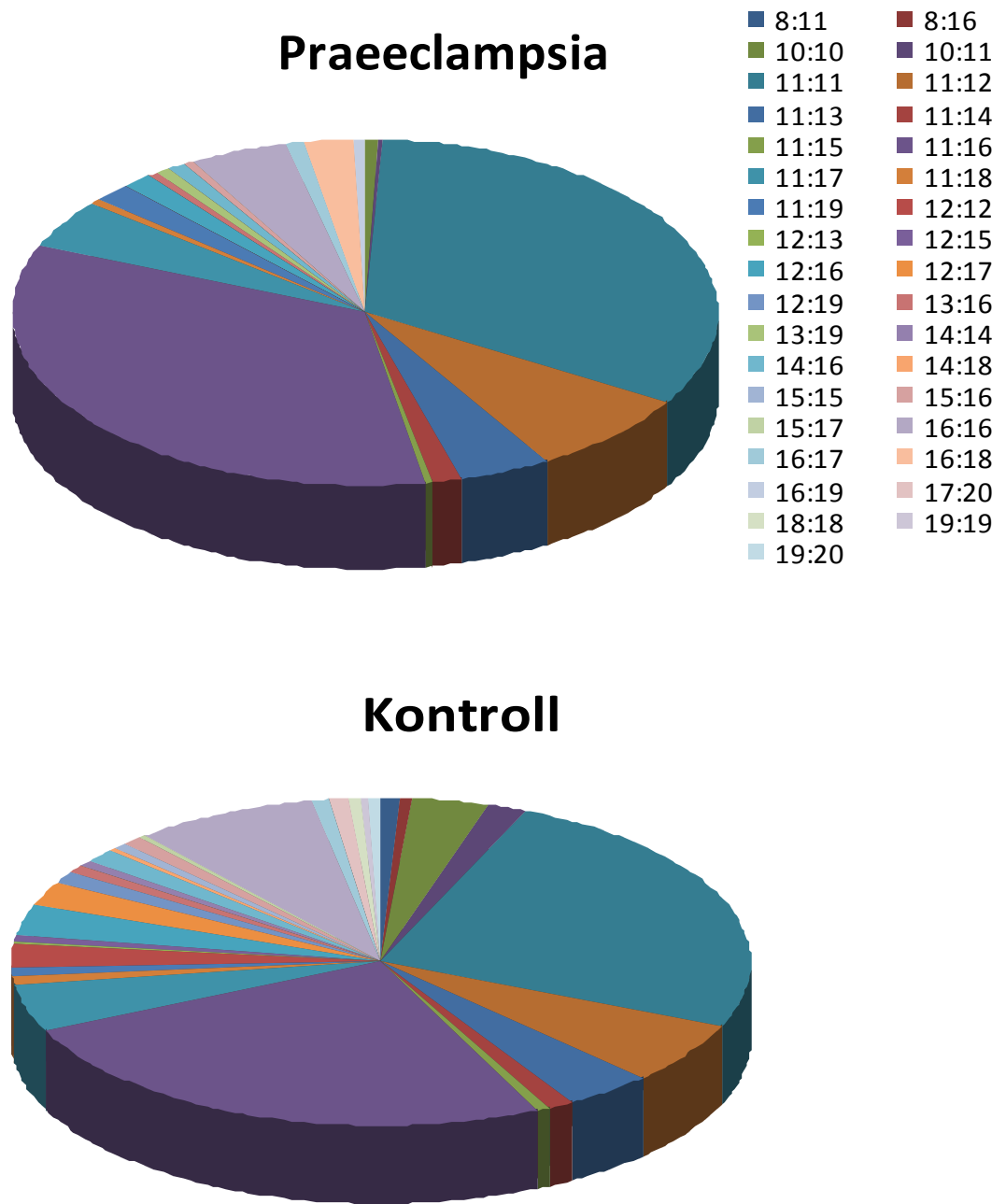
A 11-es ismétlődést mutató homozigóták aránya a súlyos praeclampsiasok között szignifikánsan nagyobb volt a normotónias várandósokhoz képest ($p<0,001$).

A 6. táblázat a 11-es ismétlődést hordozó homozigóta-, a 11-es ismétlődést hordozó heterozigóta- és az egyéb genotípusok eloszlását mutatja a különböző csoportokban. A súlyos praeclampsias betegek között a 11-es ismétlődést hordozó homozigóták

adjusztált esélyhányadosa magasabb /OR: 3,01 (95% CI: 1,66-5,44)/ volt a 11-es ismétlődést hordozó heterozigótákhoz /OR: 2,84 (95% CI:1,66-4,87)/ képest.

5. táblázat: A natriuretikus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések genotípus eloszlása praeclampsias és egészséges gravidák között

Csoport/Genotípus	Praeclampsia n=220 (%)	Kontroll n=235 (%)
8:11	0	2 (0,85)
8:16	0	1 (0,43)
10:10	1 (0,45)	8 (3,4)
10:11	1 (0,45)	4 (1,7)
11:11	72 (32,73)	59 (25,1)
11:12	17 (7,73)	14 (5,96)
11:13	9 (4,1)	9 (3,83)
11:14	3 (1,36)	3 (1,28)
11:15	1 (0,45)	1 (0,43)
11:16	75 (34,1)	59 (25,1)
11:17	10 (4,55)	11 (4,68)
11:18	1 (0,45)	2 (0,85)
11:19	4 (1,82)	2 (0,85)
12:12	0	5 (2,13)
12:13	0	1 (0,43)
12:15	0	1 (0,43)
12:16	3 (1,36)	7 (2,98)
12:17	0	6 (2,55)
12:19	0	3 (1,28)
13:16	1 (0,45)	2 (0,85)
13:19	1 (0,45)	0
14:14	0	1 (0,43)
14:16	2 (0,91)	3 (1,28)
14:18	0	1 (0,43)
15:15	0	1 (0,43)
15:16	1(0,45)	2 (0,85)
15:17	0	1 (0,43)
16:16	10 (4,55)	19 (8,09)
16:17	2 (0,91)	2 (0,85)
16:18	5 (2,27)	0
16:19	1 (0,45)	0
17:20	0	2 (0,85)
18:18	0	1 (0,43)
19:19	0	1 (0,43)
19:20	0	1 (0,43)



9. ábra: A genotípusok eloszlása a vizsgált súlyos praeclampsziás és a normotóniás kontroll csoportokban

6. táblázat: A 11 homozigóta és a 11 heterozigóta genotípusok eloszlásának összehasonlítása a vizsgált csoportokban

11 homozigóták versus egyéb genotípus hordozók:

adjusztált OR: 3,01 (95% CI: 1,66-5,44) $p < 0,001$ χ^2 teszt

11 heterozigóták versus egyéb genotípus hordozók:

adjusztált OR: 2,84 (95% CI: 1,66-4,87) $p < 0,001$ χ^2 teszt

esélyhányadosok (odds ratio) a terhesség előtti BMI-re, anyai életkorra, primiparitásra és a dohányzásra adjusztáltak.

Csoport/Genotípus	Praeclampsia n=220	Kontroll n=235
11 homozigóták esetszám (%)	72 (32,7%)	59 (25,1%)
11 heterozigóták esetszám (%)	121 (55%)	107 (45,5%)
Egyéb genotípusok esetszám (%)	27 (12,3%)	69 (29,4%)

4.4. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek meghatározása súlyos praeclampsziás és egészséges terhesek között

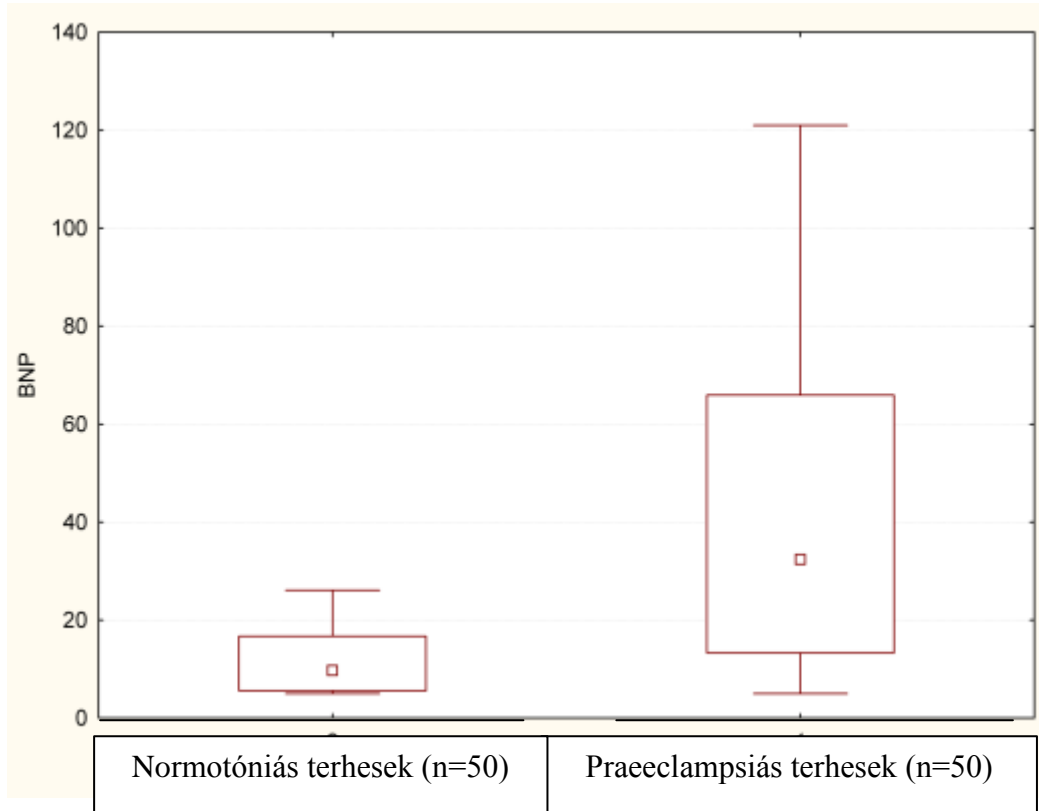
A szendvics fluoreszcens immunoassay módszer alkalmazásával 50 súlyos praeclampsziás beteg és 50 normotóniás várandós vérmintáiban meghatároztuk a BNP plazmaszinteket. A vizsgálatban részt vevő egyének demográfiai adatait a 7. táblázat tartalmazza. A két csoport esetében a várandósok életkorát, a terhesség előtti BMI-t, a dohányzók arányát és mintavételi terhességi kort tekintve sem volt szignifikáns különbség. A vérvétel minden esetben a harmadik trimeszterben történt.

7. táblázat: A plazma BNP szintek összehasonlításában részt vevő páciensek klinikai adatai

A folyamatos változóknál medián értéket adtunk meg (interkvartilis tartomány).

	Praeclampsia n=50	Kontroll n=50	p érték
Anyai életkor (év)	31 (28-36)	31 (28-34)	NS
Terhesség előtti BMI	22,6 (20,1-24,7)	21,9 (19,8-23,8)	NS
Primiparitás (%)	34 (68)	18 (36)	p<0,001
Dohányzás (%)	16 (32)	9 (18)	NS
Terhesség hét szüléskor	36 (32-38)	39 (38-40)	p<0,0001
Terhességi kor vérvételkor	35 (31-37)	36 (33-38)	NS
Születési súly (g)	2405 (1430-3000)	3420 (3150-3750)	p<0,001
IUGR (%)	11 (22)	1 (2)	p<0,0001
Súlyos IUGR (%)	4 (8)	1 (2)	p<0,0001

A BNP szintje a súlyos praeclampsziás betegekben magasabb volt a normotóniásokhoz képest. A hormon plazmakoncentrációjának medián értéke a súlyos praeclampsziások között 32,40 (13,30-65,90) pg/ml, míg az egészséges várandósok esetében 9,75 (5,6-16,7) pg/ml volt (10. ábra). Ez a különbség szignifikáns mértékűnek bizonyult ($p<0.0001$).



10. ábra: Normotóniás terhesek és súlyos praeclampsiás betegek plazma BNP szintjeinek összehasonlítása

A vízszintes síkban a vizsgálat várandósok csoportjai, a függőleges síkban a plazma BNP szintjének értékei található pg/ml mértékegységben megadva. A „doboz” közepén levő pont a medián, a doboz lapjai a kvartilisek, a dobozból kinyúló vonalak (kerítés) az adatok terjedelmét mutatják (non-outlier range). A dobozon belül található az adatok 25–75%-a.

4.5. A natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei közötti összefüggések vizsgálata

A B típusú natriureticus peptid plazmakoncentrációk meghatározása után a várandósok (TTTC)_n polimorfizmusának genotípus eloszlását hasonlítottuk össze a peptidszintekkel. Összefüggést kerestünk a peptidet kódoló gén promoter régiójának mikroszatellita polimorfizmusa és a mért hormon plazmaszintjei között. A 11

ismétlődést mutató allélra homozigóta egészséges várandósok esetében magasabb BNP szintet találtunk az egyéb genotípussal rendelkező várandósokhoz viszonyítva. (13,9 (5-21,8) pg/ml, illetve 9,0 (5,6-15,9) pg/ml). Ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p>0,05$). A súlyos praeclampsziás betegek esetében szintén magasabbak voltak a 11 ismétlődést mutató homozigóta genotípusúak plazma BNP szintjei az egyéb genotípussal rendelkező praeclampsziásokhoz képest (64,5 (28,75-93,15) pg/ml illetve 17,8 (8,1-36,9) pg/ml). Ez a különbség szignifikáns mértékűnek mutatkozott ($p<0,001$).

A 8. táblázat a 11-es ismétlődést hordozó genotípusok és a szérumban lévő BNP koncentrációk kapcsolatát ábrázolja. A 11-es ismétlődésű allélra homozigóta, illetve heterozigóta és az allélt nem hordozó egyéb genotípusúak BNP plazmaszintjeit Kruskal-Wallis teszttel összehasonlítva a súlyos praeclampsziás betegeknél szignifikáns eltérést találtunk ($p=0,03$).

8. táblázat: Az NPPB gén 5' régiójában található (TTTC)_n tandem polimorfizmus genotípusainak és a BNP plazmaszintjeinek összehasonlítása

A táblázatban vastagon a mediánérték, zárójelben az interkvartilis tartomány lett jelölve.
*11 homozigóták, 11 heterozigóták versus egyéb genotípus hordozók a praeclampsziás csoportban

$p=0.03$ Kruskal-Wallis teszt

Genotípus	Praeclampsia * BNP szint (pg/ml)	Kontroll BNP szint (pg/ml)
11 homozigóták	64,5 (28,75-93,15)	13,9 (5-21,8)
11 heterozigóták	24,1 (8,5-36,7)	10,1 (6-18,5)
Egyéb genotípusok	14,5 (7,2-92,4)	7,95 (5,45-12,45)

4.6. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek között

A vizsgálatainkban részt vett 220 súlyos praeclampsiás terhes közül 127-nél kezdődtek a betegség tünetei a 34. terhességi hét betöltését megelőzően és 93-nál ezt követően. A mikroszatellita polimorfizmus meghatározása után a praeclampsiás terhesekből létrehozott alcsoportokban is meghatároztuk az allél és genotípus eloszlásokat, illetve elvégeztük a B típusú natriureticus peptid plazma koncentrációnak mérését.

4.6.1. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek között

A korai és késői kezdetű súlyos praeclampsiás terhesek NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusának alléleloszlását a 9. táblázat ábrázolja. A két alcsoportban a súlyos praeclampsiások között talált mind a 8 féle allél előfordult. Az alléleloszlásokat összehasonlítva szignifikáns különbség nem mutatható ki ($p=0,21$).

A két alcsoport alléleloszlását a 235 egészséges várandósnak magába foglaló kontrollcsoporthoz hasonlítva megállapítható, hogy a késői kezdetű kezdetű praeclampsiások alléleloszlása nem ($p=0,073$), azonban a korai kezdetű praeclampsiások alléleloszlása szignifikáns eltérést mutat az egészségesekéhez képest ($p=0,0064$). A leggyakoribb a 11-es ismétlődésű allél mindkét alcsoportban. A korai kezdetű praeclampsiásoknál az allél 63%-os, míg a késői kezdetűeknél 56,45% gyakoriságot mutat.

9. táblázat: A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása korai és késői kezdetű praeclampsiasok között

Csoport/Allél	Korai kezdetű Praeclampsia n*=254 (%)	Késői kezdetű Praeclampsia n*=186 (%)
10	2 (0,79)	1 (0,54)
11	160 (63,0)	105 (56,45)
12	11 (4,33)	9 (4,83)
13	6 (2,36)	5 (2,69)
14	2 (0,79)	3 (1,62)
15	1 (0,39)	1 (0,54)
16	58 (22,83)	52 (27,96)
17	8 (3,15)	4 (2,15)
18	2 (0,79)	4 (2,15)
19	4 (1,57)	2 (1,07)

*: Az n érték az allélszámot és nem a páciensek számát jelöli. Autoszómális kromoszóma génjeként személyenként két allél található.

4.6.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának vizsgálata korai és késői kezdetű súlyos praeclampsias terhesek között

A 10. táblázat mutatja az NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusának genotípuseloszlását korai és késői kezdetű súlyos praeclampsias terheseknél. A genotípusokat vizsgálva az alléleloszláshoz hasonló összefüggéseket találtunk. A korábban leírt 20 féle genotípus közül mind a két praeclampsias csoportban 16-16 féle genotípust találtunk. Ezek közül 12 féle volt identikus. A két alcsoport genotípuseloszlásában szignifikáns különbség nem mutatkozott ($p=0,195$).

10. táblázat: A natriuretikus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések eloszlása korai és késői kezdetű praeclampsziások között

Csoport/Genotípus	Korai kezdetű praeclampsia n=127 (%)	Késői kezdetű praeclampsia n=93 (%)
10:10	1 (0,79)	0
10:11	0	1 (1,08)
11:11	46 (36,22)	26 (27,95)
11:12	10 (7,87)	7 (7,52)
11:13	5 (3,93)	4 (4,3)
11:14	1 (0,79)	2 (2,15)
11:15	1 (0,79)	0
11:16	41 (32,28)	34 (36,56)
11:17	7 (5,51)	3 (3,22)
11:18	0	1 (1,08)
11:19	3 (2,36)	1 (1,08)
12:16	1 (0,79)	2 (2,15)
13:16	1 (0,79)	0
13:19	0	1 (1,08)
14:16	1 (0,79)	1 (1,08)
15:16	0	1 (1,08)
16:16	5 (3,93)	5 (5,37)
16:17	1 (0,79)	1 (1,08)
16:18	2 (1,58)	3 (3,22)
16:19	1 (0,79)	0

A praeclampsziás betegek genotípuseloszlását az egészséges várandósok csoportjához hasonlítva megállapítható, hogy a késői kezdetű praeclampsziások genotípuseloszlása nem ($p=0,366$), azonban a korai kezdetű súlyos praeclampsziások genotípuseloszlása szignifikáns eltérést mutat az egészségesekéhez képest ($p=0,0137$). A leggyakoribb genotípusok mindkét vizsgálati csoportban a 11 ismétlődést mutató homozigóták, illetve a 11:16 és a 11:12 genotípussal rendelkezőké voltak. A korai és a késői kezdetű praeclampsziások között a 11:16 (32,28%, illetve 36,56%) és a 11:12 (7,87%, illetve 7,52%) genotípus előfordulása hasonló volt. A 11 ismétlődést mutató homozigóták a korai kezdetű praeclampsziásoknál gyakoribbak voltak (36,22%, illetve 27,95%). A súlyos praeclampsziás és az egészséges várandósokat összehasonlítva a 11 homozigóták esélyhányadosa a korai kezdetűeknél magasabb /OR: 1,694 (95% CI: 1,06-2,7)/ volt a késői kezdetű praeclampsziásokhoz /OR: 1,22 (95% CI: 0,71-2,08)/ képest.

4.6.3. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek összehasonlítása a korai és késői kezdetű súlyos praeclampsziás terhesek körében

A 127 korai kezdetű és a 93 késői kezdetű súlyos praeclampsziás beteg BNP plazmakoncentrációi szignifikáns eltérést mutattak ($p < 0,05$). A korai kezdetűeknél a hormon szintjének medián értéke 40,55 (28,5-82,7) pg/ml, míg a késői kezdetű praeclampsziásoknál ez az érték 24,10 (13,30-65,90) pg/ml volt. A natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei közötti összefüggéseket vizsgálva, a korai kezdetű praeclampsziások körében a 11-es ismétlődést mutató homozigóta genotípusúak esetében magasabb BNP koncentrációkat találtunk az egyéb genotípussal rendelkezőkhöz képest /67,05 (33,7-102,1) pg/ml, illetve 26,2 (14,3-39,5) pg/ml/. Ez a különbség szignifikáns mértékű ($p < 0,0001$). A késői kezdetű praeclampsziásokat vizsgálva hasonló összefüggés mutatkozott. A 11 homozigóták BNP koncentrációinak mediánértéke 55,8 (28,75-93,15) pg/ml, az egyéb genotípusúaknál ez az érték: 17,1 (7,1-35,2) pg/ml ($p < 0,0001$).

4.7. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus és az intrauterin magzati retardáció közötti kapcsolat vizsgálata súlyos praeclampsziás terhesek körében

A vizsgálatainkban részt vett 220 súlyos praeclampsziás terhes újszülöttjei közül 155 bizonyult nemre és terhességi korra eutrófnak. A 65 további újszülött 10 percentilis alatti súllyal jött világra, így őket méhen belüli magzati növekedési retardációval érintetteknek (IUGR10 percentilis) tekintettük. Ezen újszülöttek közül 28-an 3 percentilis alatti súllyal születtek. Őket a súlyos magzati növekedési retardáció diagnózisa miatt egy külön alcsoportba soroltuk. Így végül 3 vizsgálati csoport alakult ki (Eutróf, IUGR 10 percentilis, IUGR 3 percentilis) amelyből az IUGR 3 percentilis alcsoport, az IUGR 10 percentilis csoport részhalmaza. A mikroszatellita polimorfizmus meghatározása után a súlyos praeclampsziás terhesekből létrehozott alcsoportokban is meghatároztuk az allél és genotípus eloszlásokat, illetve elvégeztük a B típusú natriureticus peptid plazma koncentrációnak mérését. Tekintettel, hogy a 230

normotóniás várandós újszülöttjei között az intrauterin magzati retardációt mutatók igen alacsony számban fordultak elő (6 újszülött, 2,6%), illetve közülük mindössze egy újszülött tartozott a súlyos magzati növekedési zavart mutatók közé ezért a kontrollcsoportot nem osztottuk fel további alcsoportokra.

4.7.1. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus alléleloszlásának és az intrauterin magzati retardáció előfordulásának vizsgálata súlyos praeclampsiás terhesek között

Az NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusának alléleloszlását és az intrauterin magzati retardáció jelenlétét, illetve súlyossági fokát a 11. táblázat ábrázolja. Az eutróf magzatokat világra hozó terhesek esetében a súlyos praeclampsiások között talált mind a 8 féle allél előfordult. Az intrauterin magzati retardáció által érintett terhesek között a 15-ös ismétlődésű allél nem volt megtalálható. A súlyos magzati retardáció szövődményével jelzett alcsoportban a 15-ös ismétlődésű allél mellett a 12-es ismétlődésű allél sem fordult elő. A leggyakoribb allélnek a 11-es ismétlődést találtuk mindhárom alcsoportban. Legmagasabb arányban az eutróf csoportban (62,26%), míg az IUGR 10 percentilis csoportban 55,39% fordult elő. A súlyos magzati retardációt jelentő, IUGR 3 percentilis alcsoportban a 11-es ismétlődésű allél gyakorisága 44,64%, mely alacsonyabb a normotóniás várandósokhoz képest (47,87%).

Az alléleloszlásokat összehasonlítva az eutróf és az IUGR 10 percentilis csoport tagjai között szignifikáns különbség nem mutatható ki ($p=0,0781$). Az eutróf és az IUGR 3 percentilis alcsoport között az alléleloszlás szignifikáns eltérését találtunk ($p=0,0052$).

Az egészséges kontrollcsoport alléleloszlásához hasonlítva a súlyos praeclampsiás terhesek közül az eutróf magzatokat szülők csoportjának alléleloszlása különbözött szignifikánsan ($p=0,0022$). Az IUGR 10 percentilis és IUGR 3 percentilis csoportok esetében nem találtunk ilyen különbséget.

11. táblázat: A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések allél eloszlása súlyos praeclampsiasok között az intrauterin magzati retardáció függvényében

Csoport/ Allél	Praeclampsia Eutróf magzatok n*=310 (%)	Praeclampsia IUGR 10 percentilis n*=130 (%)	Praeclampsia IUGR 3 percentilis n*=56 (%)
10	1 (0,32)	2 (1,54)	2 (3,57)
11	193 (62,26)	72 (55,39)	25 (44,64)
12	18 (5,81)	2 (1,54)	0
13	7 (2,26)	4 (3,07)	1 (1,79)
14	3 (0,97)	2 (1,54)	2 (3,57)
15	2 (0,64)	0	0
16	71 (22,9)	39 (30)	20 (35,71)
17	8 (2,58)	4 (3,07)	2 (3,57)
18	3 (0,97)	3 (2,31)	3 (5,36)
19	4 (1,29)	2 (1,54)	1 (1,79)

*: Az n érték az allélszámot és nem a páciensek számát jelöli. Autoszómális kromoszóma génjeként személyenként két allél található.

4.7.2. A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus genotípuseloszlásának és az intrauterin magzati retardáció előfordulásának vizsgálata súlyos praeclampsias terhesek között

A 12. táblázat mutatja az NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusának genotípuseloszlását az intrauterin magzati retardáció jelenlétének, illetve súlyossági fokának figyelembevételével súlyos praeclampsias terhesek esetében. Súlyos praeclampsias terhességekben az eutróf magzatok szüleinek genotípuseloszlása szignifikánsan különbözött mind az IUGR 10 percentilis ($p=0,0239$), mind az IUGR 3

percentilis csoport ($p=0,0003$) szüleinek genotípuseloszlásához képest. A súlyos praeclampsziásoknál talált 20 féle genotípus közül az eutróf magzatok szüleinek csoportjában 16 féle genotípust találtunk. Az intrauterin magzati retardáció által érintett terhességekben 14 féle genotípus fordult elő. A két csoport között 12 féle genotípus volt identikus. A súlyos magzati retardáció diagnózisával létrehozott alcsoport mindössze 10 féle genotípust tartalmazott.

12. táblázat: A natriureticus peptid prekursor B gén (TTTC) tandem ismétlődések genotípuseloszlása súlyos praeclampsziások között az intrauterin magzati retardáció függvényében

Csoport/ Genotípus	Praeclampsia Eutróf magzatok n=155 (%)	Praeclampsia IUGR 10 percentilis n=65 (%)	Praeclampsia IUGR 3 percentilis n=28 (%)
10:10	0	1 (1,54)	1 (3,57)
10:11	1 (0,65)	0	0
11:11	52 (33,54)	20 (30,77)	7 (25)
11:12	15 (9,68)	2 (3,08)	0
11:13	6 (3,87)	3 (4,61)	1 (3,57)
11:14	2 (1,29)	1 (1,54)	1 (3,57)
11:15	1 (0,65)	0	0
11:16	52 (33,54)	23 (35,38)	8 (28,57)
11:17	8 (5,16)	2 (3,08)	0
11:18	1 (0,65)	0	0
11:19	3 (1,93)	1 (1,54)	1 (3,57)
12:16	3 (1,93)	0	0
13:16	0	1 (1,54)	0
13:19	1 (0,65)	0	0
14:16	1 (0,65)	1(1,54)	1 (3,57)
15:16	1 (0,65)	0	0
16:16	6 (3,87)	4 (6,15)	3 (10,72)
16:17	0	2 (3,08)	2 (7,14)
16:18	2 (1,29)	3 (4,61)	3(10,72)
16:19	0	1 (1,54)	0

A leggyakoribb genotípusok minden csoportban a 11-es ismétlődésű homozigóták és a 11:16 ismétlődéssel rendelkezők voltak. A 11-es ismétlődésű homozigóták (33,54%, illetve 30,77%) és a 11:16 (33,54%, illetve 35,38%) genotípusok

az eutróf és az IUGR 10 percentilis csoportban hasonló gyakoriságot mutattak. Az IUGR 3 percentilis alcsoportban a 11-es ismétlődésű homozigóták aránya 25% volt, mely a normotóniás várandósokkal egyezik meg. A 11:12 genotípus az eutróf magzatok szüleinél magasabb arányban volt megtalálható a méhen belül retardált magzatok szüleihez (IUGR 10 percentilis) képest (9,68%, illetve 3,08%). Az IUGR 3 percentilis alcsoportban ez a genotípus nem fordult elő.

Az eutróf magzatokat világra hozó súlyos praeclampsziás betegek genotípuseloszlását az egészséges várandósok csoportjához hasonlítva a súlyos praeclampsziások genotípuseloszlása szignifikáns eltérést mutat az egészségesekéhez képest ($p=0,035$). Az IUGR 10 percentilis és az IUGR 3 percentilis csoportokat a normotóniás várandósokhoz hasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget.

13. táblázat: A 11 homozigóta és a 11 heterozigóta genotípusok eloszlásának összehasonlítása az intrauterin magzati retardáció függvényében

*11 homozigóták versus egyéb genotípus hordozók: adjusztált OR: 4,47

(95% CI: 2,26-8,86) χ^2 teszt

11 heterozigóták versus egyéb genotípus hordozók: adjusztált OR: 4,30

(95% CI:2,27-8,14) $p < 0,0001$ χ^2 teszt

Az esélyhányadosok (odds ratio) a terhesség előtti BMI-re, anyai életkorra, primiparitásra és a dohányzásra adjusztáltak.

Genotípus/ Csoport	11 homozigóták	11 heterozigóták	Egyéb genotípusok
Praeclampsia Eutróf magzatok* n=155 (%)	52 (33,55%)	89 (57,42%)	14 (9,03%)
Praeclampsia IUGR 10 percentilis n=65 (%)	20 (30,77%)	32 (49,23%)	13 (20%)
Praeclampsia IUGR 3 percentilis n=28 (%)	7 (25%)	11 (39,29%)	10 (35,71%)
Kontroll n=235 (%)	59 (25,1%)	107 (45,5%)	69 (29,4%)

A 13. táblázat a 11-es ismétlődést hordozó homozigóta-, a 11-es ismétlődést hordozó heterozigóta- és az egyéb genotípusok eloszlását mutatja a különböző vizsgálati csoportokban. Az eutróf magzatokat szülő súlyos praeclampsias betegek között, a normotóniás várandósokhoz képest a 11-es ismétlődést hordozó homozigóták adjusztált esélyhányadosa magasabb /OR: 4,47 (95% CI: 2,26-8,86)/ volt a 11-es ismétlődést hordozó heterozigótákhoz /OR: 4,3 (95% CI:2,27-8,14)/ képest. Az IUGR 10 percentilis

és az IUGR 3 percentilis csoportokat a normotóniás várandósokhoz hasonlítva nem találtunk szignifikáns különbségeket.

4.7.3. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek vizsgálata az intrauterin magzati retardáció függvényében

A 155 eutróf-, illetve a 65 méhen belüli retardáció által érintett magzatot szült súlyos praeclampsziás terhes BNP plazmakoncentrációi szignifikáns eltérést nem mutattak ($p < 0,71$). Az eutróf magzatok szüleinél a hormon szintjének medián értéke 34,4 (10,2-70,9) pg/ml, míg az IUGR 10 percentilis csoport tagjainál ez az érték 29,0 (14,1-40,1) pg/ml volt. Az IUGR 3 percentilis alcsoportba sorolt terhesek BNP koncentrációinak medián értéke 31,2 (17,3-43,5) pg/ml volt.

4.8. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek és a praeclampsia klinikai tüneteinek illetve a betegséget jellemző laboreltérések közötti összefüggések vizsgálata

A 40 egészséges terhes és 20 korai kezdetű praeclampsziás beteg, illetve 20 késői kezdetű súlyos praeclampsziás páciens klinikai adatait a 14. táblázat tartalmazza. A különböző csoportok esetében a várandósok életkorát, a terhesség előtti BMI-t és a dohányzók arányát tekintve sem volt szignifikáns különbség. A vérvétel minden esetben a harmadik trimeszterben történt. Az első terhesgondozás kapcsán, az első trimeszterben mért vérnyomásértékek a normál tartományban voltak a vizsgált csoportokban, köztük szignifikáns eltérés nem mutatkozott. A korai kezdetű praeclampsziások a 34. terhességi hét betöltése előtt szültek.

14. táblázat: A plazma BNP szintek és a klinikai paraméterek összehasonlításában részt vevő páciensek klinikai adatai

	Korai kezdetű praeclampsia n=20	Késői kezdetű praeclampsia n=20	Kontroll n=40
Anyai életkor (év)†	30 (27-36)	31 (28-34)	31 (25-33)
Terhesség előtti BMI (kg/m²)†	24,0 (23,1-25,6)	24,2 (20,6-25,4)	24,1 (21,8-27,8)
Primiparitás (%)*	15 (75) ^b	14 (70) ^c	11 (27,5)
Dohányzás (%)*	6 (30)	7 (35)	12 (30)
Terhességi hét szüléskor†	31 (28-33) ^{b, d}	37 (36-38) ^e	39 (38-40)
Terhességi hét vérvételkor†	30 (28-32) ^{a, d}	36 (35-37) ^f	32 (30-35)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)†	175 (170-185) ^b	170 (158-180) ^f	120 (118-128)
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)†	110 (104-120) ^b	107 (98-110) ^f	80 (78-86)
Magzati születési súly (g) †	1200 (1040-1755) ^{b, c}	2940 (2640-3090) ^e	3410 (3150-3745)
IUGR (%)*	8 (40) ^{b, c}	1 (5) ^e	1 (2.5)
Szisztolés vérnyomás az első trimeszterben (Hgmm)†	120 (120-130)	120 (115.5-125)	120 (100-125)
Diasztolés vérnyomás az első trimeszterben (Hgmm)†	82 (80-90)	80 (75-84)	80 (79.5-90)

A folyamatos változóknál medián értéket adtunk meg (interkvartilis tartomány).

^a p<0,05 korai kezdetű praeclampsias illetve egészséges kontroll terhesek

^b p<0,001 korai kezdetű praeclampsias illetve egészséges kontroll terhesek

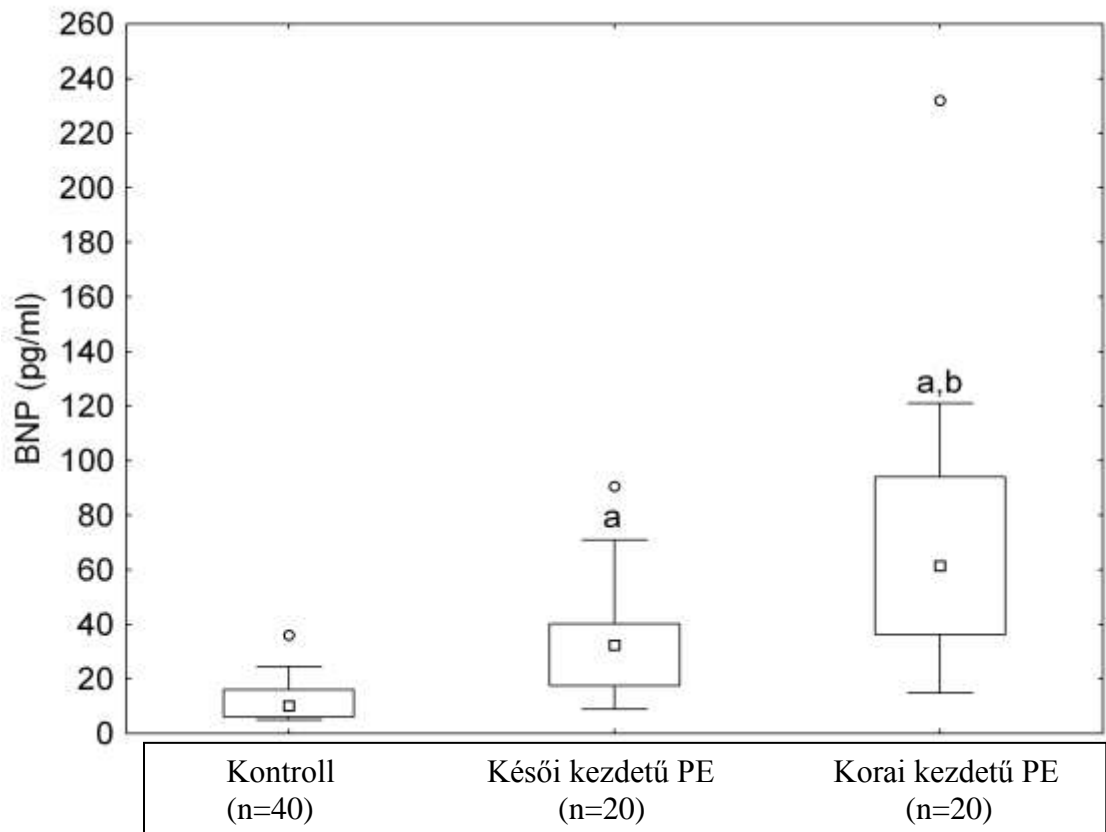
^c p<0,05 korai kezdetű praeclampsias illetve késői kezdetű praeclampsias betegek

^d p<0,001 korai kezdetű praeclampsias illetve késői kezdetű praeclampsias betegek

^e p<0,05 késői kezdetű praeclampsias illetve egészséges kontroll terhesek

^f p<0,001 késői kezdetű praeclampsias betegek illetve egészséges kontroll terhesek

†: Kruskal-Wallis analysis of variance by ranks test, *: Pearson χ^2 test



11. ábra: Normotóniás terhesek és korai-, illetve késői kezdetű praeclampsziás betegek plazma BNP szintjeinek összehasonlítása

A vízszintes síkban a vizsgálat várandósok csoportjai, a függőleges síkban a plazma BNP szintjének értékei található pg/ml mértékegységben megadva. A „doboz” közepén levő pont a medián, a doboz lapjai a kvartilisek, a dobozból kinyúló vonalak (kerítés) az adatok terjedelmét mutatják (non-outlier range). A dobozon belül található az adatok 25–75%-a. Körök: kívülállóérték (outlier).
Kruskal-Wallis teszt:

^a $p < 0,001$ korai- és késői kezdetű praeclampsziás betegek illetve egészséges kontroll terhesek

^b $p < 0,001$ korai kezdetű praeclampsziás- illetve késői kezdetű praeclampsziás betegek

A BNP szintje a korai kezdetű súlyos praeclampsziás betegek [61,35 (36,95-93,25) pg/ml] és a késői kezdetű praeclampsziás betegek [32,4 (19,15-39,2) pg/ml]

esetében is magasabb volt a normotóniásokhoz [10,05 (6,08-16,03) pg/ml] képest. Ez a különbség mindkét esetben szignifikáns mértékűnek bizonyult ($p < 0,001$) (11. ábra). Továbbá a korai kezdetű praeclampsziások BNP szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a késői kezdetűekhez képest ($p < 0,001$). A praeclampsziás csoportban szignifikáns inverz korrelációt találtunk a betegség kezdetének ideje és a plazma BNP szintek ($R = -0,56$, $p < 0,001$) között. A kontroll csoportban nem mutatkozott összefüggés a vérvételkori terhességi kor és a plazma BNP szintek között.

A vizsgált személyek laboratóriumi eredményeit a 15. táblázat ábrázolja. A vizsgált paraméterekben a három vizsgálati csoport között a fehérvérsejtszám, a vérlemezkeszám és a szérum klorid szint kivételével szignifikáns eltérés mutatkozott.

A korai kezdetű praeclampsziások között a hemoglobinszint szignifikánsan magasabb, míg a szérum nátrium szint alacsonyabb volt a késői kezdetű praeclampsziás és a normotóniás terhesekhez viszonyítva. Az egészséges terhesekhez képest a hematokrit, a szérum kálium, karbamid, húgysav szintek magasabbak, az összfehérje szint azonban szignifikánsan alacsonyabb volt mind a korai kezdetű-, mind a késői kezdetű praeclampsziás betegnél. Továbbá a korai kezdetű praeclampsziás betegek 24 órás vizelet fehérjeürítésének mértéke szignifikánsan magasabb volt a késői kezdetű praeclampsziás betegekhez viszonyítva.

A Spearman féle rangkorrelációs együttható kiszámításával, a demográfiai változók (terhesség előtti BMI, anyai életkor, primiparitás, dohányzás) adjusztálása után vizsgáltuk a BNP plazmaszintek és a praeclampszia klinikai tüneteinek illetve a betegséget jellemző laboreltérések közötti összefüggéseket. Az egészséges terhesek esetében a plazma BNP plazmaszintek az összfehérje szinttel és a vérlemezkeszámmal szignifikáns mértékben negatív ($R = -0,33$ és $-0,37$, mindkét esetben $p < 0,05$), a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékekkel pozitív ($R = 0,31$ és $0,32$, mindkettőnél $p < 0,05$) korrelációt mutattak. A késői kezdetű praeclampsziás betegeknél szintén a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek ($R = 0,64$, $p < 0,05$ és $R = 0,83$, $p < 0,001$), illetve a 24 órás fehérjeürítés korrelált pozitív módon szignifikánsan ($R = 0,48$, $p < 0,05$) a plazma BNP szintekkel. A korai kezdetű praeclampsziás betegeknél a szérum nátrium ($R = -0,6$, $p < 0,05$) és az összfehérje szintek ($R = -0,58$, $p < 0,05$) szignifikáns inverz összefüggést mutatnak a plazma BNP koncentrációval. A plazma BNP szintje pozitív korrelációt mutatott a korai kezdetű praeclampsziások csoportjában a vér hematokrit

($R= 0,59$, $p<0,05$), szérum kálium ($R= 0,66$, $p<0,05$), karbamid ($R= 0,59$, $p<0,05$) értékekkel és a 24 órás vizelet fehérjeürítéssel ($R= 0,62$, $p<0,05$).

15. táblázat: Az egészséges terhesek és a praeclampsias betegek biokémiai labor paramétereinek értékei

A folyamatos változóknál medián értéket adtunk meg (interkvartilis tartomány).

n.m.: nem mértük

†: Kruskal-Wallis teszt

*: Mann-Whitney U-test

^a $p<0,05$ korai kezdetű praeclampsias betegek illetve egészséges kontroll terhesek

^b $p<0,001$ korai kezdetű praeclampsias betegek illetve egészséges kontroll terhesek

^c $p<0,05$ korai kezdetű praeclampsias- illetve késői kezdetű praeclampsias betegek

^d $p<0,001$ korai kezdetű praeclampsias- illetve késői kezdetű praeclampsias betegek

^e $p<0,05$ késői kezdetű praeclampsias betegek illetve egészséges kontroll terhesek

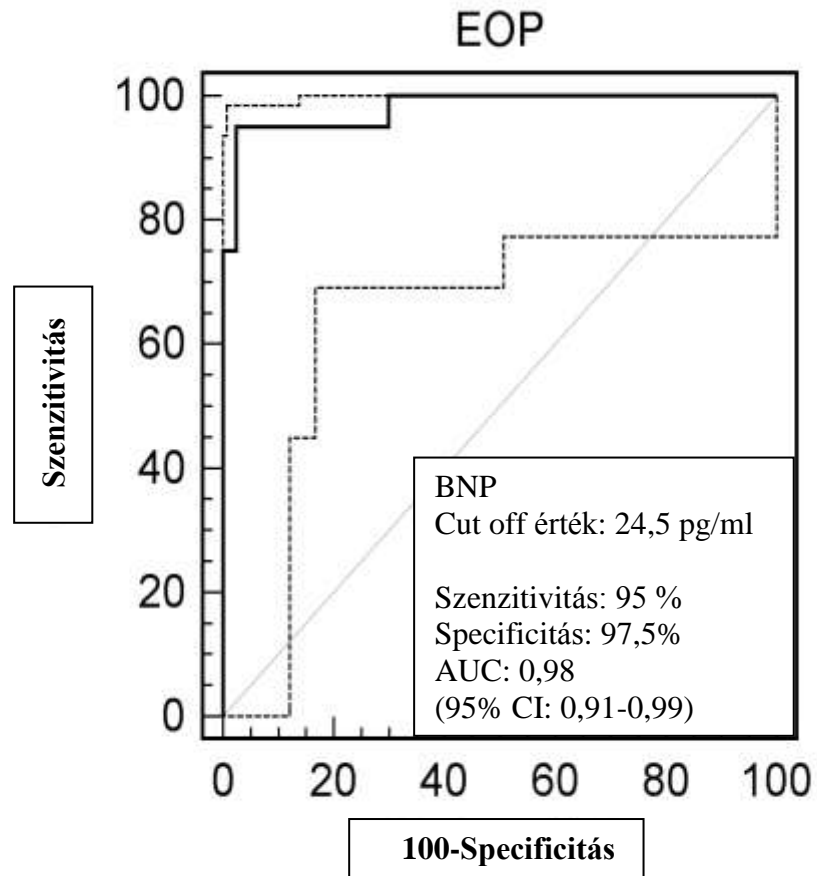
^f $p<0,001$ késői kezdetű praeclampsias betegek illetve egészséges kontroll terhesek

	Korai kezdetű praeclampsia n=20	Késői kezdetű praeclampsia n=20	Kontroll n=40
Hemoglobin (g/dl)†	13,2 (12,5-14,7) ^{b, c}	12,6 (11,3-13,1)	11,8 (11,4-12,2)
Hematokrit (%)†	36,9 (36,1-38,7) ^b	35,8 (33,7-39,1) ^e	34 (32,1-35,4)
Vérlemezke ($\times 10^{12}/l$)†	200 (168-240)	205 (153-238)	224 (196-270)
Fehérvérsejt ($\times 10^{12}/l$)†	11,2 (9,2-12,7)	9,7 (8,2-10,7)	9,4 (8,1-11,4)
Nátrium (mmol/l)†	136,7 (136-138,1) ^{b, c}	138,4 (138-139,8)	139,8 (138-141)
Kálium (mmol/l)†	4,5 (4,1-4,8) ^b	4,4 (4,1-4,7) ^e	4,1 (3,8-4,2)
Klorid (mmol/l)†	107,1 (105,3-109)	108,2 (107,5-109,8)	106 (105-109,1)
Karbamid (mmol/l)†	4,5 (3,7-5,9) ^b	4,0 (3,1-4,8) ^e	2,9 (2,7-3,4)
Kreatinin ($\mu\text{mol}/l$)†	62 (56,5-76,5) ^b	56,5 (50-69)	51 (45,5-59)
Húgysav ($\mu\text{mol}/L$)†	323,5 (284-360) ^b	320 (262-386) ^f	195 (161,5-212)
Összfehérje (g/dl)†	5,9 (5,53-6,18) ^b	6,29 (5,9-6,45) ^f	6,99 (6,84-7,15)
24 órás vizelet fehérjeürítés (g/24h)*	2,23 (1,1-5,3) ^c	0,89 (0,48-1,7)	n.m.

4.9. A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának (cut-off point) meghatározása súlyos praeclampsziás betegeknél

A fenti vizsgálati csoportokban a praeclampsziás betegek között ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízis segítségével meghatároztuk azt a plazma BNP cut-off értéket, mely a legjobban megközelítette a 100%-os szenzitivitást és a 100%-os specificitást. A 24,5 pg/ml plazma BNP koncentrációt találtuk mind a korai kezdetű-, mind a késői kezdetű praeclampsziás betegek és az egészséges terhesek elkülönítésére a legalkalmasabbnak.

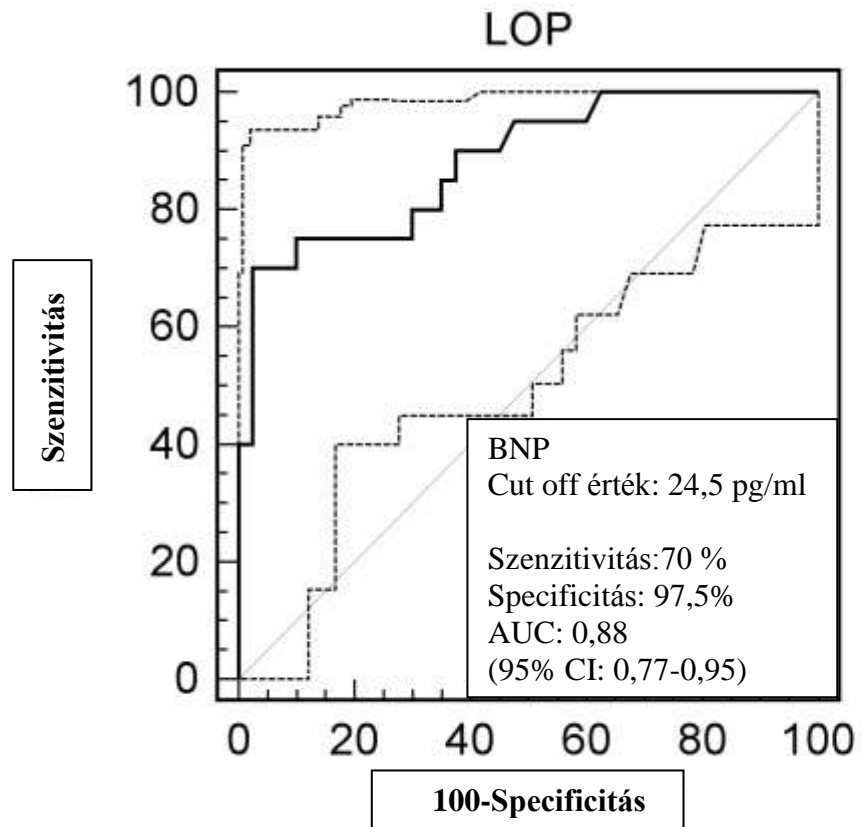
A korai kezdetű praeclampsziások esetében a szenzitivitás: 95%, a specificitás: 97,5% volt, míg a görbe alatti terület (area under curve, AUC) 95% CI mellett: 0,98 (0,91-0,99) $p < 0,001$ (12. ábra). A késői kezdetű praeclampsziásoknál ugyanilyen cut-off érték mellett a szenzitivitás 70%, a specificitás: 97,5% volt; míg a görbe alatti érték (AUC) 95% CI mellett: 0,88 (0,77-0,95) $p < 0,001$ értéket adott (13. ábra). A 24,5 pg/ml alatti plazma BNP szint a praeclampszia diagnosztikájában 85.1% negatív prediktív értékkel bírt.



12. ábra: A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának meghatározása korai kezdetű praeclampsias és egészséges terhesek között ROC görbe analízissel

szaggatott vonalak: konfidencia „szalagok”, confidence bands

AUC: görbe alatti érték, area under curve



13. ábra: A B típusú natriureticus peptid plazmaszint vágópontjának meghatározása késői kezdetű praeclampsia és egészséges terhesek között ROC görbe analízissel

szaggatott vonalak: konfidencia „szalagok” confidence bands

AUC: görbe alatti érték, area under curve

5. Megbeszélés

A praeclampsia az emberi fajra jellemző, a terhesség során kialakuló jelenleg ismeretlen eredetű, magas vérnyomással és szignifikáns fehérjevizeléssel jellemzett betegség. A mind morbiditás, mind mortalitás szempontjából jelentős kórkép előfordulása a terhesek között 5-7%-ra tehető. Magyarországon az anyai halálesetek egyharmada a terhesség alatt fenálló magas vérnyomás szövődésével hozható összefüggésbe. A fejlett egészségügyi rendszerrel bíró országokban a tromboembóliás megbetegedések után ez a második leggyakoribb ok. Világviszonylatban tekintve is a vérzés, illetve a szepszis mellett a harmadik számú anyai mortalitásért felelős tényező. Praeclampsias terhességből született magzatok esetében a perinatális mortalitás a gesztációs kor növekedésével párhuzamosan csökken. A 24-28. terhességi héten 60% fölötti, míg a 28-36. terhességi hét között 10% alatti ez az érték [146].

Vizsgálati anyagunkban a súlyos praeclampsias betegek között a koraszülés aránya 81,3%, a 10 percentilis alatti méhen belüli magzati retardáció aránya 29,5% volt. A súlyos retardációt mutató, 3 percentilis alatti magzatok aránya is 12% feletti volt. Vizsgálati csoportjainkban a súlyos praeclampsias és normotónias terhesek életkora nem különbözött szignifikánsan. A betegség rizikófaktoraként leírt többes terhességből, illetve kromoszóma rendellenességgel érintett magzatok szüleit nem vontuk be vizsgálatunkba. Jelen vizsgálatunkban a praeclampsiasok kétharmada (66,8%) volt először szülő, több mint 20%-al magasabb arányban az egészséges terhesekhez (45,9) képest. Mind az egészséges terhesek, mind a praeclampsiasok között a dohányzók aránya 20% feletti volt, nem mutatott különbséget. A dohányzás a praeclampsia egyik „paradox” védőfaktora. A dohányfüstből felszívódó anyagok a reaktív oxigéngyökök megkötése mellett az sflt-1 termelődésére is hatnak. Dohányzó terhesek vérében csökkent sflt-1 szinteket találtak [147]. A praeclampsias terhesek esetében a terhesség előtti testtömegindex (BMI) szignifikánsan nagyobb volt a normotóniasokhoz viszonyítva.

A B típusú natriureticus peptid szerepét korábban már igazolták a szervezet folyadék homeosztázisának szabályozásában [148]. A B típusú natriureticus peptid szintézisét fokozó tényezők között a tachycardia mellett, a glükokortikoidok, pajzsmirigyhormonok, endotelin-1 és az angiotenzin II szerepelnek. Az endotelin-1 és

az angiotenzin II a hemodinamikus aktivitástól függetlenül növeli mindkét hormon szintézisét. A BNP szintjét az NPPB gén „single nucleotid” polimorfizmusai is befolyásolhatják [106]. A natriureticus peptid precursor B gén 5' széli régiójában, a promoter régióban számos transzkripciós faktor számára alkalmas kötődési helyet találtak [54,149]. Ezek mellett leírtak pajzsmirigyhormonokra-, érfeszülésre reaktív, illetve aktivált T sejt nukleáris faktort kötő területeket is az 5' széli régió egyéb részein.

5.1. A natriureticus peptid prekursor B gén promoter régiójában leírt (TTTC)_n nukleotid szekvencia polimorfizmus szerepe

A változó számú, tandem jellegű ismétlődések hasznos markerek mind kapcsoltsági (linkage) vizsgálatok, mind diagnosztikai célok szempontjából [150,151]. Transzkripciós és translációs szabályozóként befolyásolhatják számos fehérje működését, ha a kódoló szekvenciában helyezkednek el.

Korábban más fehérjék (TTTC)_n mikroszatellita polimorfizmusának vizsgálatát igyekeztek a praeclampsia, illetve a HELLP-szindróma prognosztikai céljaira használni. A leptin ilyen jellegű alkalmazása az irodalmi adatok alapján nem nyert megerősítést. A 7-es kromoszóma hosszú karjának 31. régiójában elhelyezkedő leptin génről egy 167 aminosav hosszú leptin fehérje szintetizálódik, mely az energia homeosztázis szabályozása mellett fontos szerepet játszik az immunológiai szabályozásban is. Terhesekben a leptin termelésének fő helye a lepény, mely az anyai keringésbe kerülő leptin 95%-át termeli. Ismert, hogy az anyai keringésben magasabb a leptin koncentráció praeclampsziában és HELLP szindrómában. E fehérje génjének (TTTC)_n mikroszatellita polimorfizmusának vizsgálata során a hosszpolimorfizmusnak nem volt kimutatható prognosztikai értéke a praeclampsia, illetve a HELLP szindróma kialakulására [152].

Korábban Kosuge és munkatársai beszámoltak a változó számú TTTC nukleotid szekvencia tandem ismétlődéseiről esszenciális hipertóniás pácienseknél [38]. Vizsgálatukban az allélok és a genotípusok eloszlását különbözőnek találták a nők körében, miközben a férfiaknál nem volt szignifikáns eltérés. Az allélok meghatározására polimeráz láncreakciót (PCR), egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálatot (SSCP, single-strand conformation polymorphism) alkalmaztak. A mi

kutatásunkban a módszerüket fluoreszcens PCR-ra és DNS fragmens analízisre változtattuk, mellyel egyszerűen és biztonságosan tudtuk a rövid tandem ismétlődések számát meghatározni. Így az NPPB gén 5' széli régiójában található (TTTC)_n polimorfizmus meghatározására alkalmas, PCR és DNS fragmens analízist felhasználó módszert vezettünk be. Technikailag egyszerűen és időben gyorsan különíthetők el ilyen módon az allélok [40].

A 235 egészséges és 220 praeclampsziás páciensnél összesen 12 különböző allélt és 35 féle genotípust találtunk a vizsgálat során. A TTTC allél és az egyes genotípusok eloszlásában számos különbséget figyeltünk meg.

Vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy a (TTTC) alléleloszlás szignifikánsan különbözik a praeclampsziások és az egészséges terhesek között. A (TTTC)_n tandem ismétlődések összefüggést mutatnak a praeclampsziával. A 11-es ismétlődésű allél a praeclampsziások között, míg a 10-es és a 12-es ismétlődésű allél frekvenciája az egészséges kontroll csoportban magasabb. A súlyos praeclampsziás betegek 87,7%-a hordozta a 11-es ismétlődésű allélt.

A leggyakoribb genotípusok mindkét vizsgálati csoportban a 11-es ismétlődésű homozigóták és a 11:16 genotípusúak voltak. Az egészségesek között a harmadik leggyakoribb genotípus közel 9%-al a 16 homozigótáké, míg a súlyos praeclampsziások között a 11:12 genotípussal rendelkezőké volt.

A 11-es ismétlődést mutató homozigóták aránya a súlyos praeclampsziások között szignifikánsan magasabb volt a normotóniás várandósokhoz képest. A súlyos praeclampsziás betegek között a 11-es ismétlődést hordozó homozigóták adjusztált esélyhányadosa magasabb volt a 11-es ismétlődést hordozó heterozigótákhoz képest.

Érdekes eltérés, hogy a japán tanulmányban a szerzők mindössze 8 féle allélt és 10 féle genotípust igazoltak, ellentétben a mi vizsgálatunkban leírt 12 féle alléllal és 35 féle genotípussal. Ez az eredmény a magyar populáció jóval diverzifikáltabb, keveredettebb mivoltára utalhat. Kosuge és munkatársai a 11:11-es genotípust találták a leggyakoribbnak (77,5% és 83,3% egészséges és esszenciális hipertóniás nőknél), miközben a magyar populációban ez az arány 25,1% és 32,73% volt a normotóniás, illetve praeclampsziás terheseknél. Az esszenciális hipertóniásoknál a 16-os ismétlődésű allél frekvenciája szignifikánsan alacsonyabb volt. A mi vizsgálatunkban a

praeclampsziás terhesek esetében a 16-os ismétlődésű allél előfordulási gyakorisága megegyezett a normotóniásokéval.

5.2. A B típusú natriureticus peptid plazmaszintek jelentősége praeclampsziában

A BNP plazmaszintje egészséges, normotóniás terhesekben hasonló az egészséges nem terhes nőkéhez. Korábban több vizsgálat is a 20 pg/ml szintet jelentősen meg nem haladó értékeket mért egészséges terheseknél. A terhesség alatt jelentkező magas vérnyomás kapcsán, illetve súlyos praeclampsia miatt kezelt betegeknél a BNP plazmaszintjének emelkedését írták le. Súlyos praeclampsziás terhesek csoportjaiban a 30 pg/ml-t meghaladó medián értékeket írták le [33,34].

A BNP plazmaszintek vizsgálatakor a különböző populációk esetében nem mutatkozik különbség. Hamaoui és munkatársai „afrikai” és „latin-amerikai” származású terheseket vizsgálva nem találtak eltérést a terhesek BNP plazmaszintjeiben. A praeclampsziásoknál származástól függetlenül magasabb BNP szinteket mértek az egészséges várandósokhoz képest [153]. A mi betegeink mind a kaukázusi populációba tartoztak.

Saját beteganyagunknál a fentiekkel összhangban a praeclampsziás betegek BNP plazmaszintje magasabb volt a normotóniásokhoz képest. A hormon plazmakoncentrációjának medián értéke a súlyos praeclampsziások között több mint háromszorosa volt az egészségesekéhez képest (32,4 illetve 9,75 pg/ml).

A natriureticus peptidok, így a BNP fokozott termelésének hátterében az endotél sejtek működésének zavarára, a megváltozott vaszkuláris reaktivitásra, az emelkedett vérnyomásra, illetve a renin-angiotenzin rendszer egyensúlyzavarára adott élettani válasz állhat. A BNP a guanilát-cikláz enzim serkentésével a cGMP-függő proetinkinázokat aktiválja, és így különböző fehérjék foszforilálásán ill. gének transzkripcióján keresztül közvetíti a natriureticus peptidok hatásait. Praeclampsziásoknál a cGMP és a BNP párhuzamos emelkedését több tanulmány megállapította [32,154]. A BNP-guanilát-cikláz-cGMP útvonalat vizsgálva a környező endotélsejtek regenerációját, illetve migrációját kiváltó hatást írták le. Állatkísérletekben intracellulárisan a hatást a cGMP dependens kináz-1 (cGKI)

működése és a következményes vazodilatátor stimulált foszfoprotein (VASP) foszforilációja közvetítette. A BNP így feltehetően nemcsak a szívizom sejtjeiben, hanem stresszhelyzetben számos más szervben is termelődik, parakrin hatást kifejtve [155]. A BNP termelődését emberi magzatburkokban is leírták. Elektív császármetszéssel született magzatok lepényeit mechanikai hatásnak kitéve, a feszülés növekedésével in vitro a BNP termelődésének fokozódását írták le. A terhesség alatti lokálisan emelkedett BNP lehetséges hatását a méhizomzat kontraktilitásának csökkentésével hozták kapcsolatba [156].

Fontos megfigyelés, hogy a (TTTC) tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei között összefüggés mutatkozik. A 11-es ismétlődést mutató allélra homozigóta egészséges várandósok és súlyos praeclampsias betegek esetében magasabb BNP szintet találtunk az egyéb genotípussal rendelkező várandósokhoz viszonyítva. A súlyos praeclampsiasok esetében ez a különbség szignifikánsnak bizonyult. A 11 ismétlődést mutató homozigóta genotípusúak plazma BNP szintjének mediánértéke az összes praeclampsias BNP szintjének mediánértékét kétszeresen meghaladta (64,5, illetve 32,4 pg/ml, míg az egyéb genotípussal rendelkező praeclampsiasok plazma BNP szintjének mediánértéke 20 pg/ml alatti volt (17,8 pg/ml). A 11-es ismétlődést mutató homozigótákat a heterozigótákkal és az egyéb genotípussal rendelkezők BNP plazmaszintjeinek összehasonlítása a praeclampsiasok között szintén szignifikáns eltérést mutatott.

5.3. A korai kezdetű praeclampsia és a B típusú natriureticus peptid kapcsolata

A terhesség alatt észlelt hipertonia etiológiai háttere, illetve klinikai kimenetele nem egységes. A betegek kezelése, gondozása speciális figyelmet igényel. A terhesség alatti magas vérnyomással járó kórképek, így a praeclampsia osztályozása manapság sem egységes. A praeclampsia súlyosságának kritériumai és a korai, illetve késői kezdet elkülönítése ismételten viták tárgya. A korai kezdetű praeclampsia definíciójaként jelenleg a praeclampsia tüneteinek a 34. terhességi hét betöltése előtti együttes megjelenését határozták meg [157]. Súlyos praeclampsias betegeinket mi is e kritérium alapján választottuk szét két alcsoportba.

A magas vérnyomás szabályozásban a natriureticus peptidek a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerrel együtt játszanak jelentős szerepet. Az angiotenzin konvertáz enzim génjének polimorfizmusa, melynél a deléció során kialakult mutáció az enzim fokozott termelődéséhez vezet a praeclampsiasok között előfordulása gyakoribb. A deléciós allélre homozigóta terhesek a korai kezdetű praeclampsiasok között háromszoros gyakorisággal fordulnak elő az egészséges és a késői kezdetű praeclampsiasokhoz képest is [158].

A korai és késői kezdetű súlyos praeclampsias terhesek NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusának alléleloszlását összehasonlítva nem találtunk eltérést. Az egészséges terhesek alléleloszlásához hasonlítva azonban csak a korai kezdetű praeclampsiasok mutatták eltérést, a késői kezdetűek nem. A leggyakoribb a 11-es ismétlődésű allél volt mindkét alcsoportban. Hasonló megfigyelést tettünk a genotípusok eloszlásának vizsgálata kapcsán is. A 11-es ismétlődésű homozigóták a korai kezdetűeknél gyakrabban fordultak elő a késői kezdetű praeclampsiasokhoz képest.

Egybehangzóak az adatok, hogy a praeclampsias terhesek plazma BNP szintjei magasabbak a normotóniás terhesekéhez képest. Korábban a praeclampsia kialakulásának kezdete szerint történő osztályozás alapján a BNP plazmaszintjének meghatározása és összehasonlítása még nem történt meg [159]. Beteganyagunkban a korai kezdetű súlyos praeclampsiasok BNP plazmaszintjének medián értéke 40,55 pg/ml volt. Érdekes módon Resnik munkacsoportja normotóniás, enyhe-középsúlyos és súlyos praeclampsias terheseket vizsgálva a súlyos praeclampsia előrejelzésére a 40 pg/ml határértéket találták optimálisnak, 73%-os szenzitivitás és 85%-os specificitás mellett a BNP plazmaszintjének ROC (receiver operating characteristic curve) görbe vizsgálata alapján. A teszt pozitív prediktív értéke 57%, negatív prediktív értéke 92% volt, 82%-os pontosság mellett [33]. A mi adatainkat tekintve, késői kezdetű praeclampsiasoknál alacsonyabb BNP plazmaszinteket találtunk a korai kezdetűekhez képest. Ezeknek a betegeknek a plazma BNP szintjének mediánértéke 24,10 pg/ml volt, mely az egészséges terhesekhez viszonyítva több mint kétszer magasabb volt.

ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízis segítségével a 24,5 pg/ml plazma BNP koncentráció a praeclampsia kizárásában 85.1% negatív prediktív értékkel bírt. Korai kezdetű praeclampsiasok esetében esetében ez a vágópont 95%-os

szenzitivitást és 97,5% specificitást mutatott, míg késői kezdetű praeclampsziásoknál ugyanilyen cut-off érték mellett a szenzitivitás 70%, a specificitás: 97,5% volt.

Elgondolkoztató eredmény, hogy a korábbi megfigyelésünk, miszerint a (TTTC) tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei között összefüggés mutatkozik, illetve a 11-es ismétlődést mutató allélra homozigóta egyedeknél magasabb BNP plazmaszinteket találunk, mind a korai-, mind a késői kezdetű praeclampsziásokat tartalmazó alcsoportban is igazolódott. A legmagasabb BNP plazmaszinteket a 11-es ismétlődésű homozigóta, korai kezdetű praeclampsziás terhesek alcsoportjánál mértük. Még szembetűnőbb az észrevétel a 11-es ismétlődésű homozigóta, késői kezdetű praeclampsziás terhesek esetében. Ezen betegek BNP plazmaszintjének mediánértéke kétszerese volt a korai kezdetű praeclampsziás, de a 11-es ismétlődést mutató allélra homozigótáktól eltérő genotípusú egyedekéhez viszonyítva (55,8, illetve 26,2 pg/ml). Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy bár a korai kezdetű praeclampsziások BNP értékei magasabbak a késői kezdetűeknél, azonban a 11-es ismétlődésű homozigóta genotípusú egyedeknél talált emelkedett B típusú natriureticus peptid szintek a praeclampszia kialakulásának időpontjától függetlenek.

5.4. A méhen belüli retardáció és a B típusú natriureticus peptid kapcsolata

Számos korábbi vizsgálat eredménye utal a praeclampszia és a tisztázatlan eredetű méhen belüli magzati retardáció közös etiológiai hátterére. [12,15,160]. A trofoblaszt invázió elégtelensége, a nem kellő mértékű lepényi érhalózat kialakulása és a spirális artériák remodellingjének zavara tűnik ezen kórképek közös előidézőjének. Az anyai immunrendszer atípusos, kóros mértékű, kifejezett immunválasza jellemzi ezt a folyamatot.

Az immunválasz létrejötte folyamán az adaptív és a természetes immunitás folyamatos kölcsönhatásban állnak egymással szolubilis faktorok, köztük a komplementfehérjék, limfokinek, illetve ezek sejt felszíni receptorainak közvetítésével. A komplementrendszer harmadik komplement fehérjéje, a C3 kulcsfontosságú szerepet játszik mind a komplement aktiválódás, mind az immunválasz szabályozása során. A C1q fehérje, az első komplementkomponens felismerő alegysége, az IgG vagy IgM-tartalmú immunkomplexek immunglobulin részéhez kapcsolódik, miközben a molekula

másik része az úgynevezett kollagénszerű rész kapcsolódni tud különböző sejtek sejt felszíni kötőfehérjéihez. A mannóz-kötő lektin (MBL) szérumfehérje a patogén mikrobák sejt felszíni szénhidrátjaihoz kötődve aktiválja a komplementrendszer a lektin útvonalon keresztül, ami a mikroorganizmus opsonizálását eredményezi, elősegítve azok eliminációját. Élettani körülmények között, az MBL kötődik a makrofágokhoz, de nem kötődik dendritikus sejtekhez, T- és B-limfocitákhoz, ellentétben a C1q-val, amely valamennyi sejt típusához kapcsolódik. Az MBL számos funkciója között a komplementrendszer aktivációját vizsgálták legbehatóbban. Az MBL génje a 10-es kromoszómán található és az 52-es, 54-es és az 57-es kodon polimorfizmust mutat. Az 54-es kodon variáns allélje csökkent MBL szinttel társul. Ennek a B variánsnak a gyakorisága bizonyos körülmények között előnyt kell, hogy jelentsen, miközben a genetikailag kialakult MBL hiány a kórokozókkal szembeni fogékonyságot hordoz. Az MBL a spirális erek endotélsejteinek és az érfal inváziójában részt vevő trofoblasztok sejt felszínein is kimutathatók. Azt a feltételezést követve, hogy a szemiallogén trofoblasztsejtek elleni immunválasz mértéke enyhébb a csökkent MBL kapacitás miatt, összehasonlítottuk az egészséges, praeclampsias, illetve HELLP szindrómával szövődött terheseket, külön vizsgálva a 10 percentilis alatti méhen belüli magzati retardáció előfordulását. Azt találtuk, hogy a variáns B allél hordozása a praeclampsia és a HELLP szindróma kialakulása mellett a magzati méhen belüli retardáció létrejötte ellen is protektív hatású [161].

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer elemei a beágyazódásban, a placentációban és a magzati fejlődés és növekedés szabályozásában is részt vesznek. A méhen belül sorvadt magzatoknál újszülöttkorban magasabb renin és angiotenzin aktivitást mértek, azonban az anyai angiotenzin konvertáz enzim génjének fentebb említett deléció során kialakult mutáció polimorfizmusának vizsgálatakor a deléciós allélre homozigóta terhesek az egészséges és az 5 percentilis alatti méhen belüli retardáció által érintett magzatok szülei között nem mutattak szignifikáns eltérést [162].

Beteganyagunkban a súlyos praeclampsias terhesek között a 10 percentilis alatti, méhen belüli magzati retardációval születettek aránya közel 30%, míg a korai kezdetű súlyos praeclampsiasoknál ez az arány még magasabb 35,43% volt. Korábban Weiler és munkacsoportja korai kezdetű súlyos praeclampsiasoknál 39%-os gyakoriságot írt le. Vizsgálatukban azt találták, hogy míg a méhen belüli magzati

retardáció által érintett súlyos praeclampsziás terhességekből született újszülötteknél a neonatális morbiditás és mortalitás rosszabb az eutróf magzatokhoz képest, addig az anyai betegség szövődményeiben nincs szignifikáns eltérés [163].

Vizsgálatunkban az alléleloszlásokat tekintve az NPPB gén mikroszatellita polimorfizmusát az eutróf és az 10 percentilis alatti méhen belüli magzati retardáció által érintett praeclampsziás terhesek csoportjait összehasonlítva szignifikáns különbség nem mutatható ki. A 3 percentilis alatti, úgynevezett súlyos magzati retardáció a súlyos praeclampsziás terhességek esetében is fokozottan rossz magzati morbiditási és mortalitási mutatókkal, rossz prognózissal jár együtt. Stabil anyai állapot mellett is, a magzat növekedési zavarával egyidőben fennálló elégtelen lepényi működés, oligohydramnion, vagy kóros flowmetriás paraméterek esetén még a 34. terhességi hét betöltése előtt is a terhesség lezárása, a magzat világrahozatala válhat szükségessé [164]. Ezért az eredményeink kiértékelése során a méhen belüli magzati retardációval szövődött súlyos praeclampsziás betegek egy csoportjának, a 3 percentilis alattiaknak az adatait külön elemeztük.

Az eutróf csoport tagjait a súlyosan retardált 3 percentilis alatti alcsoport tagjaival összehasonlítva az alléleloszlás szignifikáns eltérését mutatott. A genotípuseloszlásokat megfigyelve a terhességi kornak megfelelő nagyságú magzatok szülei a 10 percentilis és a 3 percentilis alatti magzati retardáció által érintett terhesektől is különbözött. Érdekes módon azonban a súlyos magzati retardáció miatt létrehozott alcsoportban a 11-es ismétlődésű allél és a 11-es ismétlődésű homozigóta genotípus szignifikánsan alacsonyabb gyakoriságú volt az eutróf csoport tagjaihoz képest. Az egészséges kontrollcsoport alléleloszlását, illetve genotípuseloszlását összehasonlítva a súlyos praeclampsziás terhesekével, csak az eutróf magzatokat szülők csoportjánál találtunk szignifikáns különbséget. A 10 percentilis- és a 3 percentilis alatti magzati retardációval jellemzett alcsoportok esetében nem találtunk ilyen eltérést.

Az eutróf-, illetve a méhen belüli retardáció által érintett magzatokat szült súlyos praeclampsziás terhesek BNP plazmakoncentrációi szignifikáns eltérést nem mutattak. Mindhárom vizsgált csoportnál 30 pg/ml körüli értékeket találtunk.

Korábban a praeclampsziás és normotóniás terhességből, de 10 percentilis alatti méhen belüli retardációval érintett magzatok megszületéskori, a köldökzsinórvérből levett vérében a BNP plazmaszintekben eltérés nem jelentkezett. A kontroll

normotóniás terhességből született eutróf érett és koraszülött magzatok BNP plazmaszintje mindkét retardáció által érintett csoporthoz képest szignifikánsabb alacsonyabb volt [165].

Eredményeinket összefoglalva a méhen belüli magzati retardáció sem a súlyos praeclampsiasoknál emelkedett B típusú natriureticus peptid plazmaszintekkel, sem az NPPB gén tandem polimorfizmusa kapcsán gyakoribbnak talált 11-es ismétlődésű alléllal, illetve 11-es ismétlődésű homozigóta genotípussal egyértelmű összefüggést nem mutatott. A korreláció hiánya miatt a RAS rendszeren, illetve a natriureticus peptideken kívül más faktorok hatása feltételezhető.

5.5. A B típusú natriureticus peptid és a szérum összfehérje szint kapcsolata

A B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeinek és a praeclampsia klinikai tüneteinek illetve a betegséget jellemző laboreltérések közötti összefüggések vizsgálata kapcsán a plazma BNP szintek pozitív korrelációját figyeltük meg a vizeletfehérjeürítés mennyiségével praeclampsias betegeknél. Ezzel párhuzamosan mind az egészséges, mind a praeclampsias terhesek BNP szintjei inverz korrelációt mutattak a szérum összfehérjeszintekkel [159]. Korai kezdetű praeclampsiasoknál a fehérjeürítés mértéke magasabb volt a késői kezdetűekhez képest.

A szignifikáns proteinuria a praeclampsia egyik diagnosztikai kritériuma. Praeclampsiasban a vese vérátáramlása csökken és a fehérjeürítés mennyisége növekszik részben a glomerulusokat érő károsodás miatt. Az úgynevezett glomeruláris endoteliózis a trombotikus microangiopathia egyik különleges formája, mely glomeruláris ödémával, az endotélsejtek fenestrációjának megszűnésével és a kapillárisok lumeneinek szűkülésével társul [166].

A 30-300 mg/24óra közötti mértékű proteinuria, melyet mikroalbuminuriának is neveznek a progresszív vesebetegség és a kardiovaszkuláris morbiditás független kockázati tényezője magas vérnyomásban és cukorbetegségben szenvedőknél [167,168]. Mikroalbuminuria háttérében a glomeruláris filtrációs barrier albumin számára fokozódó átteresztőképessége áll [169].

Urémias és idiopatiás dilatatív kardiomiopatiás betegeknél a veseműködés zavara vezet a natriureticus peptidek szintjeinek növekedéséhez [170]. A plazma BNP

szintje előrejelzi a krónikus vesebetegség és a mikroalbuminuria megjelenését [171]. Tünetmentes 2-es típusú cukorbetegségeknél a B típusú natriureticus peptid a diasztolés működés zavarával, míg a vizeletben történő fehérjeürítés mértéke a bal kamra tömegével mutat összefüggést [172]. Onodera és munkatársai cukorbetegségeknél a kardiovaszkuláris szövődmények kockázatának meghatározására a plazma BNP szint vizsgálatát sokkal hatékonyabbnak találták az albuminuriához képest [173]. A fentiekől eltérően Leeuw és munkatársai súlyos égési sérülteknél az emelkedett B típusú natriureticus peptid szintű és az egyidejűleg csökkent fehérjeürítést mutató betegeknek jobb túlélést találtak a többi beteghez képest. Ezek az értékek csökkent kapillárispermeabilitást jelezhetnek [174].

Érdekes eredmény vizsgálatunkban, hogy a korai kezdetű praeclampsiasok között a szérum nátrium szintek szignifikánsan alacsonyabbak a kálium szintek pedig magasabbak voltak az egészséges terhesekhez képest. Ezek az eredmények is azt támasztják alá, hogy a BNP renális és extrarenális hatásai együtt befolyásolják a praeclampsia kórleletében jellemző hipovolémia kialakulását.

A fokozott hipoproteinémia csökkent ozmotikus környezet hoz létre az érpályában és a víz az interstíciumba diffundál, mely nemcsak ödémát, hanem hipovolémiát is létrehoz. A növekvő hipovolémia csökkent kamrai preloadhoz, ezáltal csökkent lökettérfogathoz vezet. Ezzel együtt a plazmatérfogat csökkenésének kórleletani folyamata endotélsérüléssel és következményes gyulladási folyamatokkal jár együtt, mely másodlagos mikrocirkulációs zavarokhoz vezet. Az intravaszkuláris térfogat növelése visszaállíthatja a lökettérfogat mértékét a normál tartományban de már csak emelkedett töltő nyomás mellett. A szívregek falát érő megnövekedett töltő nyomás stimulálja a szívizomsejteket a B típusú natriureticus peptid termelésére.

5.6. A B típusú natriureticus peptid diagnosztikai jelentősége és prognosztikai szerepe

A gesztációs hipertónia és különösen a praeclampsia a nők későbbi életszakaszaiban független kockázati tényezőként jelentősen fokozzák a magasvérnyomás betegség és a kardiovaszkuláris események kockázatát. A praeclampsia várható kialakulásának, illetve szövődményeinek korai, akár első

trimeszterbeli előrejelzésére szolgáló biomarkerek meghatározására évtizedek óta folynak kutatások. A harmadik trimeszterben a korai kezdetű praeclampsziásoknál, a szinciciotrofoblasztok által termelt placentáris protein 13 (galectin 13, PP13) emelkedett szintjét írtak le, ellentétben a késői kezdetű praeclampsziásoknál, ahol az érettség elérése után már nem volt különbség az egészséges terhesek szérumkoncentrációihoz képest. A terhesség alatt elvégzett vizsgálatok a normotóniás terheseknél a terhesség során végig magasabb, viszonylag állandó szinteket írtak le. Azoknál a terheseknél, akiknél később praeclampsia alakult ki, az első trimeszteri szignifikánsan alacsonyabb értékek után a második trimeszterben történt a PP13 szint emelkedése [175]. A placentáris eredetű növekedési faktor (PIGF) alacsony szintje a terhesség alatti hipertóniás betegségekben a magas sflt-1 szinttel együtt jellemző. A PIGF teszt pozitivitása ezekben az esetekben a koraszülés független előrejelző markerének bizonyult [176]. A biomarkerek vizsgálata nemcsak a praeclampsziával való összefüggésükre korlátozódik, hanem fontos kutatási terület lehet még a szerepük a terhesség utáni szövődmények, azaz a rövid- és hosszútávú kimenetel előrejelzésében.

A molekula felfedezése óta eltelt 25 évben, a B típusú natriureticus peptid diagnosztikai és terápiás felhasználásának lehetőségeit számos kutató vizsgálta. Az NPPB gén 5' széli, promoter régiójában több single nucleotid és mikroszatellit polimorfizmus is kapcsolatba hozható volt a BNP plazmaszintjének mértékével [106,177]. A lehetséges rizikócsoportok meghatározása mellett ezeknek a polimorfizmusoknak a farmakogenetikai vizsgálatai is megindultak. A gén promoter régiójában az általunk vizsgált tandem mikroszatellita mutáció közelében egy másik komplex mutáció polimorfizmusát, illetve egy családon belül a társuló hereditár malignus hipertónia nyomkövetését végezték Zeng és munkatársai. A komplex mutációt hordozóknál a nátrium nitroprusszid kezelésnek már a korai időszakában csökkent választ figyeltek meg [178].

Kardiovaszkuláris betegségekben a BNP plazmaszintje többféle krónikus állapottal - így a magas vérnyomással és a bal szívfélelétlenséggel - kimutatott összefüggése mellett, az akut hemodinamikai változásoknak is jó jelzője, információt nyújtva a keringési rendszer állapotáról. Praeclampsziás terhességekben a tüneteket okozó vizenyő, a hirtelen testsúlygyarapodás az érrendszer ellenállásának növekedése miatt kialakult bal kamra funkció zavarának a jele. Tüneteket okozó mértékű bal kamra

fukció 20 pg/ml feletti BNP plazmaszinteknél jelentkezik nem terhes felnőtt nők esetében. Borghi és munkatársai praeclampsiás terheseknél a bal kamra tömegének és a végszisztolés, illetve a végdiasztolés térfogatnak szignifikáns megnövekedését írták le, miközben a bal kamrai ejekciós frakció mértéke csökkent. Tanulmányukban praeclampsiásoknál emelkedett BNP plazmaszinteket (37,1 pg/ml) írtak le a normotóniás terhesekhez (21,5 pg/ml) és a nem terhes egészséges nőkhöz képest (15,2 pg/ml) mellett [34].

Eredményeink alátámasztják, hogy a B típusú nátriuretikus peptidszint rizikócsoportba tartozó terheseknél történő mérésével egy olyan, nem invazív vizsgálati módszerre nyílik lehetőség, melynek segítségével korán diagnosztizálható a praeclampsiás terhesek állapotának súlyosbodása, az anyai szív működés romlása. Az elmúlt években elérhetővé vált gyors teszteknek köszönhetően, azáltal, hogy lehetővé válik a betegség mellett történő peptidszint meghatározás, a B típusú nátriuretikus peptid jelentős szerepet kaphat a szülőszobán és az intenzív osztályon kezelt terhességi hipertóniás betegek keringési állapotának és annak változásának, valamint a betegség prognózisának a megítélésében.

6. Következtetések

1. Kifejlesztettem a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus meghatározására alkalmazható fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszert. A módszer alkalmazásával egyszerűen és érzékenyebben lehet kimutatni a rövid tandem ismétlődések számát.

2. Meghatároztam a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmust egészséges és súlyos praeclampsiás terhesek között. A 455 vizsgált terhesnél összesen 12 féle allélt találtunk. Az allélek eloszlása szignifikánsan különbözik a vizsgált csoportokban. A 11-es ismétlődésű allél előfordulása a praeclampsiásoknál a 10-es és a 12-es ismétlődésű allél frekvenciája az egészséges kontroll csoportban gyakoribb. A várandósokat vizsgálva összesen 35 féle genotípust írtunk le. A súlyos praeclampsiás betegekben mindössze 20 féle, a kontrollcsoport várandósainál 32 féle genotípus fordult elő. A 11-es ismétlődést mutató homozigóták aránya a súlyos praeclampsiások között szignifikánsan magasabb volt a normotóniás várandósokhoz képest. Súlyos praeclampsiás betegek között a 11-es ismétlődést hordozó homozigóták adjusztált esélyhányadosa magasabb volt a 11-es ismétlődést hordozó heterozigótákhoz képest.

3. B típusú natriureticus peptid plazmaszintjének meghatározás céljából, egy szendvics fluoreszcens immunoassay módszert vezettünk be a klinikai gyakorlatba praeclampsiásoknál. A betegágy mellett történő peptidszint meghatározás a praeclampsiások szülészeti ellátásban használható eszköz.

4. Meghatároztam a B típusú natriureticus peptid plazma koncentrációját egészséges és súlyos praeclampsiás terhesek között. A BNP plazmaszintje a súlyos praeclampsiás betegekben magasabb volt a normotóniásokhoz képest.

5. Megvizsgáltam a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus és a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjei közötti összefüggést. A 11 ismétlődést mutató allélra homozigóta súlyos praeclampsiás

terhesek esetében szignifikánsan magasabb BNP szinteket találtam az egyéb genotípusú betegekhez képest.

6. Összehasonlítottam a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmus eloszlását korai és késői kezdetű súlyos praeclampsziás terhesek körében. Az allél- és genotípuseloszlásokat összehasonlítva szignifikáns különbség nem volt a két csoport között. Az egészséges terhesekhez képest csak a korai kezdetű súlyos praeclampsziások genotípuseloszlása mutatott szignifikáns eltérést a késői kezdetűeké nem.

7. Meghatároztam a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeit korai és késői kezdetű súlyos praeclampsziás terhesek körében. A korai kezdetűeknél a hormon plazmaszintjének medián értéke magasabb volt a késői kezdetű praeclampsziásokhoz képest. A 11-es ismétlődést mutató homozigóta genotípusúak esetében magasabb BNP koncentrációkat találtunk az egyéb genotípussal rendelkezőkhöz képest mindkét vizsgálati csoportban.

8. Tanulmányoztam a natriureticus peptid prekursor B gén 5' régiójában található TTTC tandem polimorfizmust intrauterin magzati retardációval szövődött súlyos praeclampsziás terhesek körében. Súlyos praeclampsziás terhességekben az eutróf magzatok szüleinek genotípus eloszlása szignifikánsan különbözött mind a 10 percentilis, mind a 3 percentilist elérő méhen belül retardáció miatt érintett magzatok szüleinek genotípus eloszlásához képest. Az eutróf magzatokat világra hozó súlyos praeclampsziás betegek genotípus eloszlása az egészséges várandósokhoz hasonlítva is szignifikáns eltérést mutat. A 10 percentilis és a 3 percentilis magzati retardációt mutató praeclampsziások csoportjait a normotóniás várandósokhoz hasonlítva nem találtunk ilyen különbséget.

9. Megvizsgáltam a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjeit intrauterin magzati retardációval szövődött súlyos praeclampsziás terhesek körében. A 155 eutróf-, illetve a 65 méhen belüli retardáció által érintett magzatot szült súlyos praeclampsziás terhes BNP plazmakoncentrációi között szignifikáns eltérés nem volt.

10. A korai kezdetű praeclampsziás betegek 24 órás vizelet fehérjeürítésének mértéke szignifikánsan magasabb volt a késői kezdetű praeclampsziás betegekhez viszonyítva. A késői kezdetű praeclampsziás betegeknél a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek, illetve a 24 órás fehérjeürítés korrelált pozitív módon a plazma BNP szintekkel. A korai kezdetű praeclampsziás betegeknél a szérum nátrium és az összfehérje szintek szignifikáns inverz összefüggést mutatnak a plazma BNP koncentrációval. A plazma BNP szintje pozitív korrelációt mutatott a korai kezdetű praeclampsziások csoportjában a vér hematokrit, szérum kálium, értékekkel és a 24 órás vizelet fehérjeürítéssel.

11. ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízis segítségével meghatároztam a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjében a 24,5 pg/ml koncentrációt vágópontként, mely a praeclampszia kizárásában 85.1% negatív prediktív értékkel bírt. Korai kezdetű praeclampsziások esetében ez a vágópont 95%-os szenzitivitást és 97,5% specificitást mutatott, míg késői kezdetű praeclampsziásoknál ugyanilyen cut-off érték mellett a szenzitivitás 70%, a specificitás: 97,5% volt.

7. Összefoglalás

Az elmúlt három évtizedben a natriureticus peptidcsalád működésének és élettani szerepének új részletei váltak világossá. E család tagja, a B típusú natriureticus peptid, a szervezet folyadék homeosztázisának szabályozásában az idegrendszerrel és más hormonokkal működik együtt. Számos kardiovaszkuláris kórképben az endotél működésének és a balkamra funkciójának a zavarát, illetve a betegség súlyos szövődményeit jelezve a diagnózis felállítása és a prognózis mellett terápiás eszközként is szerepet játszik. Újabban a praeclampsziában is leírták a BNP plazmaszintjének emelkedését. A natriureticus peptid prekursor B (NPPB) gén 5' széli régiójában a TTTC nukleotid szekvencia tandem ismétlődését igazolták. E mikroszatellita polimorfizmus, tehát az ismétlődések számának és az esszenciális hipertónia kapcsolatát írták le nők körében.

Kísérleteimben a TTTC nukleotid szekvencia tandem ismétlődésének polimorfizmusát, a BNP plazmaszintjét, illetve a genetikai és funkcionális paraméterek összefüggéseit vizsgáltam egészséges és súlyos praeclampsziás terheseknél. Külön elemeztem a súlyos praeclampsziások között a korai- és késői kezdetű betegeket, illetve a méhen belüli magzati retardációval érintett terhességeket. Klinikánkon 235 egészséges és 220 praeclampsziás terhes páciensről gyűjtöttem vért. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízissel határoztam meg a TTTC ismétlődések számát. A BNP plazmaszintjét szendvics fluoreszcens immunoassay módszerrel -Triage BNP teszt- állapítottam meg.

Az allélek és a genotípusok eloszlása szignifikánsan különbözik a vizsgált csoportokban. Az NPPB génen 12 különböző számú allélt találtam. A súlyos praeclampsziás betegekben mindössze 20 féle, a kontrollcsoport várandósainál 32 féle genotípus fordult elő. A 11-es ismétlődést mutató homozigóták aránya a súlyos praeclampsziások között szignifikánsan nagyobb volt a normotóniás várandósokhoz képest. A 11-es ismétlődést mutató homozigóta genotípusúak esetében magasabb BNP koncentrációkat találtam az egyéb genotípussal rendelkezőkhöz képest mindkét vizsgálati csoportban. A korai kezdetű praeclampsziásoknál a BNP plazmaszintjének medián értéke magasabb volt a késői kezdetű praeclampsziásokhoz képest. Az eutróf-,

illetve a méhen belüli retardáció által érintett magzatot szült súlyos praeclampsiás terhesek BNP plazmakoncentrációi között szignifikáns eltérést nem volt.

Praeclampsiás betegeknél a 24 órás fehérjeürítés pozitív módon, míg a szérum nátrium és az összfehérje szintek szignifikáns inverz összefüggést mutatnak a plazma BNP koncentrációval.

A praeclampsiá kizárására a B típusú natriureticus peptid plazmaszintjében a 24,5 pg/ml alatti koncentrációt megfelelő vágópontnak találtuk.

Az általam leírt fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszer alkalmas az NPPB gén (TTTC)_n polimorfizmusának a meghatározására. További vizsgálatok segíthetnek a natriureticus peptidek szerteágazó működésének megértéséhez és klinikai felhasználásához.

8. Summary

In the last three decades many members of the natriuretic peptide family was identified. The function and physiological role of these peptides are pleiotropic. BNP is the member of this family and with the sympathetic nervous system and other hormones they play key roles, like an endogeneous system in the regulation of the body fluid homeostasis and blood pressure. In many cardiovascular diseases the presence of dysfunction in the endothel cells and left ventricle, which can cause severe complications the B-type natriuretic peptide serves not only as marker for diagnosis and prognosis but they have therapeutic importance. In the last years the potential use of the elevated BNP levels for diagnosis of pre-eclampsia was examined. There is a variable tandem repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the natriuretic peptide precursor B gene (NPPB). A previous study showed association of the (TTTC) small tandem repeat (STR) variants of this gene and essential hypertension in females.

In my studies blood samples were collected from healthy pregnant normotensive women (n=235) and patients having severe pre-eclampsia (n=220). DNA was isolated and fluorescent PCR and DNA fragment analysis was performed for the detection of (TTTC) repeats. The concentration of the BNP was measured by fluorescence immunoassay -Triage BNP test- method.

The overall distribution of alleles and genotypes was significantly different between the control and pre-eclamptic groups. We detected 12 different (TTTC) repeats on the NPPB gene in the studied population. The pre-eclamptics were a homogeneous population, with only 10 types of alleles and 20 types of genotypes, contrary to control group with 12 types of alleles and 32 types of genotypes. The 11 homozygote patients have a higher frequency among the severe-pre-eclamptics. I found higher levels of BNP in those who had the genotype 11 homozygotes in both groups, significantly higher in pre-eclamptics. The concentration of the BNP is higher pre-eclamptic pregnancies, it shows association with the (TTTC) genotypes. The concentration of BNP was higher in early onset pre-eclamptic patients than in late onset pre-eclamptics. Intrauterine growth restriction shows no connection with BNP levels in severe pre-eclampsia.

There was a significant inverse correlation between plasma BNP levels of preeclamptic patients and sodium and total protein concentrations and a significant positive correlation was observed between plasma levels of BNP and 24 hour proteinuria.

The cut-off value < 24.5 pg/ml seems to be a powerful discriminative indicator excluding preeclampsia.

I introduced a F-PCR and DNA fragment analysis method for the fast and reliable detection of the STR in the 5'-flanking region of the natriuretic peptide precursor B gene. Further investigations may help to understand the details of molecular biology, biochemistry and clinical relevance of natriuretic peptides.

9. Irodalomjegyzék

1. Kirsch B. (1956) Electron microscopy of the atrium of the heart. *Exp Med Surg*, 14:99-111.
2. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. (1956) Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res*, 4: 85-90.
3. Henry JP, Pearce JW. (1956) The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *J Physiol*, 131: 572-85.
4. de Bold AJ, Raymond JJ, Bencosme SA. (1978) Atrial specific granules of the rat heart: light microscopic staining and histochemical reactions. *J Histochem Cytochem*, 26: 1094-102.
5. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, 28:89-94.
6. Kangawa K, Fukuda A, Kubota I, Hayasi Y, Minamitake Y, Matsuo H. (1984) Human atrial natriuretic polypeptides (hANP): purification, structure synthesis and biological activity. *J Hypertens, Suppl.* 2:231-233.
7. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 332:78-81.
8. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H.: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. (1990) *Biochem Biophys Res Commun*, 168:863-870.
9. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. (1992) A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem*, 267:13928-32.
10. Akashi YJ, Springer J, Lainscak M, Anker SD. (2007) Atrial natriuretic peptide and related peptides. *Clin Chem Lab Med*, 45:1259-1267.
11. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet*, 365: 785-99.
12. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, Farnot U, Bergsjø P, Bakketeig L, Lumbiganon P, Campodónico L, Al-Mazrou Y, Lindheimer M, Kramer M; World Health Organization Antenatal Care Trial Research Group. (2006) Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine

- growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol*, 194: 921-931.
13. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. (2008) Secular trend in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States 1987-2004. *Am J Hypertens*, 21: 521-6.
 14. Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308: 1592-4.
 15. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. (2010) Pre-eclampsia. *Lancet*, 376: 631-44.
 16. Vatten LJ, Skjaerven R. (2004) Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG*, 111: 298-302.
 17. Einarsson JJ, Sangi-Haghpeykar H, Gardner NO. (2003) Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 188: 1241-3.
 18. Saftlas AF, Beydoun H, Triche E. (2005) Immunogenetic determinants of preeclampsia and related pregnancy disorders: a systematic review. *Obstet Gynecol*, 106: 162-72.
 19. Pijnenborg R, Brosens I. (2010) Deep trophoblast invasion and spiral artery remodelling. *Placental bed disorders: basic science and its translation to obstetrics*. Cambridge University Press Cambridge, 97-107.
 20. Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. (1999) Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol*, 181: 718-24.
 21. Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P. (2005) In preeclampsia the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. *Hypertension*, 45: 258-63.
 22. Khedun SM, Naicker T, Moodley J. (2002) Endothelin-1 activity in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*, 22: 590-3.
 23. Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R. (1992) Potential role of endothelin-1 normal and hypertensive pregnancies. *J Hum Hypertens*, 6: 61-4.
 24. Bussen S, Sütterlin M, Steck T. (1999) Plasma endothelin and big endothelin levels in women with severe preeclampsia or HELLP-syndrome. *Arch Gynecol Obstet*, 262: 113-119.

25. Slowinski T, Neumayer HH, Stolze T, Gossing G, Halle H, Hocher B. (2002) Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin Sci, Suppl* 48: 446S-449S.
26. Brown MA, Wang J, Whitworth JA. (1997) The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens*, 19: 713-26.
27. Irani RA, Xia Y. (2008) The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, 9: 763-71.
28. Mitani R, Maeda K, Fukui R, Endo S, Saijo Y, Shinohara K, Kamada M, Irahara M, Yamano S, Nakaya Y, Aono T. (2002) Production of human mast cell chymase in human myometrium and placenta increases of normal pregnancy and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 101: 155–160.
29. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF, Alexander JS, Granger DN. (2007) Increased chymotrypsin-like protease (chymase) expression and activity in placentas from women with preeclampsia. *Placenta*, 28: 263–269.
30. Itoh H, Sagawa N, Mori T, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. (1993) Plasma brain natriuretic peptide level in pregnant women with pregnancy-induced hypertension. *Obstet Gynecol*, 82: 71-77.
31. Furuhashi N, Kimura H, Nagae H, Yajima A, Kimura C, Saito T. (1994) Brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide levels in normal pregnancy and preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, 38: 73-77.
32. Okuno S, Hamada H, Yasuoka M, Watanabe H, Fujiki Y, Yamada N, Sohda S, Kubo T. (1999) Brain natriuretic peptide (BNP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 25: 407-410.
33. Resnik LJ, Hong C, Resnik R, Kazanegra R, Beede J, Bhalla V, Maisel A. (2005) Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*, 193: 450-4.
34. Borghi C, Esposti DD, Immordino V, Cassani A, Boschi S, Bovicelli L, Ambrosioni E. (2000) Relationship of systemic hemodynamics, left ventricular structure and function, and plasma natriuretic peptide concentrations during pregnancy complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 183: 140-7.

35. Tihtonen MK, Kööbi Tiit, Vulteenaho O, Huhtala HS, Uotila JT. (2007) Natriuretic peptides and hemodynamics in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 196: 328.e1-328.e7.
36. Stepan H, Faber R, Walther D, Walther T. (2004) C-type natriuretic peptide levels in women with gestational hypertension and preeclampsia. *Clin Sci*, 106: 535-40.
37. Prickett TC, Kaaja RJ, Nicholls MG, Espiner EA, Richards AM, Yandle TG. (2004) N-terminal pro-C-type natriuretic peptide, but not C-type natriuretic peptide, is greatly elevated in the fetal circulation. *Clin Sci*, 106: 535-40.
38. Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Matsumoto K. (2007) A novel variable tandem repeat of the natriuretic peptide precursor B gene's 5'-flanking region is associated with essential hypertension among Japanese females. *Int J Med Sci*, 4: 146-52.
39. Szabó G, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J Jr, Nagy B. (2011) Natriuretic peptide precursor B gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta*, 412: 1371-5.
40. Szabó G, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J Jr, Nagy B. (2012) A natriuretic peptide precursor B-gén (TTTC)n polimorfizmusa súlyos praeeclampsiaával szövődött terhességben. *Magyar Nőorv L*, 75: 22-7.
41. Arden KC, Viars CS, Weiss S, Argentin S, Nemer M. (1995) Localization of the human B-type natriuretic peptide precursor (NPPB) gene to chromosome 1p36. *Genomics*, 26:385-389.
42. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8525-9.
43. Wu F, Yan W, Pan J, Morser J, Wu Q. (2002) Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 277: 16900-5.
44. Akimoto K, Miyata A, Kangawa K, Koga Y, Hayakawa K, Matsuo H. (1988) Molecular forms of atrial natriuretic peptide in the atrium of patients with cardiovascular disease. *J. Clin Endocrinol Metab*, 67:93-7.
45. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssman WG. (1988) Isolation and structural analysis of 'urodilatin' a new peptide of the

- cardiolatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr*, 66:752-9.
46. Minamino N, Horio H, Nishikimi T. (2006) Natriuretic peptides in the cardiovascular system. In: *The handbook of biologically active peptides*. Ed. Kastin AJ 1st ed. New York/London: Academic Press, p. 1217-25.
 47. Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. (1990) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a precursor for rat C-type natriuretic peptide (CNP). *FEBS Lett*, 276: 209-13.
 48. Nishikimi T, Minamino N, Ikeda M, Takeda Y, Tadokor K, Shibasaki I, Fukuda H, Horiuchi Y, Oikawa S, Ieiri T, Matsubara M, Ishimitsu T. (2010) Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide in heart failure-different proBNP-108 to BNP-32 ratios in atrial and ventricular overload. *Heart*, 96: 432-9.
 49. Takei Y. (2000) Structural and functional evolution of the natriuretic peptide system in vertebrates. *Int Rev Cytol*, 194: 1-66.
 50. Houweling AC, van Borren MM, Moorman AF, Christoffels WM. (2005) Expressions and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene NPPA during development and disease. *Cardiovasc Res*, 67: 583-93.
 51. Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N, Nakao K. (2001) The neuron-restrictive silencer element-neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin-1 inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol Cell Biol*, 21: 2085-97.
 52. Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K. (2003) NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *Embo J*, 22: 6310-21.
 53. Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloschitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV,

- Katrukha AG. (2009) Processing of pro-Brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage. *Clin Chem*, 55: 493-8.
54. Kuwahara K, Nakao K. (2010) Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J*, 57: 555-65.
55. Schouten BJ, Prickett TC, Hooper AA, Hooper GJ, Yandle TG, Richards AM, Espiner EA. (2011) Central and peripheral forms of C-type natriuretic peptide CNP (CNP): Evidence for differential regulation in plasma and cerebrospinal fluid. *Peptides*, 4: 797-804.
56. Mendonca MC, Koles N, Doi SQ, Sellitti DF. (2010) Transforming growth factor- β_1 regulation of C-type natriuretic peptide expression in human vascular smooth muscle cells: dependence on TSC22D1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 6: 2018-27.
57. Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV. (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biol*, 12: 2581-90.
58. Schulz S. (2005) C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides*, 26: 1024-34.
59. Vieira MA, Gao M, Nikonova LN, Maack T. (2001) Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem*, 276: 36438-45.
60. Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. (1992) Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem*, 267: 11987-94.
61. Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR. (2005) Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol Pharmacol*, 67: 174-83.
62. Silberbach M, Roberts CT Jr. (2001) Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal*, 13: 221-31.
63. Kuhn M. (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. *Basic Res Cardiol*, 99: 76-82.

64. Maack T. (1992) Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol*, 54: 11-27.
65. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. (1987) Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*, 238: 675-8.
66. Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG, Maack T. (1996) Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J Biol Chem*, 271: 9863-9.
67. Sonnenberg JL, Sakane Y, Jeng AY, Koehn JA, Ansell JA, Wennogle LP, Ghai RD. (1988) Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides*, 9: 173-80.
68. Okolicany J, McEnroe GA, Koh GY, Lewicki JA, Maack T. (1992) Clearance receptor and neutral endopeptidase-mediated metabolism of atrial natriuretic factor. *Am J Physiol*, 263: F546-53.
69. Boerrigter G, Burnett JC Jr. (2004) Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*, 13: 643-52.
70. Lew RA, Baertschi AJ. (1989) Endothelial cells stimulate ANF secretion from atrial myocytes in co-culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 163: 701-9.
71. Fukuda Y, Hirata Y, Taketani S, Kojima T, Oikawa S, Nakazato H, Kobayashi Y. (1989) Endothelin stimulates accumulations of cellular atrial natriuretic peptide and its messenger RNA in rat cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 1431-6.
72. Bruneau BG, Piazza LA, de Bold AJ. (1997) BNP gene expression is specifically modulated by stretch and ET-1 in a new model of isolated rat atria. *Am J Physiol*, 273: H2678-86.
73. Skvorak JP, Nazian SJ, Dietz JR. (1995) Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. *Am J Physiol*, 269: R1093-8.
74. Magga J, Vuolteenaho O, Marttila M, Ruskoaho H. (1997) Endothelin-1 is involved in stretch-induced early activation of B-type natriuretic peptide gene expression in atrial but not in ventricular myocytes: acute effects of mixed ET(A)/ET(B) and AT1 receptor antagonists in vivo and in vitro. *Circulation*, 96: 3053-62.

75. Sanchez-Ferrer CF, Burnett JC Jr, Lorenz RR, Vanhoutte PM. (1990) Possible modulation of release of atrial natriuretic factor by endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 259: H982-6.
76. Leskinen H, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Ruskoaho H. (1995) Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology*. 1995; 136: 1241-9.
77. Skvorak JP, Dietz JR. (1997) Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretchinduced ANP secretion. *Am J Physiol*, 273: R301-6.
78. Katsube N, Schwartz D, Needleman P. (1985) Release of atriopeptin in the rat by vasoconstrictors or water immersion correlates with changes in right atrial pressure. *Biochem Biophys Res Commun*, 133: 937-44.
79. Lachance D, Garcia R. (1988) Atrial natriuretic factor release by angiotensin II in the conscious rat. *Hypertension*, 11: 502-8.
80. Dietz JR. (1988) The effect of angiotensin II and ADH on the secretion of atrial natriuretic factor. *Proc Soc Exp Biol Med*, 187: 366-9.
81. Focaccio A, Volpe M, Ambrosio G, Lembo G, Pannain S, Rubattu S, Enea I, Pignatola S, Chiariello M. (1993) Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. *Circulation*, 87: 192-8.
82. Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S, Führtbauer EM, Dohrmann U, Beyersdorf F, Radicke D, Holubarsch CJ. (2000) Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation*, 102: 3074-9.
83. Matsubara H, Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Takagi Y, Umeda Y, Yamane Y, Inada M. (1988) Role of calcium and protein kinase C in ANP secretion by cultured rat cardiocytes. *Am J Physiol*, 255: H405-9.
84. Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, Glembotski CC. (1994) Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 269: 26227-33.

85. Shields PP, Glembotski CC. (1989) Regulation of atrial natriuretic factor-(99-126) secretion from neonatal rat primary atrial cultures by activators of protein kinases A and C. *J Biol Chem*, 264: 9322-8.
86. Tóth M, Ruskoaho H, Lang RE. (1986) Regulation of atrial natriuretic peptide secretion. *J Hypertens, Suppl 4*: S538-41.
87. Agnoletti G, Rodella A, Cornacchiari A, Panzali AF, Harris P, Ferrari R. (1992) Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. *Am J Physiol*, 262: H285-92
88. Christensen G, Aksnes G, Ilebekk A, Kiil F. (1991) Release of atrial natriuretic factor during selective cardiac alpha- and beta-adrenergic stimulation, intracoronary Ca²⁺ infusion, and aortic constriction in pigs. *Circ Res*, 68: 638-44.
89. Nakaoka H, Kitahara Y, Amano M, Imataka K, Fujii J, Ishibashi M, Yamaji T. (1987) Effect of beta-adrenergic receptor blockade on atrial natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension*, 10: 221-5.
90. Luchner A, Burnett JC Jr, Jougasaki M, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. (1998) Augmentation of the cardiac natriuretic peptides by beta-receptor antagonism: evidence from a population-based study. *J Am Coll Cardiol*, 32: 1839-44.
91. Yoshimoto T, Naruse M, Tanabe A, Naruse K, Seki T, Imaki T, Muraki T, Matsuda Y, Demura H. (1998) Potentiation of natriuretic peptide action by the betaadrenergic blocker carvedilol in hypertensive rats: a new antihypertensive mechanism. *Endocrinology*, 139: 81-8.
92. Yoshizawa A, Yoshikawa T, Nakamura I, Satoh T, Moritani K, Suzuki M, Baba A, Iwanaga S, Mitamura H, Ogawa S. (2004) Brain natriuretic peptide response is heterogeneous during beta-blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail*, 10: 310-5.
93. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. (2003) B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet*, 362: 316-22.
94. Gardner DG, Gertz BJ, Hane S. (1987) Thyroid hormone increases rat atrial natriuretic peptide messenger ribonucleic acid accumulation in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*, 1: 260-5.

95. Ladenson PW, Bloch KD, Seidman JG. (1988) Modulation of atrial natriuretic factor by thyroid hormone: messenger ribonucleic acid and peptide levels in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rat atria and ventricles. *Endocrinology*, 123: 652-7.
96. Gardner DG, Gertz BJ, Deschepper CF, Kim DY. (1988) Gene for the rat atrial natriuretic peptide is regulated by glucocorticoids in vitro. *J Clin Invest*, 2: 275-81.
97. Gardner DG, Hane S, Trachewsky D, Schenk D, Baxter JD. (1986) Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 139: 1047-54.
98. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. (2006) Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H17–29.
99. Brunner-La Rocca HP, Kiowski WR, Süttsch G. (2001) Therapeutic benefits of increasing natriuretic peptides levels. *Cardiovasc Res*, 51: 510-20.
100. Chartier L, Schiffrin E, Thibault G. (1984) Effect of atrial natriuretic factor (ANF)-related peptides on aldosterone secretion by adrenal glomerulosa cells: critical role of the intramolecular disulphide bond. *Biochem Biophys Res Commun*, 122: 171-4.
101. Kudo T, Baird A. (1984) Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor. *Nature*, 312: 756-7.
102. Bähr V, Sander-Bähr C, Ardevol R. (1993) Effects of atrial natriuretic factor on the renin-aldosterone system: in vivo and in vitro studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45: 173-8.
103. Fonyó A. (1997) *Az orvosi élettan tankönyve* Medicina Kiadó, Budapest, 577.
104. Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. (1997) Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev*, 77: 465-515.
105. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RL, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. (2004) B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor- β in primary human cardiac fibroblasts. *Circ Res*, 94: 453-61.

106. Newton-Cheh C, Larson MG, Vasan RS, Levy D, Bloch KD, Surti A, Guiducci C, Kathiresan S, Benjamin EJ, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Blankenberg S, Kee F, Nilsson P, Yin X, Peltonen L, Vartiainen E, Salomaa V, Hirschhorn JN, Melander O, Wang TJ. (2009) Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genetic*, 41: 348-53.
107. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K. (2009) Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes*, 58: 2880-92.
108. Schmidt H, Stonkute A, Jüttner R, Koesling D, Friebe A, Rathjen FG. (2009) C-type natriuretic peptide (CNP) is a bifurcation factor for sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 16847-52.
109. Forssmann W, Meyer M, Forssmann K. (2001) The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovasc Res*, 51: 450-62.
110. Koch A, Singer H. (2003) Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart*, 89: 875-8.
111. Mir TS, Laux R, Hellwege HH, Liedke B, Heinze C, von Buelow H, Lær S, Weil J. (2003) Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked and rapid increase after birth. *Pediatrics*, 112: 896-9.
112. Mir TS, Flato M, Falkenberg J, Haddad M, Budden R, Weil J, Albers S, Laer S. (2006) Plasma concentrations of N-terminal brain natriuretic peptide in healthy children, adolescents, and young adults: effect of age and gender. *Pediatr Cardiol*, 27: 73-7.
113. Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M, Imura H. (1990) Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 323: 757-8.
114. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasan RS. (2004) Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med*, 350: 655-63.

115. Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, Wagoner LE, Givertz MM, Liang CS, Neibaur M, Haught WH, LeJemtel TH. (2000) Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med*, 343: 246-53.
116. Packer M, Califf RM, Konstam MA. (2002) The OVERTURE Study Group. Comparison of omapatrilat and enalapril patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*, 106: 920-6.
117. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Matsui T, Kinoshita M. (2001) Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 37: 1228-33.
118. Bayliss J, Norell M, Canepa-Anson R, Sutton G, Poole-Wilson P. (1987) Unrelated heart failure: clinical and neuroendocrine effects of introducing diuretics. *Br Heart J*, 57: 12-22.
119. Northridge DB, Newby DE, Rooney E, Norrie J, Dargie HJ. (1999) Comparison of the short-term effects of candoxatril an orally active neutral endopeptidase inhibitor, and frusemide in the treatment of patients with chronic heart failure. *Am Heart J*, 138: 1149-57.
120. Cataliotti A, Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Schirger JA, Tsuruda T, Heublein DM, Chen HH, Malatino LS, Burnett JC Jr. (2004) Brain natriuretic peptide enhances renal actions of furosemide and supresses furosemide-induced aldosterone activation in experimental heart failure. *Circulation*, 109: 1680-5.
121. Wing LM, Chalmers JP, West MJ, Bune AJ, Russell AE, Elliott JM, Morris MJ. (1987) Treatment of hypertension with enalapril and hydrochlorothiazide or enalapril and atenolol: contrasts in hypotensive interactions. *J Hypertens*, Suppl. 5: 603-6.
122. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, Mukoyama M, Nakao K. (1993) Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 88: 82-91.

123. Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler J. (2001) Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anaesthetized pigs. *Cardiovasc Res*, 51: 592-600.
124. Okawa H, Horimoto H, Mieno S, Nomura Y, Yoshida M, Shinjiro S. (2003) Preischemic infusion of alpha-human atrial natriuretic peptide elicits myoprotective effects against ischemia reperfusion in isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem*, 248: 171-7.
125. Nishikimi T, Yoshihara F, Morimoto A, Ishikawa K, Ishimitsu T, Saito Y, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H. (1996) Relationship between left ventricular geometry and natriuretic peptide levels in essential hypertension. *Hypertension*, 28: 22-30.
126. Kováts T, Tomcsányi J. (2009) Bradycardia and B-type natriuretic peptide. *Int J Cardiol*, 135: 238-9.
127. Stimpel M, Wambach G. (1988) Plasma levels of atrial natriuretic peptide (ANP) in patients with paroxysmal supraventricular tachycardia and concomitant polyuria (urina spastica). *Z Cardiol*, 77: 124-9.
128. Li C, Thian R, Zhu L, Li D, Feng Q, Gao X. (1995) Changes of plasma endothelin and atrial natriuretic peptide during the onset and after termination of paroxysmal supraventricular tachycardia. *Chin Med Sci J*, 10: 161-4.
129. Brueckmann M, Bertsch T, Hoffmann U, Lang S, Kaden JJ, Wolpert C, Huhle G, Borggreffe M, Haase KK. (2004) N-terminal pro-atrial natriuretic peptide as a biochemical marker of long-term interventional success after radiofrequency catheter ablation of paroxysmal supraventricular tachyarrhythmias. *Clin. Chem Lab Med*, 42: 896-902.
130. Rossi A, Enriquez-Sarano M, Burnett JC Jr, Lerman A, Abel MD, Seward JB. (2000) Natriuretic peptide levels in atrial fibrillation: a prospective hormonal and Doppler-echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol*, 35: 1256-62.
131. Lengyel M. (2007) B-típusú natriuretikus hormon a diagnosztikus és prognosztikus cardiovascularis biomarker. *Orv Hetil*, 148: 217-21.
132. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Kyotani S, Satoh T, Nakanishi N, Matsuo H, Kangawa K. (1998) Secretion patterns of brain natriuretic peptide and atrial

- natriuretic peptide in patients with or without pulmonary hypertension complicating atrial septal defect. *Am Heart J*, 136: 297-301.
133. Vesely DL. (2003) Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: 167-77.
134. Harrigan MR. (2001) Cerebral salt wasting syndrome. *Crit Care Clin*, 17: 125-38.
135. Laczi F. (2008) A hyponatraemiás állapotok etiológiája, diagnosztikája és terápiája. *Orv Hetil*, 149: 1347-54.
136. Trevisani F, Colantoni A, Sica G, Gasbarrini A, D'Intino PE, De Notariis S, De Jaso R, Barbieri A, Morselli A, Gasbarrini G. (1995) High plasma levels of atrial natriuretic peptide in preascitic cirrhosis: indirect evidence of reduced natriuretic effectiveness of the peptide. *Hepatology*, 22: 132-7.
137. Sato K, Sekiguchi S, Kawagishi N, Akamatsu Y, Enomoto Y, Takeda I, Fukushima D, Fujimori K, Sato A, Satomi S. (2006) Continuous low-dose human atrial natriuretic peptide promotes diuresis in oliguric patients after living donor liver transplantation. *Transplant Proc*, 38: 3591-3.
138. ACOG practice bulletin. (2002) Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, *Obstet Gynecol*, 99: 159-67.
139. Joubert K. (2000) Magyar születés kori testtömeg- és testhossz-standardok az 1990-96. évi országos élveszületési adatok alapján. *Magyar Nőorv L*, 63: 155-63.
140. Nagy B, Hupuczi P, Papp Z. (2007) High frequency of methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype in Hungarian HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR. *J Hum Hypertens*, 21: 154-8.
141. Nagy B, Ban Z, Papp Z. (2005) The DNA isolation method has effect on allele drop-out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Clin Chim Acta*, 360: 128-32.
142. BNP test for rapid quantification of B-type natriuretic peptide [package insert]. San Diego, CA: Biosite Diagnostics; 2000.
143. Cheng V, Kazanegra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, Clopton P, Maisel A. (2001) A rapid bedside test for B-type peptide predicts

- treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol*, 37: 386-91.
144. Kazanegra R, Cheng V, Garcia A, Krishnaswamy P, Gardetto N, Clopton P, Maisel A. (2001) A rapid test for B-type natriuretic peptide correlates with falling wedge pressures in patients treated for decompensated heart failure: a pilot study. *J Card Fail*, 7: 21-9.
 145. Clerico A, Zaninotto M, Prontera C, Giovannini S, Ndreu R, Franzini M, Zucchelli GC, Plebani M. (2012) State of the art of BNP and NT-proBNP immunoassays: The CardioOrmoCheck study. *Clin Chim Acta*, 414: 112-9.
 146. Sibai BM. (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 102: 181-92.
 147. Jeyabalan A, Powers RW, Durica AR, Harger GF, Roberts JM, Ness RB. (2008) Cigarette smoke exposure and angiogenic factors in pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens*, 21: 943-7.
 148. Szabó G, Rigó J.Jr, Nagy B. (2011) A natriureticus peptidsalád élettani jellemzői és klinikai szerepe. *Orv Hetil*, 152: 1025-34.
 149. Szabó G. (2012) Biology of the B-Type Natriuretic Peptide: Structure, Synthesis and Processing. *Biochem Anal Biochem*, 1:e129. doi.10.4172/2161-1009.1000e129
 150. Nakamura Y, Koyama K, Matsushima M. (1998) VNTR (variable tandem repeat) sequences as transcriptional, translational regulators. *Hum Genet*, 43: 149-52.
 151. Ohadi M, Mohammadparast S, Darvish H. (2012) Evolutionary trend of exceptionally long human core promoter short tandem repeats. *Gene*, 507: 61-7.
 152. Nagy B, Varkonyi T, Molvarec A, Lazar L, Hupuczi P, Than NG, Rigo J Jr. (2009) Leptin gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Clin Chem Lab Med*, 47: 1033-7.
 153. Hamaoui A, Mercado R. (2012) Evaluation of B-type natriuretic peptide levels in singleton hypertensive minority women. *J Reprod Med*, 57: 39-42.
 154. Sandrin Sandrim VC, Palei AC, Sertório JT, Amaral LM, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. (2011) Alterations in cyclic GMP levels in preeclampsia may reflect

- increased B-type natriuretic peptide levels and not impaired nitric oxide activity. *Clin Biochem*, 44: 1012-4.
155. Kuhn M. (2012) Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *Br J Pharmacol*, 166: 522-31.
 156. Carvajal JA, Delpiano AM, Cuello MA, Poblete JA. (2012) Mechanical stretch increases Brain natriuretic peptide production and secretion in the human fetal membranes. *Reprod Sci*, Epub ahead of print.
 157. Tranquilli AL, Brown MA, Zeeman GG, Dekker G, Sibai BM. (2013) The definition of severe and early-onset preeclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Preg Hy*, 3: 44-7.
 158. Uma R, Forsyth SJ, Struthers AD, Frasers CG, Godfrey V, Murphy DJ. (2010) Polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in early-onset and late-onset pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 23: 874-9.
 159. Szabó G, Molvarec A, Nagy B, Rigó J. (2013) Increased B-type natriuretic peptide levels in early-onset versus late-onset preeclampsia. *Clin Chem Lab Med*, doi: 10.1515/cclm-2013-0307
 160. Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. (2011) Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 107.
 161. Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigó B, Szabó G, Papp Z, Linhares IM, Witkin SS. (2007) Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome and pre-eclampsia associated intrauterine growth restriction. *Mol Hum Reprod*, 13: 281-5.
 162. Uma R, Forsyth JS, Struthers AD, Frasers CG, Godfrey V, Murphy DJ. (2010) Polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in relation to intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 89: 1197-201.
 163. Weiler J, Tong S, Palmer KR. (2011) Is fetal growth restriction associated with a more severe maternal phenotype in the setting of early onset pre-eclampsia? A retrospective study. *PLoS One*, 6: e26937.

164. Publications Committee, Society for Maternal-Fetal Medicine, Sibai BM. (2011) Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 205: 191-8.
165. Crispi F, Comas M, Hernández-Andrade E, Eixarch E, Gómez O, Figueras F, Gratacós E. (2009) Does pre-eclampsia influence fetal cardiovascular function in early-onset intrauterine growth restriction? *Ultrasound Obstet Gynecol*, 34: 660-5.
166. Gaber LW, Spargo BH, Lindheimer MD. (1994) Renal pathology in pre-eclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 8:443-68.
167. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators. (2001) Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*, 286:421–6.
168. Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Okin PM, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P. (2003) Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Ann Intern Med*, 139:901–6.
169. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*, 88:451–87.
170. Codognotto M, Piccoli A, Zaninotto M, Mion M, Plebani M, Vertolli U, Tona F, Ruzza L, Barchita A, Boffa GM. (2007) Renal dysfunction is a confounder for plasma natriuretic peptides in detecting heart dysfunction in uremic and idiopathic dilated cardiomyopathies. *Clin Chem*, 53:2097-104.
171. Fox CS, Gona P, Larson MG, Selhub J, Tofler G, Hwang SJ, Meigs JB, Levy D, Wang TJ, Jacques PF, Benjamin EJ, Vasan RS. (2010) A multi-marker approach to predict incident CKD and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*, 21:2143-9.
172. Magnusson M, Jovinge S, Shahgaldi K, Israelsson B, Groop L, Melander O. (2010) Brain natriuretic peptide is related to diastolic dysfunction whereas urinary albumin excretion rate is related to left ventricular mass in asymptomatic type 2 diabetes patients. *Cardiovasc Diabetol*, 9:2.

173. Onodera M, Nakamura M, Tanaka F, Takahashi T, Makita S, Ishisone T, Ishibashi Y, Itai K, Onoda T, Ohsawa M, Tanno K, Sakata K, Omama S, Ogasawara K, Ogawa A, Kuribayashi T, Sakamaki K, Okayama A. (2012) Plasma B-type natriuretic peptide is useful for cardiovascular risk assessment in community-based diabetes subjects: comparison with albuminuria. *Int Heart J*, 53:176-81.
174. de Leeuw K, Nieuwenhuis MK, Niemeijer AS, Eshuis H, Beerthuisen GI, Janssen WM. (2011) Increased B-type natriuretic peptide and decreased proteinuria might reflect decreased capillary leakage and is associated with a better outcome in patients with severe burns. *Crit Care*, 15:R161.
175. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabó G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J.Jr, Romero R, Papp Z. (2008) Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch*, 453: 387-400.
176. Gullai N, Stenczer B, Molvarec A, Fügedi G, Veresh Z, Nagy B, Rigó J Jr. (2013) Evaluation of a rapid and simple placental growth factor test in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*, doi: 10.1038/hr.2012.206. Epub ahead of print.
177. Lanfear DE, Stolker JM, Marsh S, Rich MW, McLeod HL. (2011) Genetic variation in the B-type natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes. *J Mol Cell Cardiol*, 50: 695-701.
178. Zeng K, Wu XD, Liu QC, Gao F, Lin CZ. (2012) Impact of a novel mutation in the 5'-flanking region of natriuretic peptide precursor B gene on the antihypertensive effects of sodium nitroprusside in patients with hypertension. *J Hum Hypertens*, doi: 10.1038/jhh.2012.25. Epub ahead of print.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. **Szabó G**, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J.Jr, Nagy B. (2011) Natriuretic peptide precursor B gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia. Clin Chim Acta, 412: 1371-5. **(IF: 2,535)**
2. **Szabó G**, Rigó J.Jr, Nagy B.(2011) A natriureticus peptidcsalád élettani jellemzői és klinikai szerepe. Orv Hetil, 152: 1025-34.
3. **Szabó G**, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J Jr, Nagy B.(2012) A natriureticus peptid prekursor B-gén (TTTC)n polimorfizmusa súlyos praeclampsiaival szövődött terhességben. Magyar Nőorvosok Lapja, 75: 22-7.
4. **Szabó G**. (2012) Biology of the B-Type Natriuretic Peptide: Structure, Synthesis and Processing. Biochem Anal Biochem, 1:e129. doi.10.4172/2161-1009.1000e129
5. **Szabó G**, Molvarec A, Nagy B, Rigó J. (2013) Increased B-type natriuretic peptide levels in early-onset versus late-onset preeclampsia. Clin Chem Lab Med, doi: 10.1515/cclm-2013-0307 **(IF: 3,009)**

10.2. Egyéb közlemények jegyzéke

1. Hupuczi P, Rigó B, Sziller I, **Szabó G**, Szigeti Z, Papp Z. (2006) Follow-up analysis of pregnancies complicated by HELLP syndrome. *Fetal Diagn Ther*, 21: 519-22. **(IF: 0,761)**
2. Hupuczi P, Sziller I, Hrubby E, Rigó B, **Szabó G**, Papp Z. (2006) Anyai szövődmények előfordulása 107 HELLP-szindrómával szövődött terhesség kapcsán. *Orv Hetil*, 147: 1377-85.
3. Hupuczi P, Nagy B, **Szabó G**, Rigó B, Sziller I, Papp Z. (2006) A Leiden mutáció gyakorisága HELLP szindrómával szövődött terhességekben. *Magyar Nőorv L*, 69: 289-95.
4. Nagy B, Hupuczi P, **Szabó G**, Rigó B, Papp Z. (2007) A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T mutáció kimutatása kvantitatív valós idejű PCR módszer alkalmazásával HELLP szindrómás betegek mintáiban *Magyar Nőorv L*, 70: 171-5.
6. Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigó B, **Szabó G**, Papp Z, Linhares IM, Witkin SS. (2007) Mannose-Binding Lectin codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome an pre-eclampsia associated intrauterin growth restriction *Mol Hum Reprod*, 13: 281-5. **(IF: 2,871)**
7. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, **Szabó G**, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J.Jr, Romero R, Papp Z. (2008) Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome *Virchows Arch*, 453: 387-400. **(IF: 2,082)**
8. **Szabó G**, Nagy B. (2012) Letter to the editor. *J Cardiol*, 59: 97. **(IF: 1,284)**

9. Stenczer B, Molvarec A, **Szabó G**, Szarka A, Fügedi G, Szijártó J, Rigó J Jr. (2012) Circulating levels of thrombospondin-1 are decreased in HELLP syndrome
Thrombs Res, 129: 470-3. **(IF: 2,372)**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki programvezetőmnek, Dr. Rigó János Professzor Úrnak, aki munkacsoportjába fogadott és lehetőséget adott arra, hogy kutatásomat a Semmelweis Egyetem, I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján végezzem. Külön köszönöm neki, hogy töretlen szándékkal, mindig a megfelelő pillanatban adott instrukciókkal, ötletekkel, biztatással egyengette utamat és lehetővé tette kongresszusi részvételeimet és szerepléseimet.

Köszönöm Dr. Nagy Bálint tudományos főmunkatárs Úrnak, türelmes, de mindig biztató témavezetőmnek, hogy közvetlen munkatársként, lehetőséget adott a Klinika molekuláris genetikai laborjában végzett munkához. Új módszerek megtanításával, a tudományos gondolkodás precízségével és a kutatás izgalmának örömeivel irányította, javította és számtalan tanáccsal segítette minden alkalommal munkámat.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Molvarec Attila egyetemi adjunktus Úrnak az elmúlt években munkatársként, konzulensként nyújtott segítségével. Logikus gondolkodásmódjával mutatott rá, hogy az eredmények alapján a megfelelő kérdéseket tegyem fel, illetve a statisztikai értékelés megfelelően történjen.

Hálával tartozom Dr. Stenczer Baláznak a mintagyűjtés és az adatbázis elkészítés lépéseinek fortélyainak megismerésében adott tanácsaiért.

Köszönöm a Genetikai Labor minden munkatársának, külön kiemelve Berceliné Sarus Renátának és Gnotek Editnek a mintavételben és a DNS izolálás megtanításában nyújtott segítségükért.

Nagyon hálás vagyok az Intenzív Osztály és az anesztézia valamennyi munkatársának (orvos és nővér kollégáknak egyaránt), akik klinikai munkám kezdetétől fogva támogattak, nemcsak ennek az értekezésnek az elkészülésében.

Utólag is minden egyetemi oktatómnak köszönöm tanítását, különösen Dr. Matesz Klára Professzor Asszonyak akinek diákköröseként feléledt a tudomány iránti kíváncsiság lángja bennem.

Köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak hogy gyermekkoromtól és az egyetemi tanulmányaim alatt is mögöttem álltak, valamint, arra, hogy szép anyanyelvünk helyes használatára tanítottak.

Végül szeretném megköszönni drága Feleségemnek és szeretett gyermekeinknek, egész családomnak, hogy az évek során szeretettel, megértéssel és türelemmel viselték a szabadidőből elesent órákat.