

# A szérum angiogén faktor és citokin profiljának vizsgálata praeeclampsiában

Doktori értekezés

**Dr. Szarka András**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Molnár Andrea szakorvos, Ph.D.

Dr. Szmola Richárd egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Siklós György egyetemi tanár,  
az orvostudomány doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Czegle Ibolya egyetemi tanársegéd,  
Ph.D.

Dr. Siklós Pál osztályvezető főorvos,  
az orvostudomány kandidátusa

Budapest  
2012

## Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>6</b>
1.1. A praeclampsia klinikai megjelenése	8
1.2. Epidemiológia, rizikófaktorok	11
1.3. A praeclampsia kóreredete és patogenezise	12
1.4. Angiogén faktorok szerepe a praeclampsia kialakulásában	16
1.5. A Th1/Th2 citokintermelés egyensúlyának megváltozása praeclampsziában	18
1.6. A szolubilis 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70) szerepe praeclampsziában	19
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>21</b>
<b>3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>23</b>
3.1. A tanulmányban részt vevők	23
3.2. A vérminták levétele, előkészítése és tárolása	24
3.3. Laboratóriumi módszerek	24
3.4. Statisztikai analízis	28
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Keringő angiogén faktorok vizsgálata praeclampsziában</b>	<b>29</b>
4.1.1. A betegek klinikai jellemzői	29
4.1.2. Laboratóriumi paraméterek	29
4.1.3. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek kapcsolata a szérum sFlt-1 és PIGF szintekkel	33
4.1.4. A szérum sFlt-1 és PIGF mérések diagnosztikus pontossága praeclampsziában	34
<b>4.2. A szérum citokin profil vizsgálata szövődménymentes terhességben és praeclampsziában</b>	<b>36</b>
4.2.1. A betegek klinikai jellemzői	36
4.2.2. Laboratóriumi paraméterek	36

4.2.3. A citokinek, kemokinek és adhézions molekulák szérumszintjeinek kapcsolata a tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel	44
<b>4.3. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás nők keringésében található citokinekkel, kemokinekkel, adhézions molekulákkal és angiogén faktorokkal</b>	<b>46</b>
4.3.1. A betegek klinikai jellemzői	46
4.3.2. Laboratóriumi paraméterek	46
4.3.3. Praeclampsziás betegek szérum Hsp70 szintjeinek viszonya a keringésben lévő citokinekhez, kemokinekhez, adhézions molekulákhoz és angiogén faktorokhoz	49
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b>	<b>55</b>
<b>5.1. Keringő angiogén faktorok vizsgálata praeclampsziában</b>	<b>55</b>
<b>5.2. A szérum citokin profil vizsgálata szövődménymentes terhességben és praeclampsziában</b>	<b>59</b>
<b>5.3. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás nők keringésében található citokinekkel, kemokinekkel, adhézions molekulákkal és angiogén faktorokkal</b>	<b>63</b>
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK</b>	<b>67</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>68</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>69</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>70</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE</b>	<b>82</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS</b>	<b>84</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>A</b>	dezoxiadenozin 5'-monofoszfát, dAMP
<b>Alk5</b>	aktivin receptor-szerű kináz 5
<b>ALT</b>	alanin-aminotranszferáz
<b>ANG</b>	angiopoietin
<b>ANOVA</b>	varianciaanalízis
<b>AST</b>	aszpartát-aminotranszferáz
<b>AUC</b>	a görbe alatti terület (area under curve)
<b>BMI</b>	testtömeg index
<b>C</b>	dezoxicitidin 5'-monofoszfát, dCMP
<b>CD</b>	differenciálódási antigén (cluster of differentiation)
<b>CI</b>	megbízhatósági tartomány (konfidencia intervallum)
<b>CRP</b>	C-reaktív protein
<b>DIC</b>	disszeminált intravaszkuláris koaguláció
<b>DNS</b>	dezoxi-ribonukleinsav
<b>dNTP</b>	dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraecetsav
<b>ELISA</b>	enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>G</b>	dezoxiguanozin 5'-monofoszfát, dGMP
<b>HELLP</b>	haemolysis, emelkedett májenzim értékek, alacsony thrombocytaszám
<b>Hsp</b>	hősokkfehérje
<b>Hsp60</b>	60 kDa molekulatömegű hősokkfehérje
<b>Hsp65</b>	65 kDa molekulatömegű hősokkfehérje
<b>Hsp70, HSPA1A</b>	70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje
<b>ICAM-1</b>	intercellularis adhéziós molekula-1
<b>IF</b>	impakt faktor
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon- $\gamma$
<b>IL</b>	interleukin
<b>IL-1ra</b>	IL-1 receptor antagonist

<b>IP-10 (CXCL10)</b>	interferon- $\gamma$ -indukált protein-10 (C-X-C motif kemokin 10)
<b>IUGR</b>	intrauterin növekedési retardatio
<b>LDH</b>	laktát-dehidrogenáz
<b>MCP</b>	monocyta kemotaktikus protein
<b>MgCl</b>	magnézium-klorid
<b>NK sejt</b>	természetes ölósejt
<b>NS</b>	nem szignifikáns
<b>OPD</b>	o-phenylene-diamin
<b>OR</b>	esélyhányados
<b>PBMC</b>	perifériás vér mononukleáris sejtjei
<b>PBS</b>	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
<b>PCR</b>	polimeráz láncreakció
<b>PIGF</b>	placentaris növekedési faktor
<b>RNS</b>	ribonukleinsav
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic
<b>sEng</b>	szolubilis endoglin
<b>sFlt-1</b>	szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1
<b>SRY</b>	Y kromoszóma szex-determináló régió
<b>STBM</b>	syncytiotrophoblast membrán mikropartikulum
<b>sTie-2</b>	szolubilis Tie 2 receptor
<b>T</b>	deoxitimidin 5'-monofoszfát, dTMP
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transzformáló növekedési faktor- $\beta$
<b>Th</b>	T helper
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrosis faktor- $\alpha$
<b>VCAM-1</b>	vascularis sejtadhéziós molekula-1
<b>VEGF</b>	vascularis endothelialis növekedési faktor
<b>VWF:Ag</b>	von Willebrand faktor antigén

## 1. Bevezetés

A praeclampsia világszerte korunk jelentős szülészeti kihívása, mivel az anyai és perinatalis morbiditás és mortalitás egyik vezető oka a gazdaságilag fejlett társadalmakban. Kóreredete mind a mai napig ismeretlen. Változatos klinikai megjelenésű multiszisztémás megbetegedés. Etiológiájának és patogenezisének megismerését, kísérletes tudományos vizsgálatát nehezíti azon tény, hogy csak humán terhességben fordul elő. A praeclampsia egy súlyos, az egész anyai szervezetet érintő megbetegedés, melyet a magasvérnyomás és a fehérjevizelés együttes jelenléte és esetenként kialakuló többszervi tünetegyüttes jellemez. Klinikai megjelenése jelentős különbségeket mutat betegenként, de egy adott betegnél is rövid idő alatt jelentős súlyosbodás, állapotromlás fordulhat elő. Előfordulása és a szövődmények súlyossága jelentős földrajzi és társadalmi ingadozást mutat. A terhességek 2-8 %-ban jelentkezik. Megfigyelték, hogy a praeclampsia gyakorisága az utóbbi években emelkedett [2, 3], mely részben a hajlamosító tényezők, mint krónikus magasvérnyomás, elhízás, cukorbetegség gyakoribb előfordulásával magyarázható [2]. Akár alacsony vérnyomásértékek mellett is jelentkezhetnek életveszélyes szövődmények. Latin-Amerikában és a Karib szigetvilágban az anyai halálozás 26 %-áért, míg Afrikában és Ázsiában az anyai mortalitás 9 %-áért tehető a praeclampsia és szövődményei felelőssé. A gazdaságilag fejlett országokban – köszönhetően a terhesgondozás magasabb színvonalának – az anyai mortalitás összességében alacsonyabb, de még így is az összes anyai haláleset 16 %-ának hátterében a praeclampsia és annak szövődményei állnak [4]. Kezelése az elmúlt néhány évtizedben lényegében nem változott, definitív megoldása a terhesség lezárása. Napjainkban sem előrejelzése, sem prognózisának meghatározása nem megoldott.

A praeclampsia változatos anyai és magzati szövődményeket okozhat, melyek nemritkán az anya és a magzat életét is veszélyeztetik [5].

### **Anyai szövődmények**

Abruptio placentae (1-4%)

DIC / HELLP-szindróma (10-20%)

Tüdőoedema (2-5%)

Akut veseelégtelenség (1-5%)  
Eclampsia (<1%)  
Májelégtelenség (<1%)  
Stroke (ritka)  
Haláleset (ritka)  
Késői cardiovascularis megbetegedés

### **Magzati szövődmények**

Koraszülés (15-67%)  
Magzati növekedési retardáció (10-25%)  
Hypoxia, neurológiai károsodás (<1%)  
Perinatalis halálozás (1-2%)  
Alacsony születési súly mellett kialakuló késői cardiovascularis megbetegedés

Számos vizsgálat igazolta, hogy azon nők körében, akik terhességük alatt praeclampszában szenvedtek, különös tekintettel, ha az korai kezdetű volt, vagy egy következő terhességben ismétlődött, évekkel-évtizedekkel később a szív-érrendszeri megbetegedések (hypertonia, koszorúér-betegség, stroke) előfordulása és az általuk okozott halálozás gyakoribb [6-8]. Mindez részben a közös rizikófaktorokkal (obesitas, hyperlipidaemia, insulinresistentia) részben a hasonló kórélettani mechanizmusokkal (oxidatív stressz, gyulladás, endothelsejt károsodás) magyarázható [9].

A fenti összefoglaló felsorolásból is kitűnik, hogy a praeclampsia jelentős magzati szövődmények okozója lehet, melyek mind a perinatalis morbiditást, mind a mortalitást kedvezőtlenül befolyásolják. Ezek közül kiemelendők a praeclampsia vagy annak szövődményei miatt indukált (elektív) koraszülések [9], melyek – különös tekintettel a 28. hét előtti éretlen koraszülésekre – perinatalis és késői szövődmények kiterjedt tárházát jelentik. A neonatológiai ellátás fejlődésének köszönhetően az utóbbi években ugyan jelentősen csökkent az újszülöttkori mortalitás, de a koraszülés okozta morbiditás, a túlélő koraszülöttek megbetegedései továbbra is jelentős problémát képeznek.

A fentiek alapján a praeclampsia kóreredetének és patogenezisének megismerése kiemelt fontosságú, mert csak ez által lehetséges a jövőben az anyai és magzati szövödmények hatékonyabb megelőzése.

### 1.1. A praeclampsia klinikai megjelenése

A *praeclampsia* a terhesség 20. hete után fellépő hypertonia (a szisztolés vérnyomás  $\geq 140$  Hgmm vagy a diasztolés vérnyomás  $\geq 90$  Hgmm, legalább két alkalommal – minimum 6 óra, de maximum 7 nap különbséggel – mérve, korábban normotensív terhesben), amit szignifikáns proteinuria ( $\geq 300$  mg/24 óra) kísér [10, 11]. A kórkép azonban ritkán a 20. gestációs hétnél korábban is jelentkezhet terhességi trophoblast-betegségek esetében. A klasszifikáció a diasztolés vérnyomás mérésekor a Korotkoff V. hang használatát javasolja. A proteinuria diagnózisa azon esetben is felállítható, ha legalább két random vizeletvizsgálat során (minimum 6 óra, de maximum 7 nap különbséggel nyerve) – húgyúti fertőzés hiányában – a fehérjekoncentráció  $\geq 300$  mg/l (vagy  $\geq 1$  + tesztcsíkkal nézve). Újabbán az egyszeri vizeletmintában mért fehérje/kreatinin hányados ( $\geq 30$  mg/mmol) használatát is elfogadják.

A korábban meglévő hypertonia, vesebetegség, illetve egyéb szisztémás betegség talaján kifejlődő praeclampsias állapotot *rárakódásos praeclampsia* néven különítjük el. Jelentőségét az adja, hogy prognózisa mind az anyára, mind a magzatra nézve kedvezőtlenebb, mint a praeclampsiaé [10].

A praeclampsia súlyosnak tekintendő az alábbi tünetek bármelyikének fennállása esetén [12]:

- A szisztolés vérnyomás  $\geq 160$  Hgmm vagy a diasztolés vérnyomás  $\geq 110$  Hgmm, legalább két alkalommal, minimum 6 óra különbséggel mérve
- Proteinuria  $\geq 5$  g/24 óra vagy  $\geq 3$  + tesztcsíkkal legalább két random vizeletmintában, minimum 6 óra különbséggel nyerve
- Oliguria (vizeletürítés  $< 500$  ml/ 24 óra)
- Központi idegrendszeri tünetek, látászavar
- Tüdőoedema vagy cyanosis



- Epigastriális vagy jobb bordaív alatti fájdalom
- Májenzim értékek emelkedése
- Thrombocytopenia

A praeclampsia súlyos szövődménye a HELLP-szindróma és az eclampsia. Mindkét kórkép jelentős anyai és perinatalis morbiditással és halálozással jár. A *HELLP* (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*)-szindróma jellemzői a microangiopathiás haemolysis, az emelkedett májenzim értékek és az alacsony thrombocytaszám [13]. Diagnosztikai kritériumai Sibai szerint [14]: szérumban aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitás >70 U/l, szérumban laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás >600 U/l és thrombocytaszám <100 G/l. Martin a legalacsonyabb perinatalis thrombocytaszám alapján a HELLP-szindrómát 3 csoportra osztotta (Mississippiklasszifikáció): súlyos (1. típus: thrombocytaszám ≤50 G/l), középsúlyos (2. típus: 51-100 G/l) és enyhe (3. típus: 101-150 G/l) thrombocytopeniával járó formára. A beosztás jól korrelált a kórkép súlyosságának laboratóriumi és klinikai mutatóival [15]. Sibai megfigyelései szerint a májérintettség jeleként az esetek 40-90 %-ban észlelhető epigasztriális fájdalom [16]. Egyes közlemények az epigasztriális fájdalom és a fejfájás, látászavar, hányinger vagy hányás társulását a kedvezőtlen anyai kimenetel jobb előrejelzőjének tartják, mint a laboratóriumi paramétereket [17]. Az *eclampsia* a praeclampsias betegben jelentkező eszméletvesztéssel járó tonusos-clonusos görcsroham (grand mal roham), ami más okkal (például epilepsia, vérző arteriovenosus malformatio, aneurysma ruptura) nem magyarázható [12]. A kórisme felállítását megnehezíti, hogy mind a HELLP-szindróma, mind az eclampsia kialakulhat normális vérnyomás mellett és proteinuria hiányában is [18, 19].

Fontos hangsúlyozni, hogy praeclampsia tüneteit egyéb terhes nőket érintő megbetegedés esetén is észlelhetjük.

**Súlyos praeclampsia differenciál-diagnózisa szervrendszerenként [4]*****Érrendszer***

Phaeochromocytoma  
 Hyperaldosteronismus  
 Cushing-kór  
 Thyreotoxikózis  
 Aorta coarctatio

***Vizeletvezető rendszer***

Lupus nephritis  
 Akut és krónikus glomerulonephritis  
 Interstitialis nephritis  
 Pyelonephritis

***Máj***

Akut terhességi zsírmáj  
 Terhességi cholestasis  
 Hyperemesis gravidarum  
 Cholecystitis  
 Cholangitis  
 Vírusos hepatitis  
 Akut pancreatitis  
 Gastritis  
 Gyomorfekély

***Haemostasis***

Terhességi thrombocytopaenia  
 Thromboticus thrombocytopaeniás  
 purpura  
 Haemolytikus uraemiás szindróma  
 Idiopathias thrombocytopaeniás purpura

Antifoszfolipid szindróma  
 Fólsavhiány  
 Szisztémás lupus erythematosus  
 Szeptikus vagy haemorrhagiás shock

***Légzőszerv***

Pneumonia  
 Tüdőembólia  
 Antifoszfolipid szindróma

***Szív-érrendszer***

Peripartum cardiomyopathia  
 Myocardialis infarctus vagy ischaemia

***Idegrendszer***

Agyi szisztémás lupus erythematosus  
 Epilepszia  
 Agyi tumor  
 Cerebrovascularis történések  
 Hypertenzív encephalopathia  
 Anyagcsere betegség

***Látószerv***

Retina artériás vagy vénás thrombózisa  
 Retina ischaemiája  
 Retinaleválás  
 Retina tartós vasospasmusa  
 Centralis serosus retinopathia  
 Uvea melanoma  
 Chorioidea osteoma

## 1.2. Epidemiológia, rizikófaktorok

A praeclampsia incidenciája 2-8%, a széles tartomány jelzi a társadalmi különbségeket a kórkép előfordulásának gyakoriságában, valamint a nem egységesített diagnosztikai kritériumokat [20]. Praeclampsziás terhesek 75%-nál a kórkép enyhe formája és terminusközelben jelentkezik, valamint a terhesség kedvezőtlenebb kimenetele is elhanyagolható mértékű [11, 21, 22]. A praeclampsia előfordulási gyakorisága az utóbbi években növekedett, amit az ikerterhességek gyakoribb előfordulásával [23-25], az egyre idősebb életkorban vállalt terhességekkel, illetve idült megbetegedések mellett vállalt terhességekkel [26] magyarázhatunk (krónikus hipertonia [23, 27], diabetes [23], vesebetegség, autoimmun betegség, thrombophiliák [28-30]).

Epidemiológiai vizsgálatok a praeclampsia számos rizikófaktorát azonosították [5, 20, 31]:

- obesitas és inzulinresistentia
- primiparitas
- fiatal vagy idős anyai életkor
- 10 év vagy annál hosszabb intervallum egy előző terhesség óta
- praeclampsia egy előző terhességben vagy a családi anamnézisben
- többes terhesség
- chronicus hipertonia
- gestatiós és praegestatiós diabetes mellitus
- vesebetegség, szisztémás autoimmun betegség, antifoszfolipid szindróma
- alacsony anyai születési súly (magzati sorvadás miatt)
- anyai fertőzések (húgyúti fertőzés, periodontitis, chlamydia, cytomegalovírus okozta fertőzés)
- afro-amerikai etnikum
- malnutritio
- hyperlipidaemia, hyperhomocysteinaemia
- thrombophiliák (Leiden-mutatio, protein S-hiány)
- hydrops fetalis
- chromosomaaberratio (13-trisomia, triploidia)

- molaterhesség

Megfigyelték továbbá, hogy a terhesség alatti dohányzás 30-40%-kal csökkenti a praeclampsia előfordulásának kockázatát [32], ugyanakkor rámutattak arra is, hogy ez a rizikócsökkenés nincs arányban a dohányzás terhegre gyakorolt káros hatásaival (pl.: IUGR, koraszülés, abruptio placentae gyakoribb előfordulása).

A praeclampsia általában primiparákban jelentkezik. Jóval gyakoribb a megbetegedés előfordulása, ha a fogamzás előtt az anyai szervezet a partner minimális spermaexpozíciójának volt kitéve [33]. Több tanulmány is ezzel a megfigyeléssel támasztja alá a kórkép nagyon fiatal életkorban észlelt gyakoribb előfordulását [31, 34]. Egy kiviselt terhesség ugyanattól a partnertől csökkenti a praeclampsia kockázatát egy következő terhességben, de ez a kedvező hatás elvész, ha a terhesség új partnertől fogant. Ezek a megfigyelések vezettek a primipaternitas koncepciójához, amit alátámaszt az is, hogy a praeclampsia gyakoribb donor-inseminatio és embryodonatio esetében. Az apai faktorok jelentőségére utal, hogy a partnercsere egy előző praeclampsias terhesség esetében csökkenti a praeclampsia ismétlődésének kockázatát, valamint, hogy az apa új kapcsolatából fogant terhességben a praeclampsia előfordulása gyakoribb [31, 35].

### **1.3. A praeclampsia kóreredete és patogeneze**

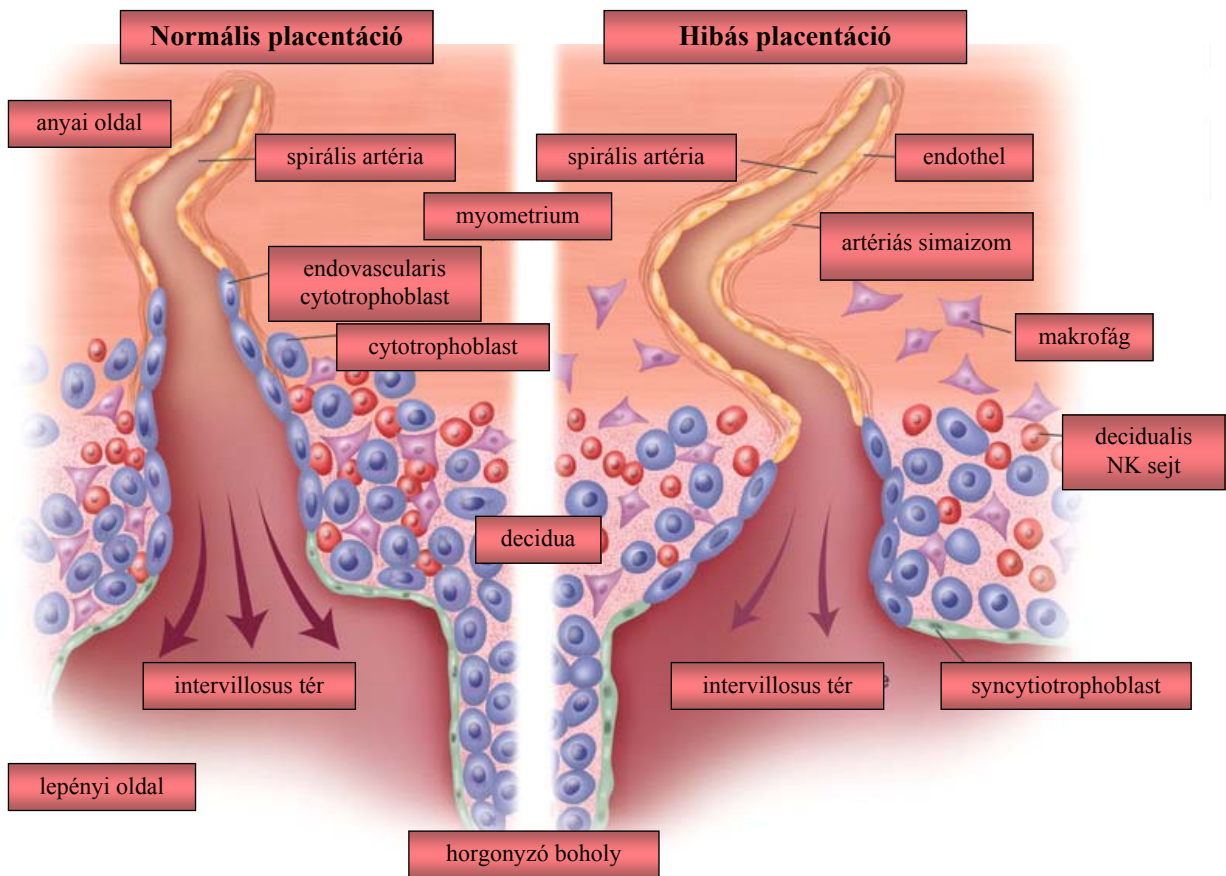
A praeclampsia kóreredetét és patogenezisét mind a mai napig az intenzív kutatások ellenére részben homály fedi. A leginkább elfogadott elmélet szerint megkülönböztetünk „lepényi” eredetű és „anyai” praeclampsziát [1].

A „lepényi” praeclampsia esetén a kóreredet a hypoxiás körülmények miatt oxidatív stressznek kitett placentában gyökerezik. Az „anyai” praeclampsia esetén a kórkép egy egészséges méhlepény és a kedvezőtlen anyai adottságok együtteseként jelentkezik. Ilyen praedisponáló tényező például a hosszú ideje fennálló magasvérnyomás vagy cukorbetegség [36].

A lepényi eredetű praeclampsia esetén preklinikai és klinikai stádiumok különböztethetők meg. A preklinikai stádiumhoz a korai lepény hibás fejlődése (hibás

placentáció), míg a klinikai stádiumhoz a növekvő mértékben hypoxiás placenta által okozott anyai tünetek, mint hypertonia, proteinuria, valamint kóros alvadási és májfunkciós értékek sorolandók. Súlyos esetekben, különösen a korai jelentkező praeclampsianál, a magzat fokozott tápanyag- és oxigénhiánynak van kitéve.

A terhesség második és harmadik trimeszterében a lepény egyre nagyobb anyai vérkínálatot igényel. Mindez az uteroplacentaris vérkeringés végartériáinak, a spirális artériák átalakulásával valósul meg. Ezen átalakulás kulcsfontosságú eleme a trophoblastok egy altípusa, az extravillosus cytotrophoblast, mely a 6. terhességi héttől a spirális artériák falán át penetrál és intraluminalis trophoblast-dugókat képez. A 9. és a 12. terhességi hét között az uteroplacentaris erek recanalizálódnak, az ezzel járó fokozott lepényi oxigenizáció és az oxidatív stressz markereinek megjelenése vízváltató a trophoblastok növekedése és differenciálódása szempontjából [37]. Az invazív cytotrophoblastok ettől kezdve átalakítják a spirális artériákat oly módon, hogy elpusztítják azok simaizomrétegét és így alakítva ki dilatált véredényeket. Ezek a folyamatok a 20. terhességi hétre befejeződnek és a kitágult intervillosus ürökbe anyai vér áramolhat. A lepényi eredetű praeclampsia esetén ezen átalakulás korlátozott mértékű (hibás placentáció), ezáltal az uteroplacentaris vérkeringés kapacitása túl kevés (1. ábra). A placentáció zavarának oka jelen ismereteink szerint az anya és semi-allogén magzata közötti immunológiai maladaptatio (az extravillosus cytotrophoblast és a decidualis NK sejtek együttműködésének zavara, a regulátoros T sejtek számának csökkenése és funkciójának károsodása) [38-40]. A hibás placentáció azonban csak praedisponáló tényezőnek tekintendő, és nem minden esetben vezet praeclampsiahoz, illetve intrauterin magzati növekedési retardációt is okozhat. A praeclampsia kialakulását mind genetikai, mind környezeti tényezők befolyásolják, ezzel is jelezve multifaktoriális kórereditét [41].

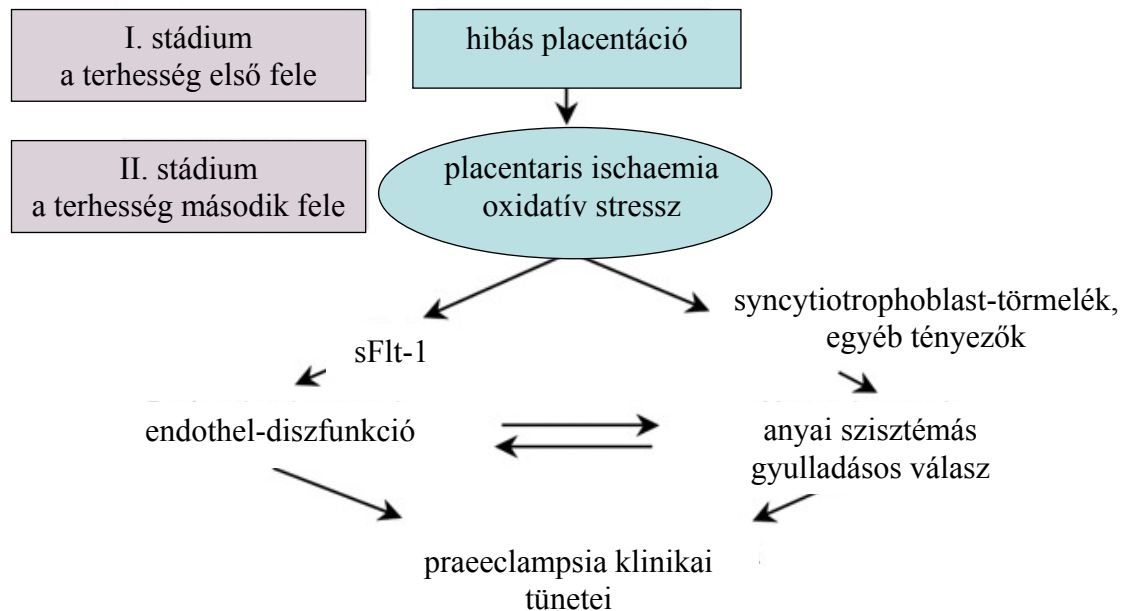


1. ábra [1]

## A placentáció zavara praeclampsziában

Szövődménymentes terhesség esetében megnövekedett szisztémás gyulladásos válaszreakció figyelhető meg az anyai szervezetben, mely praeclampsia esetén jóval nagyobb mértékű. Ezen folyamatban a szisztémás gyulladásos válaszreakció számos eleme részt vesz, mint a gyulladásos leukocyták, az endothelium, az alvadási kaskád, a thrombocyták és az akut fázis fehérjék. A szisztémás gyulladásos válasz okai még nem teljesen ismertek [42]. Érdekes megfigyelés, hogy a placentából trophoblast-törmelék szabadul fel az anyai keringésbe. Ez syncytiotrophoblast membrán részecskékből, cytokeratin fragmentumokból, szolubilis magzati RNS-ből és DNS-ből, valamint cytotrophoblast sejtekből áll. Praeclampsziában ezen gyulladásos választ fokozó törmelék emelkedett mennyiségben van jelen, mely magyarázatul szolgálhat a fokozott

anyai gyulladáshoz való hajlandóságra. A hypoxiás méhlepény oxidatív stresszhatásnak van kitéve, mely az antioxidáns védekező mechanizmusok és a reaktív oxigén szabadgyökök termelődése közötti egyensúlyt az utóbbiak irányába tolja el. Feltehetően az oxidatív stresszhatás felelős a fokozott trophoblast-törmelék felszabadulásért [43]. A lepényi eredetű praeclampsia kétlépcsős modelljének megfelelően a hypoxiás, diszfunkcionális lepény által az anyai keringésbe bocsátott faktorok idézik elő a kórkép anyai tünetegyüttesének megjelenését, melyért az excesszív anyai szisztémás gyulladáshoz való hajlandóság és generalizált endothel-diszfunkció tehető felelőssé (2. ábra).



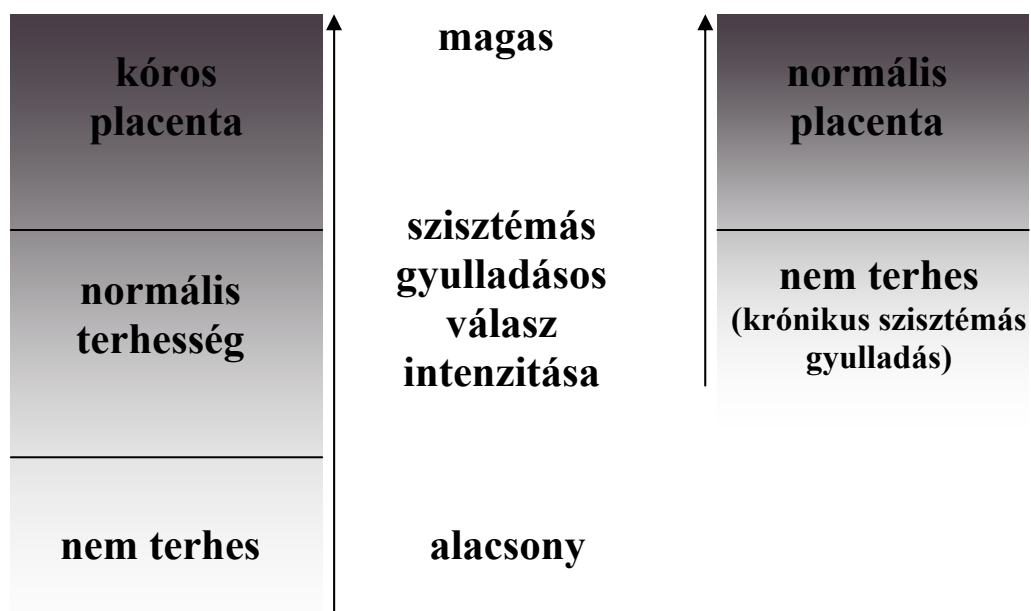
2. ábra [1]

A lepényi praeclampsia kialakulásának kétlépcsős modellje

Az anyai eredetű praeclampsia esetén a kórképet kiváltó ok nem a kóros lepényben, hanem a kóros anyai gyulladáshoz kapcsolódó reakciókészségben rejlik. A kórkép ezen formájának kialakulásában praedisponáló tényezőként krónikus szisztémás gyulladással kísért megbetegedések, úgymint az anyai magasvérnyomás, az elhízás, a cukorbetegség, illetve autoimmun betegségek szerepelhetnek (3. ábra) [36].

### Placentaris praeclampsia

### Anyai praeclampsia



3. ábra [44]

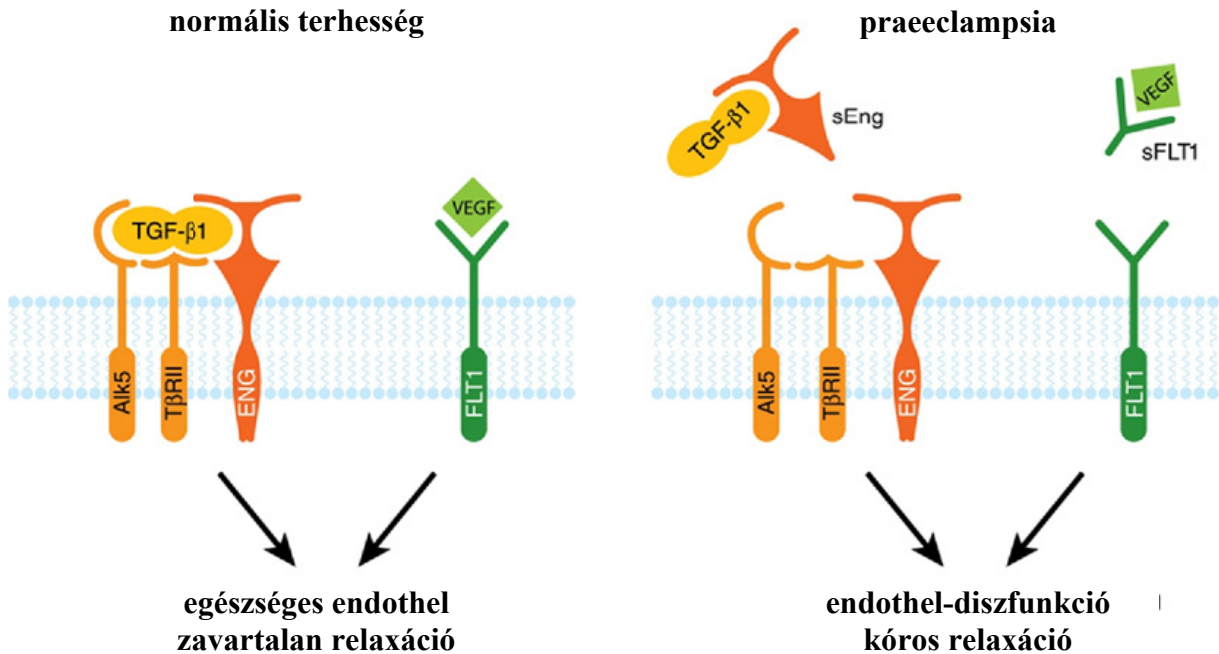
A praeclampsia két altípusa: placentaris és anyai praeclampsia

#### 1.4. Angiogén faktorok szerepe a praeclampsia kialakulásában

2003 óta egyre nagyobb számban jelennek meg tudományos közlemények, melyek a praeclampsia kialakulásában a vérkeringésben megtalálható angiogén faktoroknak kulcsszerepet tulajdonítanak (4. ábra). Az elsőként leírt kóros eltérések a szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) megnövekedett, valamint a szabad



placentaris növekedési faktor (PIGF) és vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) csökkent szérumszintjei voltak [45, 46].



4. ábra [47]

Az angiogén faktorok szerepe praeclampsziában

Az sFlt-1 az Flt-1 (a VEGF és PIGF endothel-receptora) alternatív hasítása következtében keletkezik. Az sFlt-1 megtartotta az Flt-1 extracelluláris ligand-kötő egységét, ugyanakkor elveszítette a transzmembrán és intracelluláris doméneket. Ezáltal a keringésben megköti és antagonizálja a VEGF-t és a PIGF-t [48]. Az sFlt-1 lépényi expressziójának és az anyai vérkeringésben mért koncentrációjának növekedése figyelhető meg praeclampsziában. Az sFlt-1 és a PIGF keringésben észlelhető szintjei már hetekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt változnak és összefüggésben állnak a kórkép súlyosságával [49-51]. Az sFlt-1 szintek szülés után néhány nappal normalizálódnak párhuzamosan a proteinuria és a hipertónia megszűnésével. Az sFlt-1 vasoconstrictiot és endothel-diszfunkciót előidézve járul hozzá a praeclampsia kialakulásához.

A szolubilis endoglin (sEng) egy szintén anti-angiogén biomarker, mely praeclampszában megnövekedett mértékben van jelen hasonlóan az sFlt-1-hez. A sEng az endoglinnak (CD105) egy megcsonkított formája, mely a keringésben megkötí és antagonizálja a transzformáló növekedési faktor- $\beta$ -t, ezáltal felerősíti az sFlt-1 endothel-diszfunkciós hatását. Az sFlt-1-hez hasonlóan a sEng vérkeringésben mérhető szintjei a praeclampsia megjelenése előtt már hetekkel emelkedettek [52-54].

A VEGF az endothelsejtek stabilizálásában játszik fontos szerepet, különösen a fenesztrált endothelium esetében, mely a praeclampsia által elsődlegesen érintett szervekben fordul elő, úgymint az agyban (plexus chorioideus), vesében (glomerulus) és májban (sinusoid) [55]. Számos állatkísérlettel bizonyították, hogy az anti-VEGF kezeléssel praeclampsia-specifikus tünetek, mint hypertonia és proteinuria idézhetők elő [56].

A PlGF élettani szerepe jóval kevésbé van feltérképezve, mint a VEGF-é, azonban annyi megállapítható, hogy a PlGF ischaemia, gyulladás és sebgyógyulás esetén stimulálja az angiogenezist.

### **1.5. A Th1/Th2 citokintermelés egyensúlyának megváltozása praeclampszában**

Szövődménymentes terhesség esetében egyensúly figyelhető meg a Th1-típusú és Th2-típusú citokintermelés viszonylatában. A Th1-típusú citokineket, mint az interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$  és a tumor nekrozis faktor (TNF)- $\alpha$  a Th1 sejtek, míg a Th2-típusú citokineket, mint az IL-4, IL-5, IL-6 és az IL-13 a Th2 sejtek termelik. Az előbbieket a cellularis, míg az utóbbiak a humoralis immunválasz kialakulását közvetítik. A Th2-típusú immunitás fontos szerepet játszik a terhesség szövődménymentes lefolyásában. A Th1-típusú immunitással szemben praedomináns Th2-típusú immunitás gátolja a semi-allogén magzattal szembeni citotoxicus immunválaszt és fokozott gyulladáshoz való készséget élettani terhességben [57].

Praeclampszában a szisztémás gyulladás egyik jellegzetessége az egészséges terhességre jellemző Th2-irányú eltolódás elmaradása és a Th1-típusú immunitás praedominanciája. Saito és mtsai számoltak be először arról, hogy praeclampszában a perifériás vérben a Th1 sejtek gyakorisága és a Th1/Th2 arány szignifikánsan

magasabb, míg a Th2 sejtek százalékos megoszlása szignifikánsan alacsonyabb, mint a normális terhesség harmadik trimeszterében [58]. Egy másik tanulmányban ugyanez a kutatócsoport praeclampsziában a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) megnövekedett IL-2, IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelését, valamint a vérnyomás átlagértéke és a Th1 citokin koncentrációk közötti pozitív korrelációt figyelte meg [59]. Praeclampsziában a praedominans Th1-típusú immunitás irányába történő eltolódást a perifériás vér T (helper és citotoxikus) és NK sejtjeiben intracellularis citokinek mérésével foglalkozó más vizsgálatok, valamint praeclampsziás betegek perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek citokin szekréciójának meghatározása is megerősítette [60-63]. Mindazonáltal egészséges és praeclampsziás terhességben a keringő citokinek koncentrációjával foglalkozó tanulmányok ellentétes eredményeket hoztak [64, 65]. Az ellentmondások feltehetően a citokinek eltérő mérési technikáinak, a tanulmányban részt vevő populációk etnikai különbségeinek, illetve a kórkép súlyosságában megfigyelhető eltéréseknek tudhatók be.

#### **1.6. A szolubilis 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70) szerepe praeclampsziában**

A hő sokkfehérjék elsősorban intracellularis fehérjeként váltak ismertté és a sejten belül dajkafehérje (molecularis chaperon) és citoprotectiv szerepet töltenek be [66]. A hő sokkfehérjék azonban kifejeződhetnek a sejtek felszínén is, ami stressz hatására fokozódik [67-70]. A Hsp70 megtalálható továbbá egészséges emberek perifériás vérében [71]. A Hsp70 kijuthat az extracellularis térbe passzív módon a széteső, necroticus sejtekből [72, 73], illetve aktív módon: exosomák és lysosomák belsejében, illetve a lipid raftokon keresztül [74-77]. Az extracellularis Hsp70 a sejtek közötti ősi veszély jelként (a sejtet ért stresszhatást, illetve a sejtkárosodást, sejtszétesést jelezve) egy pro-inflammatorikus (Th1-típusú) immunválaszt hoz létre a természetes és az adaptív immunrendszer aktiválásával [78]. Az extracellularis Hsp70 képes citokinként és dajkafehérjeként is viselkedni, amit Asea „chaperokine” aktivitásnak nevezett el [79].

Élettani terhességben a keringésben lévő Hsp70 szintjei alacsonyabbak, mint nem terhes nőkben, és pozitív korrelációt mutatnak a terhességi korrall, valamint negatív korrelációt az anyai életkorrall [80]. Praeclampsziában a szérum Hsp70 szintek emelkedettek szövődménymentes terhességgel összehasonlítva, és a kórképben megfigyelt szisztémás gyulladást, oxidatív stresszt, valamint hepatocellularis károsodást tükrözik [81, 82]. Továbbá a Hsp70 szintek jóval magasabbak HELLP-szindrómában, mint súlyos praeclampsia esetén HELLP-szindróma kialakulása nélkül, jelezve a szöveti károsodást, úgymint a haemolysist és hepatocellularis necrosist, illetve a kórkép súlyosságát [83, 84]. A keringésben található hősokkfehérje-ellenes antitestek (anti-humán Hsp60, anti-humán Hsp70, anti-mycobacterialis Hsp65) szintjei azonban nem változnak praeclampsziában [85].

## 2. Célkitűzések

1. A praeclampsia etiológiája és patogenezise az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott teljes mértékben. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy patogenezisében a keringésben található angiogén és anti-angiogén faktorok egyensúlyának felbomlása fontos szerepet játszik. Ezért tanulmányunk során megmértük egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás várandósok szérumban az sFlt-1 és PlGF szinteket. Továbbá meghatároztuk a praeclampsia kialakulásában szerepet játszó patofiziológiai folyamat számos markerét, és megvizsgáltuk, hogy a szérumban sFlt-1 és PlGF szintek milyen összefüggést mutatnak a tanulmányban résztvevők klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, különös tekintettel a szisztémás gyulladás (C-reaktív protein), az endothel-aktiválódás (von Willebrand faktor antigén), az endothel-sérülés (fibronektin), az oxidatív stressz (malondialdehid) és a trophoblast-degradáció (szabad magzati DNS) markereire. Célunk volt továbbá a szérumban sFlt-1 és PlGF mérések diagnosztikus pontosságának meghatározása praeclampsziában.
2. A praeclampsziát egy kifejezett anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció jellemzi az immunrendszer természetes és adaptív ágának aktiválódásával. A citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák központi szerepet játszanak mind a természetes, mind az adaptív immunválaszban. Ezért célunk volt, hogy nagyszámú egészséges nem terhes és terhes nő, valamint praeclampsziás beteg bevonásával átfogó módon meghatározzuk a keringésben található citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák koncentrációját. Megvizsgáltuk továbbá viszonyukat a vizsgálatban részt vevők klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel, beleértve a gyulladást (C-reaktív protein), endothel-aktivációt (von Willebrand faktor antigén), endothel-sérülést (fibronektin), oxidatív stresszt (malondialdehid) és trophoblast-törmelék (szabad magzati DNS) markereit.
3. Korábban beszámoltunk róla, hogy a 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintje emelkedett praeclampsziában szövődménymentes terhességgel összehasonlítva, jelezve ezzel a kórképben megfigyelt szisztémás gyulladást, oxidatív stresszt és hepatocellularis károsodást. Korábbi megfigyeléseinket kiterjesztve megvizsgáltuk, hogy praeclampsia esetén az

emelkedett szérumban Hsp70 szintek összefüggésben állnak-e a kórkép patogenezisében kulcsszerepet betöltő citokinek, kemokinek, adhézión molekulák és angiogén faktorok keringésben mért koncentrációival.

### 3. Beteganyag és módszerek

#### 3.1. A tanulmányban részt vevők

Hatvan praeclampsias, 60 egészséges, szövődmenymentes terhest és 59 egészséges nem terhes nőt vontunk be eset-kontroll vizsgálatunkba. A tanulmány résztvevői a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, valamint a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályának betegei közül kerültek ki. Mindegyik résztvevő a kaukázusi rasszhoz tartozott és Magyarország ugyanazon földrajzi régiójában lakott. A praeclampsias és egészséges terheseket az anyai életkor és a terhességi kor alapján illesztettük és válogattuk ki ennek megfelelően 93 praeclampsias és 176 egészséges terhes közül [80, 81]. Kizáró okként szerepelt a többes terhesség, a krónikus magasvérnyomás, a cukorbetegség, az autoimmun betegség, az érrendszerei megbetegedés, a vesebetegség, az anyai vagy magzati fertőzés és magzati fejlődési rendellenesség. Az egészséges nem terhes nők mindegyikét menstruációs ciklusának korai follicularis fázisában (a ciklus 3. és 5. napja között) vizsgáltuk, és egyikük sem részesült hormonális fogamzásgátló kezelésben. Minden vizsgálat éhgyomorrra történt. A terhesek közül egyiknél sem volt megindult szülés, vagy idő előtti burokpedés észlelhető.

A praeclampsia kritériumának a korábban normotónias terheseknél a 20. terhességi hét után jelentkező magasvérnyomást (hat óra különbséggel  $\geq 2$  alkalommal  $\geq 140$  Hgmm szisztolés vagy  $\geq 90$  Hgmm diasztolés vérnyomás) és fehérjevizelést ( $\geq 0.3$  g/24h vagy  $\geq 1$  + a vizelet gyorsteszten húgyúti fertőzés nélkül) tekintettük. Minden praeclampsias résztvevő normotóniássá vált a szülést követő 12. hétig. A praeclampsias súlyosnak tekintettük, ha bármelyik a következő kritériumok közül teljesült:  $\geq 160$  Hgmm szisztolés vagy  $\geq 110$  Hgmm diasztolés vérnyomás, proteinuria  $\geq 5$  g/24h (vagy  $\geq 3$  + a vizelet gyorsteszten). Azon terhes nőket, akiknél eclampsia vagy HELLP-szindróma alakult ki, nem vontuk be a vizsgálatokba. Korai kezdetű praeclampsiasról általában akkor beszéltünk, ha annak tünetei a betöltött 34. terhességi hét előtt léptek fel [86]. Az intrauterin növekedési retardáció (IUGR) diagnózisát akkor állítottuk fel, ha a magyarországi születési súlypercentilis táblázat alapján az újszülött

születési súlya az adott terhességi korra és nemre vonatkozó 10 percentilis értéket nem érte el [87].

A vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta, és minden beteg írásban hozzájárulását adta a vizsgálatokhoz. A tanulmányt a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően végeztük.

### **3.2. A vérminták levétele, előkészítése és tárolása**

A vérmintákat alkari vénából vettük natív, valamint etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) és nátrium-citrát antikoagulánsokat tartalmazó Vacutainer™ kémcsövekbe. Ezt követően a mintákat szobahőmérsékleten 10 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. Az alikvotokat a vizsgálatig - 80 Celsius fokon tároltuk.

### **3.3. Laboratóriumi módszerek**

A szérum össz sFlt-1 és biológiailag aktív PlGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 05109523 és 05144671) útján határoztuk meg Cobas e 411-es analizátoron (Roche, Mannheim, Németország) 54 praeclampsias, 58 egészséges terhes és 52 egészséges nem terhes nőben [88, 89].

#### **A szérum sFlt-1 koncentráció meghatározásának menete:**

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

- 1. inkubáció: A mintában (20 µl) az sFlt-1-specifikus monoklonális biotinilált antitest és a ruténium komplexszel jelölt sFlt-1-specifikus monoklonális antitest reakciója során immunkomplex jön létre.
- 2. inkubáció: A sztreptavidinnel fedett mikroszemcsék hozzáadása után a biotin és a sztreptavidin között kialakuló kölcsönhatás következtében a komplex a szilárd fázishoz kötődik.



- A berendezés a reakcióelegyet a mérőküvetébe szívja, ahol a (mágnesezhető) mikroszemcséket az elektróda a felszínén mágneses úton befogja. A kötetlen anyagok ezután a ProCell-lel együtt távoznak a rendszerből. Az elektródára kapcsolt feszültség kemilumineszcens fénykibocsátást indukál, amit egy fotosokszorozó mér.
- Az eredményeket a készülék a kalibrációs görbe alapján határozza meg, amelyet készülék-specifikusan, 2-pontos kalibrációval és a reagens-vonalkódból leolvasott mester-görbe felhasználásával generál.

#### **A szérum PIGF koncentráció meghatározásának menete:**

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

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

A további lépések megegyeznek a szérum sFlt-1 meghatározásánál leírtakkal.

Az IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ -indukált protein (IP)-10, monocytá kemotaktikus protein (MCP)-1, intercellularis adhéziós molekula (ICAM)-1 és vascularis sejtadhéziós molekula (VCAM)-1 szérumszintjeit multiplex szuszpenziós array útján (Bio-Plex, Cat. No. X500317TGY és XF0000ZGAI) Bio-Plex 200 analizátor segítségével mértük meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Az anyai szérum transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ 1 szintjeit ELISA (enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat) módszerrel határoztuk meg (DRG International, Mountainside, New Jersey, USA, Cat. No. EIA-1864).

#### **A multiplex citokin meghatározás menete:**

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

1. A szinkódolású analit-specifikus mikrorészecske-koncentrátumokat, reagenseket, mintákat és standardokat a leírás szerint előkészítettük. A lemezt 100 µl mosópuffer hozzáadásával előre megnedvesítettük, majd eltávolítottuk a folyadékot a mérőhely alján lévő szűrőn át, a mikrolemezhez tervezett vákuumelosztóval.

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

A szérum Hsp70 (HSPA1A) szinteket az R&D Systems (DYC1663E, Minneapolis, Minnesota, USA) ELISA kitjével mértük meg 60 praeeclamsiás és 60 egészséges, szövődmenymentes terhes nőben. A mérés során az egér anti-humán Hsp70 monoklonális antitesttel kezelt (100 µl/lyuk; 2 µg/ml; bikarbonát pufferben (pH 9.5) egy éjszakán át 4°C-on) ELISA lemezt háromszori mosás (PBS (foszfáttal pufferelt sóoldat), 0.1% Tween 20) és a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása (200 µl PBS, 0.5% zselatin, 0.1% Tween 20, 1 órán át, szobahőn) után hígítatlan vizsgálati szérummintával inkubáltuk (100 µl/lyuk; 2 órán át, szobahőn). Újabb mosási ciklust követően biotinnal jelzett nyúl anti-humán Hsp70 monoklonális antitesttel (100 µl/lyuk; 0.5 µg/ml; PBS-zselatinban, 1.5 órán át, szobahőn) és sztreptavidin-torma peroxidáz komplexszel (mosás után; 1:200; PBS-zselatinban, 20 percig, szobahőn) detektáltuk a lemezhez kötődött Hsp70 mennyiségét. Standardként rekombináns humán Hsp70 hígítási sorát használtuk (0-10 ng/ml). A lemezeket mosást követően 100 µl o-

phenylene-diamine (OPD, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) szubsztráttal hívtuk elő, az optikai denzitást 490 nm-en (referencia 620 nm) mértük.

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

Fiú újszülöttek esetén az anyai plazmából szilícium-dioxid adszorpciós módszerrel kivontuk a DNS-t, ezt követően meghatároztuk a szabad magzati DNS mennyiségét az Y kromoszóma szex-determináló régiójának (*SRY*) kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciójával (PCR) [90]. A DNS-t 400 µl EDTA-val antikoagulált plazmából vontuk ki High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Németország) segítségével, a gyártó előírásai alapján. A DNS-t 50 µl elúciós puffer oldattal mostuk ki, amelyből 1 µl-t használtunk mintaként a PCR reakcióhoz. A SYBR Green valós idejű PCR analízishez a LightCycler 1.0 készüléket alkalmaztuk (Roche, Mannheim, Németország). A keringésben található fiú magzati DNS kimutatásához az *SRY* gén következő primereit használtuk: előre 5'-*GGC AAC GTC CAG GAT AGA GTG A-3'*, hátra 5'-*TGC TGA TCT CTG AGT TTC GCA TT-3'*. A 10 µl térfogatú PCR reakcióelegy 1 µl DNS-t, 1-1 µl 2.5 pmol/l primert, 1 µl DNA Master SYBR Green I mixet (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit: Taq polimeráz, dNTP, MgCl<sub>2</sub>) és 6 µl nukleázmentes vizet tartalmazott. A polimeráz láncreakció a következő program szerint zajlott: kezdő denaturáció 95°C-on 8 percig, amit 40 ciklus denaturáció (95°C-on 5 másodpercig), annealing (60°C-on 10 másodpercig) és láncszintézis (72°C-on 15 másodpercig) követett, majd 4°C-ra történő hűtés zárt le. A plazmamintában jelenlévő szabad magzati DNS mennyiségének meghatározásához ismert koncentrációjú férfi genomiális DNS-el készített standard hígítási görbét használtunk.

A vérplazma malondialdehid szintjét tiobarbiturát alapú kolorimetriás eljárás útján mértük meg [91]. A vizsgálat a 2-tiobarbitursav malondialdehiddel történő nucleophil hozzáadásán alapult savas kémhatáson (pH=2.0) és magas hőmérsékleten (100 °C). A kalibrációt a malondialdehid forrásaként 1,1,3,3-tetraethoxy-propán (Fluka, Buchs, Svájc) alkalmazásával végeztük.

### 3.4. Statisztikai analízis

A folyamatos változók eloszlását a Shapiro-Wilk-féle  $W$ -teszt útján határoztuk meg. Mivel azok nem mutattak normális eloszlást, nem-paraméteres statisztikai módszereket alkalmaztunk. Két csoport folyamatos változóinak összehasonlításához a Mann-Whitney  $U$ -tesztet, míg több csoport esetén a Kruskal-Wallis-féle varianciaanalízist (ANOVA) használtuk. Post-hoc tesztként az átlagos rangszámok többszörös összehasonlítását végeztük. A csoportok kategorikus változóinak összehasonlításához a Fisher-féle egzakt és a Pearson-féle  $\chi^2$  tesztet alkalmaztunk. A korrelációs együtthatókat a Spearman-féle rangszám korrelációs eljárással számoltuk ki. A szérum sFlt-1 és PlGF mérések diagnosztikus pontosságát praeclampsziában a Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe segítségével értékeltük ki. A többszörös lineáris regresszióhoz és a szórás diagramok készítéséhez nem-paraméteres módszerként a függő változó logaritmusát vettük alapul. Az esélyhányadosokat (odds ratio, OR) és azok 95%-os konfidencia intervallumát (confidence interval, CI) logisztikus regresszióval határoztuk meg.

A statisztikai analízist az alábbi szoftverek alkalmazásával végeztük: STATISTICA (version 8.0; StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), Statistical Package for the Social Sciences (version 15.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) és MedCalc for Windows (version 10.0.1.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Minden statisztikai analízisünknel a  $p < 0.05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az értekezésben az adatok folyamatos változók esetén medián (interkvartilis tartomány), a kategorikus változóknál abszolút szám (százalék) formájában vannak megadva.

## 4. Eredmények

### 4.1. Keringő angiogén faktorok vizsgálata praeclampsziában

#### 4.1.1. A betegek klinikai jellemzői

A tanulmány résztvevőinek klinikai jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a tanulmányban részt vevő csoportok életkorát illetően. Továbbá nem találtunk szignifikáns különbséget a praeclampsziás és egészséges terhes nők között a vérvételkori terhességi korban és a primiparák előfordulási gyakoriságában sem. Azonban, ahogy azt az 1. táblázat is mutatja, a testtömeg index (BMI), a dohányzás gyakorisága, a szisztolés és diasztolés vérnyomás szignifikáns különbséget mutatott a három vizsgálati csoport között. A praeclampsziás csoportban szüléskor szignifikánsan alacsonyabb terhességi kort és születési súlyt észleltünk, mint az egészséges terhesek csoportjában. Az egészséges terheseknél intrauterin növekedési retardáció nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsziás csoportban 16.7%-ban fordult elő. Tizenkilenc terhesnél alakult ki súlyos praeclampszia és 28 betegnél jelentkezett korai terhességi korban (<37. hét).

#### 4.1.2. Laboratóriumi paraméterek

A tanulmányban részt vevők laboratóriumi paramétereit a 2. táblázat tartalmazza. A legtöbb vizsgált laboratóriumi paraméter szignifikáns különbséget mutatott a három vizsgálati csoportban, kivéve a szérumban az aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitást. A szérumban sFlt-1 és PlGF koncentráció, valamint az sFlt-1/PlGF hányados szignifikánsan magasabb volt az egészséges terheseknél, mint a nem terhes nőknél. Praeclampsziás terheseknél szignifikánsan magasabb sFlt-1 szinteket és sFlt-1/PlGF hányadost, illetve szignifikánsan alacsonyabb szérumban PlGF koncentrációkat észleltünk, mint egészséges terheseknél. Továbbá, a praeclampsziás terhesek sFlt-1 és PlGF szérumszintje, valamint sFlt-1/PlGF hányadosa szignifikánsan magasabb volt, mint a nem terhes nőké.

## 1. táblázat

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

	Egészséges nem terhes nők (n=52)	Egészséges terhes nők (n=58)	Praeclampsziás betegek (n=54)
Életkor (év)	28 (25-34)	30 (28-32)	29 (26-33)
BMI vérvételkor (kg/m <sup>2</sup> )	20.9 (19.7-23.3)	25.8 (24.2-28.0) <sup>b</sup>	29.8 (27.4-31.9) <sup>b,d</sup>
Dohányzók	12 (23.1%)	0 (0%) <sup>b</sup>	3 (5.6%) <sup>a</sup>
Primiparák	n.a.	35 (60.3%)	33 (61.1%)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	110 (110-120)	110 (105-120)	160 (153-180) <sup>b,d</sup>
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	80 (70-80)	70 (60-80) <sup>b</sup>	100 (97-110) <sup>b,d</sup>
Terhességi kor a kórkép jelentkezésekor (hét)	n.a.	n.a.	36 (36-38)
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	36 (36-37)	37 (36-39)
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	38 (37-39) <sup>d</sup>
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3450 (3150-3700)	3075 (2450-3450) <sup>d</sup>
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	9 (16.7%) <sup>c</sup>

Az adatokat folyamatos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) adtuk meg

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

<sup>a</sup> p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

<sup>b</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

<sup>c</sup> p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

<sup>d</sup> p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

## 2. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek laboratóriumi paramétereit

	Egészséges nem terhes nők (n=52)	Egészséges terhes nők (n=58)	Praeclampsziás betegek (n=54)
Szérum karbamid szint (mmol/l)	4.3 (3.6-4.8)	2.8 (2.0-3.3) <sup>b</sup>	3.5 (2.7-4.2) <sup>a,c</sup>
Szérum kreatinin szint (μmol/l)	67 (61-72)	49 (42-56) <sup>b</sup>	63 (55-72) <sup>d</sup>
Szérum bilirubin szint (μmol/l)	8.7 (6.6-12.4)	5.4 (4.0-6.8) <sup>b</sup>	7.4 (5.8-9.4) <sup>a,c</sup>
Szérum AST aktivitás (U/l)	17 (15-20)	19 (17-21)	19 (15-24)
Szérum ALT aktivitás (U/l)	15 (12-17)	12 (10-15) <sup>a</sup>	15 (11-19) <sup>c</sup>
Szérum CRP szint (mg/l)	0.7 (0.5-1.9)	3.6 (1.7-6.6) <sup>b</sup>	6.8 (2.8-12.1) <sup>b,c</sup>
Plazma VWF:Ag szint (%)	69.0 (60.2-84.7)	152.6 (112.7-199.0) <sup>b</sup>	183.0 (139.9-235.6) <sup>b,c</sup>
Plazma fibronectin szint (g/l)	n.m.	0.37 (0.31-0.47)	0.56 (0.40-0.82) <sup>d</sup>
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	n.m.	15.36 (8.84-18.61)	18.58 (15.84-20.58) <sup>c</sup>
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/μl)	n.m.	0.002 (0.0-0.172) <sup>†</sup>	0.076 (0.033-0.408) <sup>‡,c</sup>
Szérum sFlt-1 szint (pg/ml)	76.3 (67.1-83.6)	3252 (2509-4751) <sup>b</sup>	6814 (3736-12720) <sup>b,d</sup>
Szérum PlGF szint (pg/ml)	16.2 (14.0-18.0)	183 (126-307) <sup>b</sup>	98.0 (63.7-146) <sup>b,d</sup>
Szérum sFlt-1/PlGF hányados	4.79 (3.82-5.52)	15.6 (8.52-36.6) <sup>b</sup>	70.5 (31.8-144) <sup>b,d</sup>

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

n.m.: nem mérve; AST: aszpartát-aminotranszferáz; ALT: alanin-aminotranszferáz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: dezoxiribonukleinsav; sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentaris növekedési faktor

<sup>†</sup> n=19

<sup>‡</sup> n=30

<sup>a</sup> p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

<sup>b</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

<sup>c</sup> p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

<sup>d</sup> p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

Az als csoport vizsgálatok szerint (3. táblázat) súlyos praeclampsias terhesek sFlt-1 szérumszintjei szignifikánsan magasabbak voltak, mint az enyhe praeclampsiasoké ( $p < 0.05$ ). Azon praeclampsias terheseknél, akiknél a tünetek korán jelentkeztek ( $< 37$ . terhességi hét), vagy akiknél magzati növekedési retardáció is társult a tünetekhez, szignifikánsan alacsonyabb PIGF szérumszinteket mértünk, mint akiknél a fentiek nem voltak észlelhetők ( $p < 0.05$  mindkét esetben).

### 3. táblázat

Az sFlt-1 és PIGF szérumszintjei, valamint az sFlt-1/PIGF hányados a praeclampsias betegek als csoportjaiban

	SzérumsFlt-1 szint (pg/ml)	SzérumsPIGF szint (pg/ml)	SzérumsFlt-1/PIGF hányados
Enyhe praeclampsia (n=35)	<b>6113 (3697-8481)</b>	98.6 (59.3-146)	58.8 (25.6-134)
Súlyos praeclampsia (n=19)	<b>10269 (5267-15420)</b>	96.9 (70.1-146)	100 (54.5-198)
Praeclampsia IUGR nélkül (n=45)	6689 (3736-12611)	<b>98.9 (68.0-146)</b>	68.6 (31.8-128)
Praeclampsia IUGR-val (n=9)	8903 (4857-15847)	<b>70.1 (37.6-104)</b>	144 (54.5-422)
Praeclampsia jelentkezése $\geq 37$ . hét (n=26)	7044 (4498-12720)	<b>116 (91.8-176)</b>	70.5 (32.9-109)
Praeclampsia jelentkezése $< 37$ . hét (n=28)	5631 (3551-11585)	<b>73.3 (41.9-132)</b>	81.6 (24.5-271)

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

A szignifikáns különbségek vastagon szedve

sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PIGF: placentaris növekedési faktor; IUGR: intrauterin növekedési retardáció



#### 4.1.3. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek kapcsolata a szérumban sFlt-1 és PlGF szintekkel

Azt is megvizsgáltuk, hogy a tanulmányban részt vevők klinikai tünetei és laboratóriumi paramétereik miként viszonyulnak a szérumban sFlt-1 és PlGF szintekhez a Spearman-féle rangszám korrelációs eljárást (folyamatos változók esetén) vagy a Mann-Whitney *U*-tesztet (kategorikus változók esetén) használva. Egészséges nem terhes nőknél statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a szérumban PlGF koncentráció és a szisztolés vérnyomás között (Spearman  $R=-0.38$ ,  $p<0.05$ ). Az egészséges terhes nők csoportjában a primiparáknak szignifikánsan magasabb volt a szérumban sFlt-1/PlGF hányadosa, mint a multiparáké (medián (25-75 percentilis): 18.5 (10.5-43.2) versus 13.2 (5.08-24.7),  $p<0.05$ ). Egészséges terhes nők szérumban sFlt-1 szintjei szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a szérumban kreatinin szintekkel ( $R=0.48$ ,  $p<0.05$ ), éppúgy, mint a plazma VWF:Ag ( $R=0.42$ ,  $p<0.05$ ) és fibronectin ( $R=0.50$ ,  $p<0.001$ ) szintekkel. Szignifikáns pozitív korreláció volt megfigyelhető egészséges terhes nők szérumban PlGF szintje és az újszülöttek születési súlya között ( $R=0.30$ ,  $p<0.05$ ), míg a PlGF és CRP koncentrációik fordított arányban álltak egymással ( $R=-0.32$ ,  $p<0.05$ ). Ahogy a 4. táblázat is mutatja, a praeeclampsziás csoportban szignifikáns pozitív korreláció volt a szérumban sFlt-1 szintek és a szisztolés, diasztolés vérnyomás, a karbamid és a kreatinin szérumszintek, valamint a plazma VWF:Ag, fibronectin és szabad magzati DNS szintek között. Továbbá a praeeclampsziás terhesek szérumban PlGF koncentrációi szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a tünetek jelentkezésekor és a szüléskor terheségi kórral, illetve az újszülöttek születési súlyával, ugyanakkor szignifikánsan fordított korrelációban álltak a szérumban karbamid, kreatinin és a plazma fibronectin szintekkel. Más összefüggést a szérumban sFlt-1 és PlGF szintek, valamint a klinikai jellemzők és laboratóriumi paraméterek között egyik vizsgálati csoportban sem találtunk.

## 4. táblázat

Korrelációs együtthatók a praeclampsias betegek klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paramétereit és a szérumban sFlt-1, PIGF szintek, valamint az sFlt-1/PIGF hányados között

	Szérumban sFlt-1 szint	Szérumban PIGF szint	Szérumban sFlt-1/PIGF hányados
Életkor	-0.01	-0.08	0.02
BMI vérvételkor	-0.22	0.28	-0.29
Szisztolés vérnyomás	<b>0.31</b>	-0.23	<b>0.35</b>
Diasztolés vérnyomás	<b>0.35</b>	-0.07	<b>0.30</b>
Terhességi kor a kórkép jelentkezésekor	-0.07	<b>0.30</b>	-0.21
Terhességi kor vérvételkor	-0.07	0.28	-0.18
Terhességi kor szüléskor	-0.25	<b>0.40</b>	<b>-0.36</b>
Újszülött születési súlya	-0.16	<b>0.41</b>	<b>-0.30</b>
Szérumban karbamid szint	<b>0.52</b>	<b>-0.48</b>	<b>0.58</b>
Szérumban kreatinin szint	<b>0.57</b>	<b>-0.30</b>	<b>0.55</b>
Szérumban bilirubin szint	-0.11	0.22	-0.20
Szérumban AST aktivitás	0.27	-0.05	0.21
Szérumban ALT aktivitás	0.24	-0.01	0.19
Szérumban CRP szint	-0.25	0.09	-0.22
Plazma VWF:Ag szint	<b>0.46</b>	-0.10	<b>0.35</b>
Plazma fibronectin szint	<b>0.61</b>	<b>-0.30</b>	<b>0.55</b>
Plazma malondialdehid szint	0.02	-0.09	0.01
Plazma szabad magzati DNS szint	<b>0.47</b>	-0.29	<b>0.45</b>

A szignifikáns korrelációk vastagon szedve

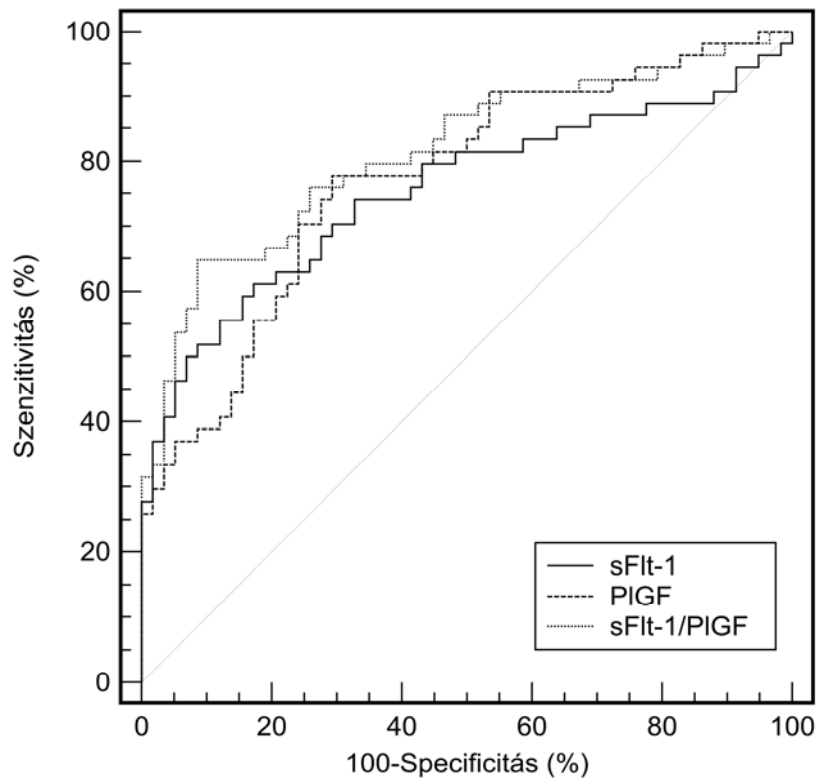
sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PIGF: placentaris növekedési faktor; BMI: testtömeg index; AST: aszpartát-aminotranszferáz; ALT: alanin-aminotranszferáz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: dezoxiribonukleinsav

#### 4.1.4. A szérumban sFlt-1 és PIGF mérések diagnosztikus pontossága praeclampsiasban

A Receiver Operating Characteristic (ROC) analízist használva meghatároztuk az sFlt-1 és a PIGF koncentrációk és hányadosuk cut-off értékeit a praeclampsias

terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Ezen cut-off pontok szenzitivitása és specificitása a következő volt: magas sFlt-1 szint ( $>4165$  pg/ml): 74.1% és 67.2%, alacsony PlGF szint ( $<146$  pg/ml): 77.8% és 70.7%, illetve magas sFlt-1/PlGF hányados ( $>31.2$ ): 75.9% és 74.1%.

Ezt követően összehasonlítottuk a szérumban sFlt-1 és PlGF koncentrációk és hányadosuk diagnosztikus értékét praeeclampsziában. Ahogy az 5. ábra is mutatja, az sFlt-1/PlGF hányados ROC görbéje alatti terület szignifikánsan nagyobb volt, mint az sFlt-1 és PlGF szintek esetében (AUC 95%-os konfidencia intervallummal az sFlt-1/PlGF hányados, sFlt-1 és PlGF szintek esetén sorra: 0.81 (0.73-0.88) versus 0.75 (0.66-0.83) és 0.77 (0.68-0.85);  $p < 0.05$  mindkét összehasonlításban).



5. ábra

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

## **4.2. A szérum citokin profil vizsgálata szövődménymentes terhességben és praeclampsiában**

### **4.2.1. A betegek klinikai jellemzői**

A tanulmány résztvevőinek klinikai jellemzőit az 5. táblázat tartalmazza. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a tanulmányban részt vevő csoportok életkorát illetően. Továbbá nem találtunk szignifikáns különbséget a praeclampsiás és egészséges terhes nők között a vérvételkori terhességi korban és a primiparák előfordulási gyakoriságában sem. Azonban, a vizsgálati csoportok 5. táblázatban szereplő összes többi klinikai jellemzője között szignifikáns eltérés mutatkozott. A magzati növekedési retardáció egészséges terhes nőknél nem volt megfigyelhető, míg a praeclampsiás csoportban 18.3%-ban fordult elő. Huszonegy terhesnél alakult ki súlyos praeclampsia és 5 betegnél a kórkép korai jelentkezését (<34. hét) észleltük.

### **4.2.2. Laboratóriumi paraméterek**

A vizsgálatban részt vevők laboratóriumi eredményeit a 6. táblázat szemlélteti. Látható, hogy a szérum aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitás kivételével a többi vizsgált paraméter a három tanulmányban részt vevő csoport között szignifikáns különbséget mutatott. A keringésben található citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák koncentrációit a 7. táblázat mutatja. Az IL-1 $\beta$  és a TGF- $\beta$ 1 szérumszintjeitől eltekintve vizsgálati csoportjaink között az összes mért gyulladáshoz kapcsolódó paraméterben szignifikáns különbség adódott.

## 5. táblázat

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

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (n=60)
Életkor (év)	28 (23-35)	30 (28-32)	29 (26-32)
BMI vérvételkor (kg/m <sup>2</sup> )	20.8 (19.6-22.9)	25.8 (24.3-27.9) <sup>b</sup>	29.9 (26.9-33.3) <sup>b,d</sup>
Dohányzók	14 (23.7%)	0 (0%) <sup>b</sup>	3 (5.0%) <sup>a</sup>
Primiparák	n.a.	37 (61.7%)	38 (63.3%)
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	115 (110-120)	110 (107-120)	162 (155-180) <sup>b,d</sup>
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	80 (70-80)	70 (60-80) <sup>b</sup>	100 (97-110) <sup>b,d</sup>
Terhességi kor vérvételkor (hét)	n.a.	36 (36-37)	37 (36-39)
Terhességi kor szüléskor (hét)	n.a.	39 (38-40)	38 (37-39) <sup>d</sup>
Újszülött születési súlya (gramm)	n.a.	3450 (3150-3700)	3125 (2450-3475) <sup>d</sup>
Intrauterin növekedési retardáció	n.a.	0 (0%)	11 (18.3%) <sup>d</sup>

Az adatokat folyamatos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) adtuk meg  
n.a.: nem alkalmazható; BMI: testtömeg index

<sup>a</sup> p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

<sup>b</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

<sup>c</sup> p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

<sup>d</sup> p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

## 6. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek laboratóriumi paramétereit

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (n=60)
Szérum karbamid szint (mmol/l)	4.1 (3.5-4.8)	2.8 (2.0-3.3) <sup>b</sup>	3.5 (2.7-4.2) <sup>a,c</sup>
Szérum kreatinin szint (μmol/l)	66 (61-72)	49 (42-56) <sup>b</sup>	63 (55-71) <sup>d</sup>
Szérum bilirubin szint (μmol/l)	9.3 (6.6-12.4)	5.4 (4.0-6.8) <sup>b</sup>	7.3 (5.7-8.9) <sup>a,c</sup>
Szérum AST aktivitás (U/l)	17 (15-20)	19 (17-21)	19 (15-25)
Szérum ALT aktivitás (U/l)	14 (12-17)	12 (10-15) <sup>a</sup>	16 (11-23) <sup>c</sup>
Szérum LDH aktivitás (U/l)	154 (128-170)	158 (138-169)	192 (153-225) <sup>b,d</sup>
Szérum CRP szint (mg/l)	0.7 (0.5-1.8)	3.6 (1.7-6.6) <sup>b</sup>	6.8 (2.7-12.1) <sup>b,c</sup>
Plazma VWF:Ag szint (%)	70.0 (60.2-87.3)	152.6 (112.7-199.0) <sup>b</sup>	184.8 (139.9-243.1) <sup>b,c</sup>
Plazma fibronectin szint (g/l)	n.m.	0.37 (0.31-0.47)	0.58 (0.41-0.82) <sup>d</sup>
Plazma malondialdehid szint (nmol/ml)	n.m.	15.4 (8.8-18.6)	18.3 (15.6-20.4) <sup>c</sup>
Plazma szabad magzati DNS szint (pg/μl)	n.m.	0.002 (0.0-0.172) <sup>†</sup>	0.082 (0.033-0.292) <sup>‡,c</sup>

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

n.m.: nem mérve; AST: aszpartát-aminotranszferáz; ALT: alanin-aminotranszferáz; LDH: laktát-dehidrogenáz; CRP: C-reaktív protein; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; DNS: dezoxiribonukleinsav

<sup>†</sup> n=19

<sup>‡</sup> n=33

<sup>a</sup> p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

<sup>b</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

<sup>c</sup> p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

<sup>d</sup> p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

## 7. táblázat

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek szérumban citokin, kemokin és adhéziós molekula koncentrációi (pg/ml)

	Egészséges nem terhes nők (n=59)	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (n=60)
IL-1 $\beta$	24.5 (23.0-28.0)	27.0 (23.0-31.5)	28.0 (23.0-34.0)
IL-1ra	8.0 (6.7-11.0)	6.0 (5.0-7.0) <sup>b</sup>	18.0 (11.0-27.5) <sup>b,d</sup>
IL-2	5.0 (4.2-6.0)	4.0 (4.0-5.0) <sup>a</sup>	7.5 (5.5-12.0) <sup>b,d</sup>
IL-4	3.0 (2.0-3.0)	2.0 (2.0-2.0) <sup>b</sup>	3.0 (3.0-4.0) <sup>b,d</sup>
IL-6	6.0 (5.0-8.0)	7.0 (5.0-9.0)	15.5 (12.0-32.0) <sup>b,d</sup>
IL-8	23.0 (18.2-37.5)	24.5 (16.0-68.5)	78.0 (35.0-273) <sup>b,d</sup>
IL-10	43.7 (32.7-60.5)	15.7 (14.0-19.0) <sup>b</sup>	23.0 (18.0-35.0) <sup>b,d</sup>
IL-12p40	119 (109-140)	136 (118-168) <sup>a</sup>	185 (153-215) <sup>b,d</sup>
IL-12p70	12.0 (9.0-15.0)	5.0 (4.0-5.0) <sup>b</sup>	6.0 (5.0-8.0) <sup>b,d</sup>
IL-18	38.7 (33.0-46.5)	56.0 (44.0-73.7) <sup>b</sup>	73.5 (55.0-87.0) <sup>b,c</sup>
IFN- $\gamma$	4.0 (3.0-4.0)	3.0 (2.0-3.0) <sup>b</sup>	5.0 (4.0-6.0) <sup>b,d</sup>
TNF- $\alpha$	2.0 (2.0-3.0)	2.0 (1.0-2.0) <sup>a</sup>	2.0 (2.0-3.0) <sup>d</sup>
TGF- $\beta$ 1	342 (285-388)	364 (307-413)	383 (331-418)
IP-10	198 (142-327)	327 (222-442) <sup>b</sup>	688 (434-928) <sup>b,d</sup>
MCP-1	153 (87.5-233)	79.5 (52.5-110) <sup>b</sup>	189 (120-283) <sup>d</sup>
ICAM-1	6638 (6143-7205)	6789 (6201-7672)	8132 (7413-8808) <sup>b,d</sup>
VCAM-1	6151 (5767-6564)	6157 (5633-6617)	7386 (6913-7709) <sup>b,d</sup>

Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

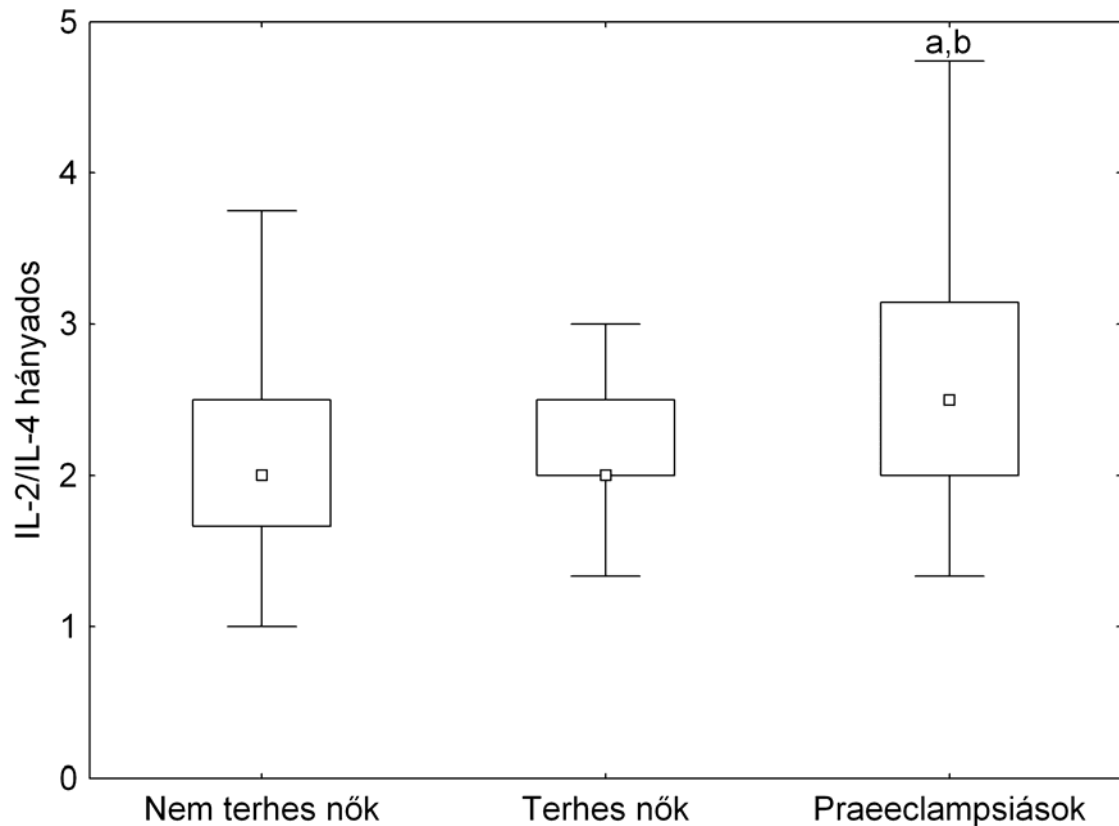
IL: interleukin; IL-1ra: IL-1 receptor antagonist; IFN: interferon; TNF: tumor nekrozis faktor; TGF: transzformáló növekedési faktor; IP: interferon- $\gamma$ -indukált protein; MCP: monocyta kemotaktikus protein; ICAM: intercellularis adhéziós molekula; VCAM: vascularis sejtadhéziós molekula

<sup>a</sup> p<0.05 versus egészséges nem terhes nők

<sup>b</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

<sup>c</sup> p<0.05 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők

<sup>d</sup> p<0.001 praeclampsziás betegek versus egészséges terhes nők



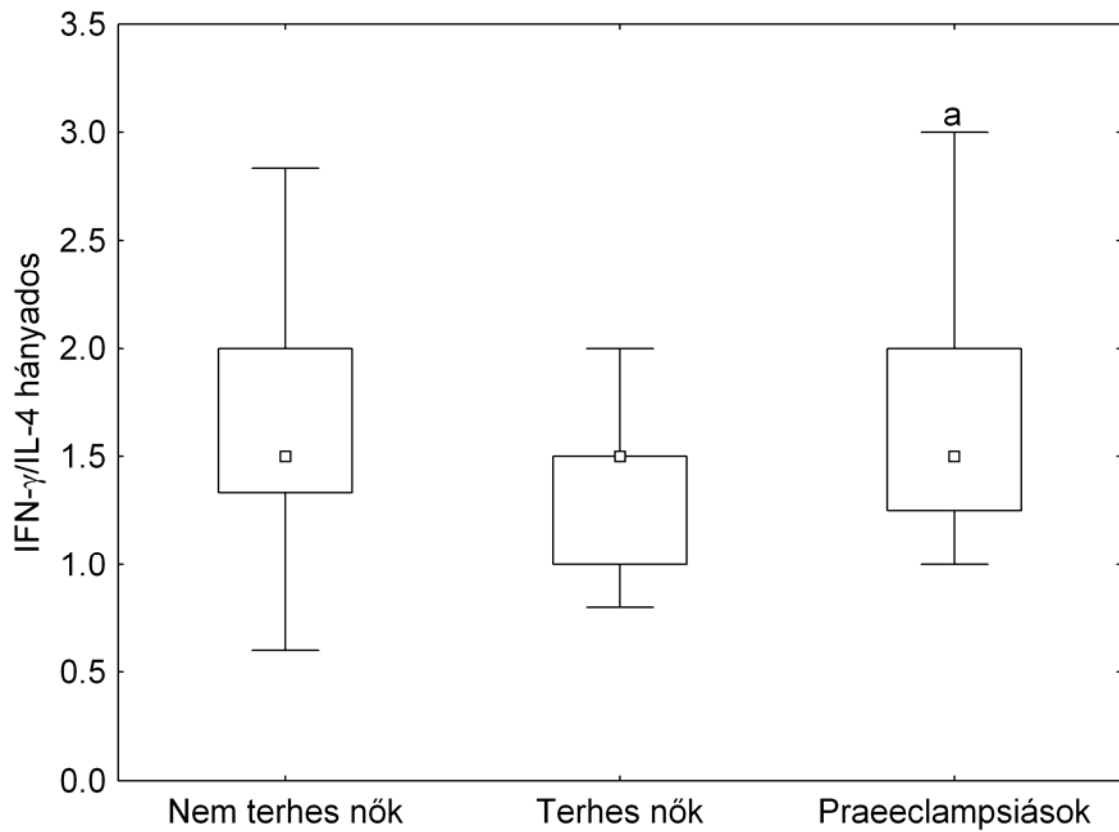
6. ábra

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

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

Az IL-2 és IL-4, valamint az IFN- $\gamma$  és IL-4 hányadosai egészséges nem terhes és terhes nők között nem mutattak szignifikáns eltérést, azonban ugyanezen arányok praeclampsiás betegekben egészséges terhes nőkhöz képest szignifikánsan emelkedtek (6. és 7. ábra). Éppen ellenkezőleg, az IL-18/IL-12p70 hányados szignifikánsan magasabb, míg az IL-12p70/IL-12p40 arány szignifikánsan alacsonyabb volt egészséges terhesekben nem terhes nőkhöz viszonyítva, ugyanakkor praeclampsiás és egészséges terhesek között nem mutattak szignifikáns különbséget (8. és 9. ábra).

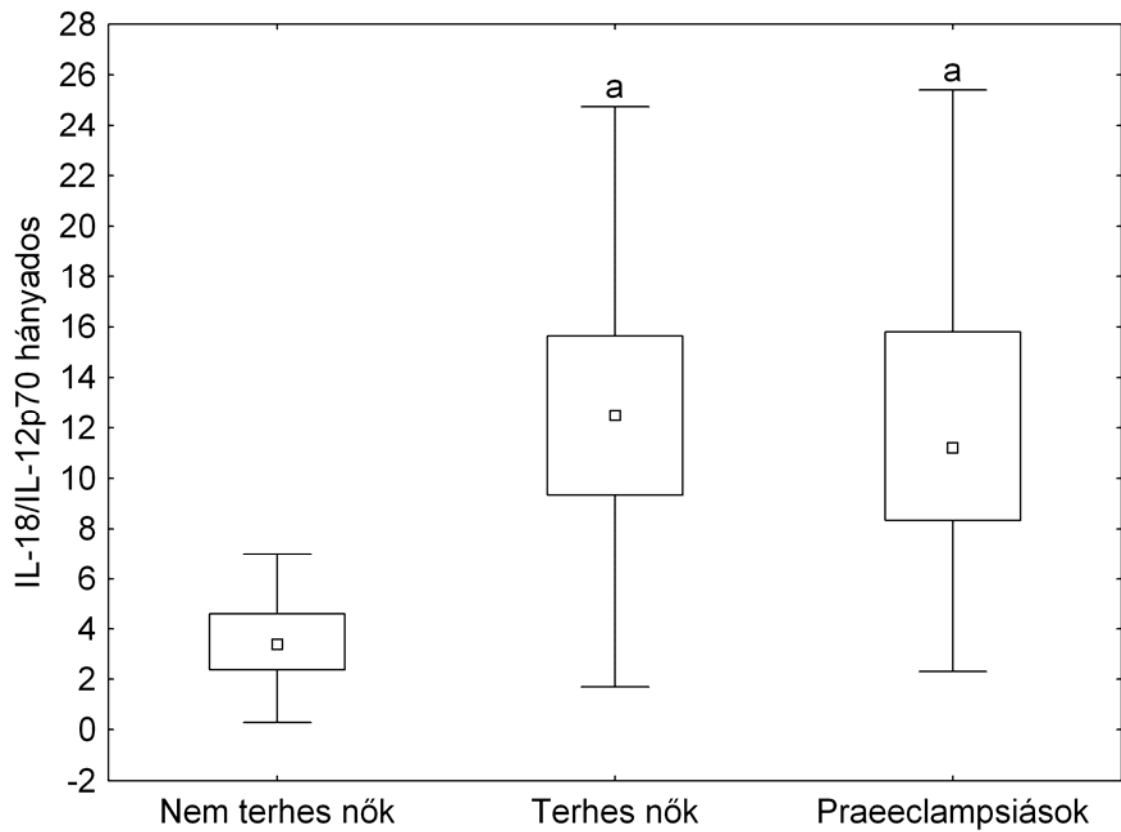




7. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek IFN(interferon)- $\gamma$ /IL(interleukin)-4 hányadosa

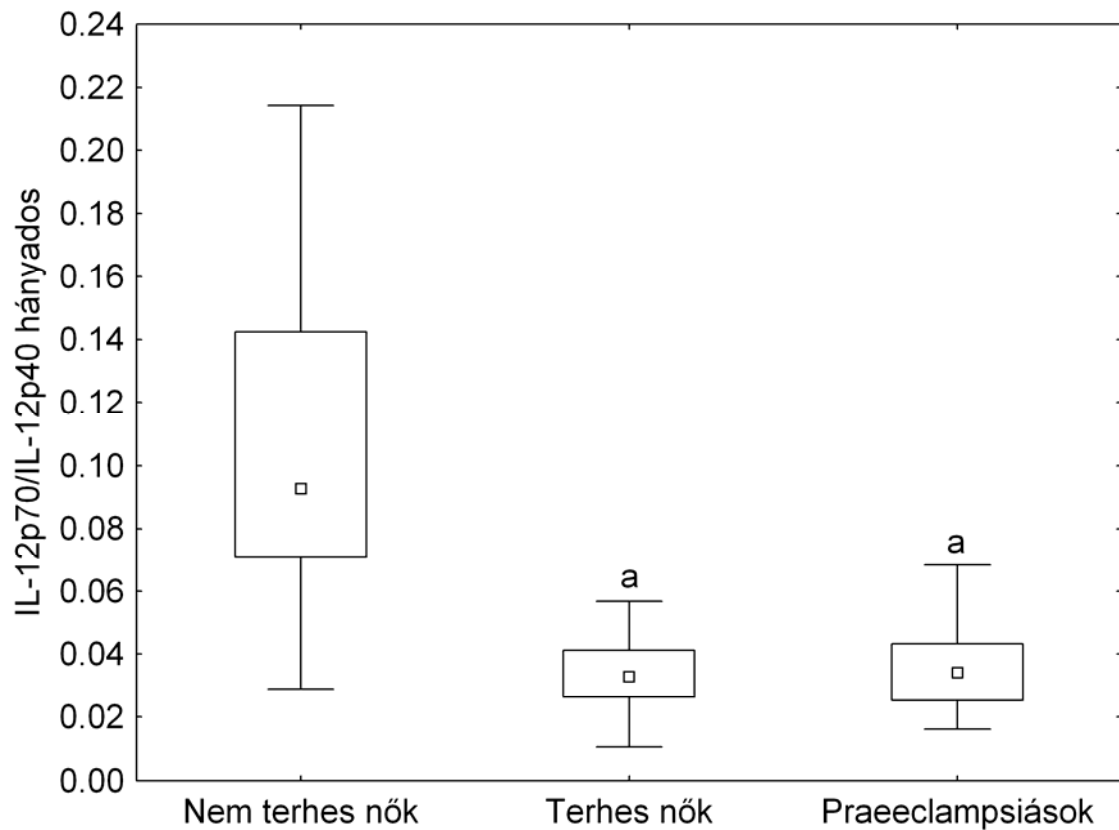
Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva); <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus egészséges terhes nők



8. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek IL(interleukin)-18/IL-12p70 hányadosa

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva); <sup>a</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők



9. ábra

Egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsziás betegek IL(interleukin)-12p70/IL-12p40 hányadosa

Középső pont: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva); <sup>a</sup> p<0.001 versus egészséges nem terhes nők

A praeclampsziás csoporton belül a vizsgált citokinek, kemokinek és adhézziós molekulák szérumszintjeiben nem találtunk szignifikáns különbséget sem az enyhe és súlyos praeclampsziások, sem a korai és késői kezdetű alcsoportok, sem pedig a magzati retardációval társuló illetve anélküli esetek között.

#### **4.2.3. A citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák szérumszintjeinek kapcsolata a tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőivel és laboratóriumi paramétereivel**

Azt is megvizsgáltuk, hogy a citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák szérumszintjei miként viszonyulnak a tanulmányban részt vevők klinikai jellemzőihez és laboratóriumi paramétereikhez a Spearman-féle rangszám korrelációs eljárást (folyamatos változók esetén) vagy a Mann-Whitney *U*-tesztet (kategorikus változók esetén) használva. Egészséges nem terhes nőknél a szérum IL-6 és TNF- $\alpha$  koncentrációk szignifikánsan korreláltak a CRP szintekkel (Spearman  $R=0.28$  és  $0.29$ ,  $p<0.05$ ). Az egészséges terhes nők csoportjában statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk az IL-2 és IFN- $\gamma$  koncentrációk, valamint a szüléskori terhességi kor között ( $R=-0.27$  és  $-0.29$ ,  $p<0.05$ ). Egészséges terhesek IL-6 és CRP szintjei között szignifikánsan pozitív korreláció ( $R=0.45$ ,  $p<0.05$ ), míg TGF- $\beta 1$  és malondialdehid koncentrációik között fordított arányosság volt megfigyelhető ( $R=-0.38$ ,  $p<0.05$ ). Egészséges terhes nők szérum IP-10 szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a szérum kreatinin ( $R=0.53$ ,  $p<0.05$ ), valamint a plazma VWF:Ag ( $R=0.54$ ,  $p<0.001$ ) és fibronectin ( $R=0.42$ ,  $p<0.05$ ) koncentrációkkal, míg a születési súllyal fordított arányban állt ( $R=-0.38$ ,  $p<0.05$ ). Továbbá ugyanezen csoport szérum MCP-1 koncentrációja és szérum kreatinin ( $R=0.39$ ,  $p<0.05$ ), illetve plazma fibronectin ( $R=0.48$ ,  $p<0.001$ ) szintjei között szintúgy pozitív korreláció adódott. A praeeclampsias betegek gyulladáshoz kapcsolódó változói és klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paramétereik közötti szignifikáns összefüggéseket a 8. táblázat szemlélteti. A tanulmányban részt vevők szérum citokin, kemokin és adhéziós molekula koncentrációi, valamint a klinikai jellemzők és laboratóriumi paraméterek között nem volt egyik vizsgálati csoport esetében sem további összefüggés megfigyelhető.

## 8. táblázat

A praeclampsias betegek szérumban citokin, kemokin és adhéziós molekula koncentrációi és klinikai jellemzői, valamint laboratóriumi paramétereik közötti szignifikáns korrelációk

	Korrelációs együttható	Statisztikai szignifikancia (p érték)
IP-10 & karbamid szint	0.26	<0.05
IP-10 & kreatinin szint	0.43	<0.05
IP-10 & AST aktivitás	0.46	<0.001
IP-10 & ALT aktivitás	0.38	<0.05
IP-10 & LDH aktivitás	0.38	<0.05
IP-10 & VWF:Ag szint	0.35	<0.05
IP-10 & fibronectin szint	0.37	<0.05
MCP-1 & szisztolés vérnyomás	0.27	<0.05
MCP-1 & CRP szint	0.27	<0.05
MCP-1 & malondialdehid szint	0.27	<0.05
ICAM-1 & bilirubin szint	0.32	<0.05
ICAM-1 & AST aktivitás	0.32	<0.05
ICAM-1 & LDH aktivitás	0.37	<0.05
ICAM-1 & CRP szint	0.30	<0.05
ICAM-1 & malondialdehid szint	0.31	<0.05
VCAM-1 & karbamid szint	0.30	<0.05
VCAM-1 & kreatinin szint	0.44	<0.001
VCAM-1 & AST aktivitás	0.40	<0.05
VCAM-1 & LDH aktivitás	0.56	<0.001
VCAM-1 & fibronectin szint	0.41	<0.05

IP: interferon- $\gamma$ -indukált protein; AST: aszpartát-aminotranszferáz; ALT: alanin-aminotranszferáz; LDH: laktát-dehidrogenáz; VWF:Ag: von Willebrand faktor antigén; MCP: monocyta kemotaktikus protein; CRP: C-reaktív protein; ICAM: intercellularis adhéziós molekula; VCAM: vascularis sejtadhéziós molekula

### **4.3. A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérum szintjének összefüggése praeeclampsziás nők keringésében található citokinekkal, kemokinekkal, adhéziós molekulákkal és angiogén faktorokkal**

#### **4.3.1. A betegek klinikai jellemzői**

A beteganyag a 4.2. pontban ismertetett tanulmány egészséges terhes és praeeclampsziás csoportjával azonos. A vizsgálat résztvevőinek klinikai jellemzőit a 9. táblázat szemlélteti. A két vizsgálati csoport között nem volt szignifikáns különbség az anyai életkort és a vérvételkori terhességi kort, valamint a dohányzás és a primiparitás előfordulási gyakoriságát illetően. A praeeclampsziás csoportban a kontrollcsoporthoz képest a testtömeg index (BMI), a szisztolés és a diasztolés vérnyomás szignifikánsan magasabb, míg a szüléskori terhességi kor és a születési súly szignifikánsan alacsonyabb volt. Intrauterin növekedési retardáció nem volt megfigyelhető az egészséges terhesek között, míg a praeeclampsziások körében 18.3%-ban fordult elő. Huszonegy terhesnél alakult ki súlyos praeeclampszia és 5 betegnél észleltük a kórkép korai jelentkezését (<34. hét).

#### **4.3.2 Laboratóriumi paraméterek**

A vizsgálatban részt vevők laboratóriumi paramétereit a 10. táblázat tartalmazza. A Hsp70 szérum szintjei praeeclampsziás betegeknél szignifikánsan magasabbak voltak, mint az egészséges terhes nők esetében. Ahogy a táblázat is mutatja, a legtöbb mért gyulladási paraméter szignifikáns különbséget mutatott a két vizsgálati csoport között, kivéve a szérum IL-1 $\beta$  és TGF- $\beta$ 1 szinteket, valamint az IL-18/IL-12p70 és az IL-12p70/IL-12p40 hányadosokat. Praeeclampsziás betegeknél szignifikánsan magasabb sFlt-1 szinteket és sFlt-1/PlGF hányadosokat, valamint szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációkat figyeltünk meg, mint egészséges terhes nőknél.

## 9. táblázat

Egészséges terhes nők és praeclampsziás betegek klinikai jellemzői

	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsziás betegek (n=60)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Életkor (év)	30 (28-32)	29 (26-32)	NS
BMI vérvételkor (kg/m <sup>2</sup> )	25.8 (24.3-27.9)	29.9 (26.9-33.3)	<0.001
Dohányzás	0 (0%)	3 (5.0%)	NS
Primiparitas	37 (61.7%)	38 (63.3%)	NS
Szisztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	110 (107-120)	162 (155-180)	<0.001
Diasztolés vérnyomás vérvételkor (Hgmm)	70 (60-80)	100 (97-110)	<0.001
Terhességi kor vérvételkor (hét)	36 (36-37)	37 (36-39)	NS
Terhességi kor szüléskor (hét)	39 (38-40)	38 (37-39)	<0.001
Születési súly (gramm)	3450 (3150-3700)	3125 (2450-3475)	<0.001
Intrauterin növekedési retardáció	0 (0%)	11 (18.3%)	<0.001

Az adatokat folyamatos változók esetén mediánként (25-75 percentilis), míg kategorikus változók esetén abszolút számként (százalék) adtuk meg

NS: nem szignifikáns; BMI: testtömeg index

## 10. táblázat

A 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (ng/ml), citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák és angiogén faktorok (pg/ml) szérumszintjei, valamint hányadosaik egészséges terhes nőknél és praeclampsiás terheseknél

	Egészséges terhes nők (n=60)	Praeclampsiás betegek (n=60)	Statisztikai szignifikancia (p érték)
Hsp70	0.28 (0.21-0.31)	0.58 (0.39-0.81)	<0.001
IL-1 $\beta$	27.0 (23.0-31.5)	28.0 (23.0-34.0)	NS
IL-1ra	6.0 (5.0-7.0)	18.0 (11.0-27.5)	<0.001
IL-2	4.0 (4.0-5.0)	7.5 (5.5-12.0)	<0.001
IL-4	2.0 (2.0-2.0)	3.0 (3.0-4.0)	<0.001
IL-6	7.0 (5.0-9.0)	15.5 (12.0-32.0)	<0.001
IL-8	24.5 (16.0-68.5)	78.0 (35.0-273)	<0.001
IL-10	15.7 (14.0-19.0)	23.0 (18.0-35.0)	<0.001
IL-12p40	136 (118-168)	185 (153-215)	<0.001
IL-12p70	5.0 (4.0-5.0)	6.0 (5.0-8.0)	<0.001
IL-18	56.0 (44.0-73.7)	73.5 (55.0-87.0)	<0.05
IFN- $\gamma$	3.0 (2.0-3.0)	5.0 (4.0-6.0)	<0.001
TNF- $\alpha$	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (2.0-3.0)	<0.001
TGF- $\beta$ 1	364 (307-413)	383 (331-418)	NS
IP-10	327 (222-442)	688 (434-928)	<0.001
MCP-1	79.5 (52.5-110)	189 (120-283)	<0.001
ICAM-1	6789 (6201-7672)	8132 (7413-8808)	<0.001
VCAM-1	6157 (5633-6617)	7386 (6913-7709)	<0.001
IL-2/IL-4	2.0 (2.0-2.5)	2.5 (2.0-3.14)	<0.05
IFN- $\gamma$ /IL-4	1.5 (1.0-1.5)	1.5 (1.25-2.0)	<0.05
IL-18/IL-12p70	12.5 (9.3-15.6)	11.2 (8.3-15.8)	NS
IL-12p70/IL-12p40	0.033 (0.026-0.041)	0.034 (0.025-0.043)	NS
sFlt-1	3252 (2509-4751) <sup>a</sup>	6814 (3736-12720) <sup>b</sup>	<0.001
PlGF	183 (126-307) <sup>a</sup>	98.0 (63.7-146) <sup>b</sup>	<0.001
sFlt-1/PlGF	15.6 (8.52-36.6) <sup>a</sup>	70.5 (31.8-144) <sup>b</sup>	<0.001

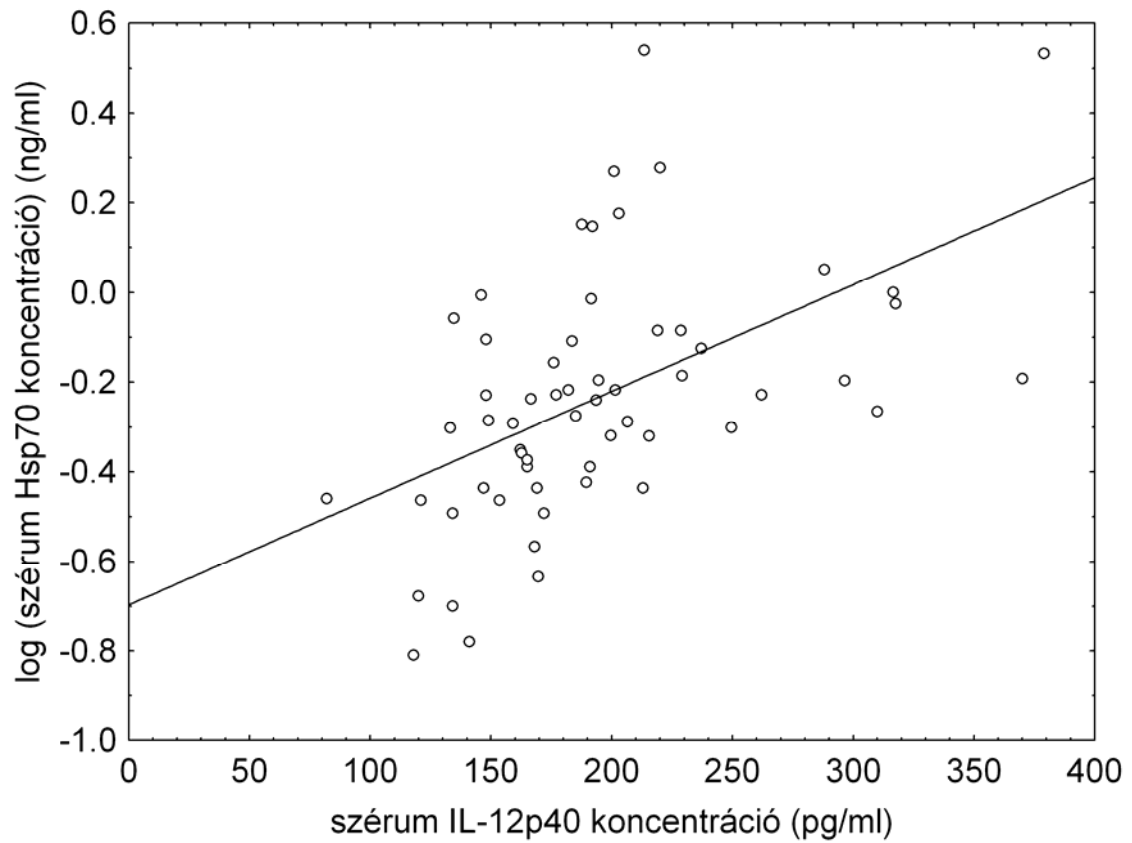
Az adatok mediánként (25-75 percentilis) vannak megadva

Hsp70: 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje; IL: interleukin; IL-1ra: IL-1 receptor antagonist; IFN: interferon; TNF: tumor nekrozis faktor; TGF: transzformáló növekedési faktor; IP: interferon- $\gamma$ -indukált protein; MCP: monocyta kemotaktikus protein; ICAM: intercellularis adhéziós molekula; VCAM: vascularis sejtadhéziós molekula; sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1; PlGF: placentaris növekedési faktor; <sup>a</sup> n=58; <sup>b</sup> n=54



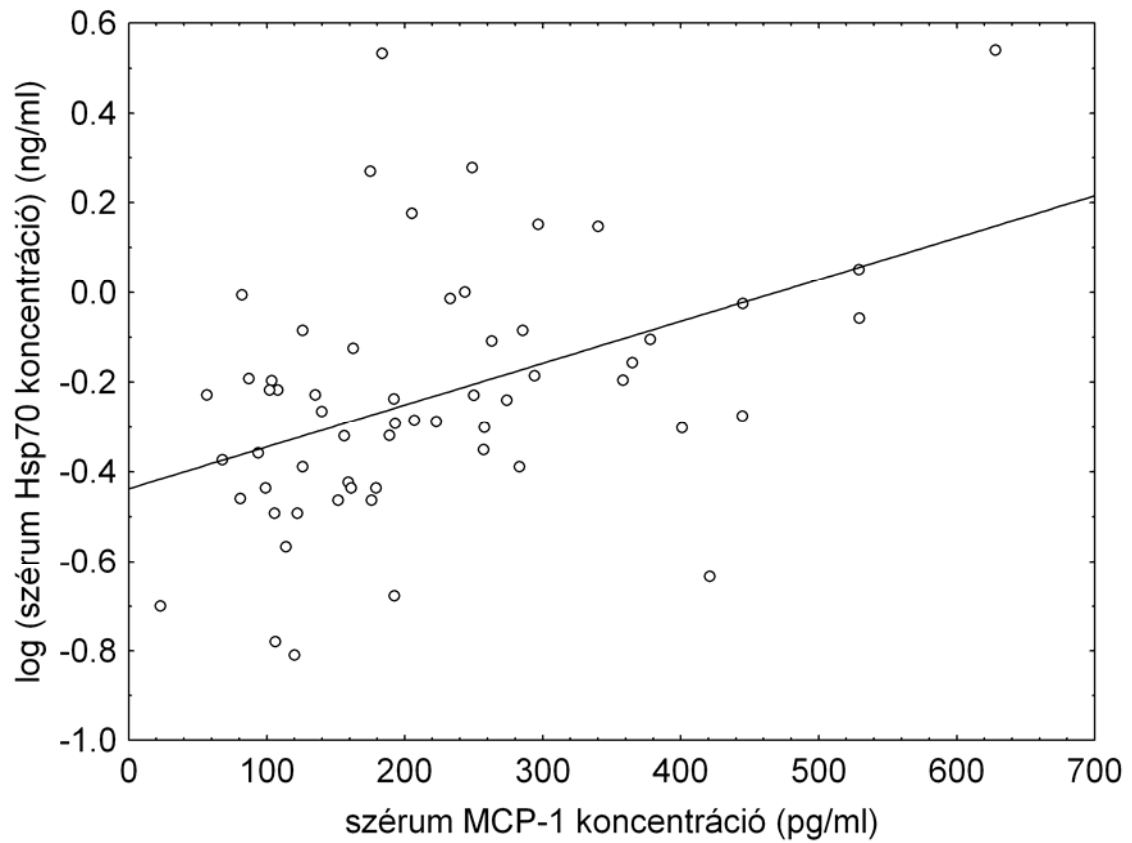
### **4.3.3 Praeclampsziás betegek szérumban Hsp70 szintjeinek viszonya a keringésben lévő citokinekhez, kemokinekhez, adhéziós molekulákhoz és angiogén faktorokhoz**

Megvizsgáltuk, hogy a szérumban Hsp70 szintek miként viszonyulnak a citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák és angiogén faktorok keringésben mért koncentrációihoz a Spearman-féle rangszám korrelációs eljárást használva. A praecclampsziás csoportban a szérumban Hsp70 szintek szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a szérumban IL-12p40 ( $R=0.59$ ,  $p<0.001$ ), MCP-1 ( $R=0.43$ ,  $p<0.001$ ), ICAM-1 ( $R=0.39$ ,  $p=0.0020$ ) és VCAM-1 ( $R=0.46$ ,  $p<0.001$ ) koncentrációkkal. Az összefüggések szignifikánsak maradtak az életkorra és a vérvételkori terhességi korra többszörös lineáris regressziós analízissel történő illesztést követően is (standardizált regressziós együttható ( $\beta$ ), IL-12p40:  $0.52$ ,  $p<0.001$ ; MCP-1:  $0.45$ ,  $p<0.001$ ; ICAM-1:  $0.45$ ,  $p<0.001$ ; VCAM-1:  $0.42$ ,  $p=0.0022$ ). Más összefüggést a szérumban Hsp70 szintek és a mért laboratóriumi paraméterek között egyik vizsgálati csoportban sem találtunk. A Hsp70 és a gyulladásos molekulák szérumszintjei között praecclampsziás terheseknél megfigyelt szignifikáns korrelációkat szórás diagram formájában az 10-13. ábra szemlélteti.



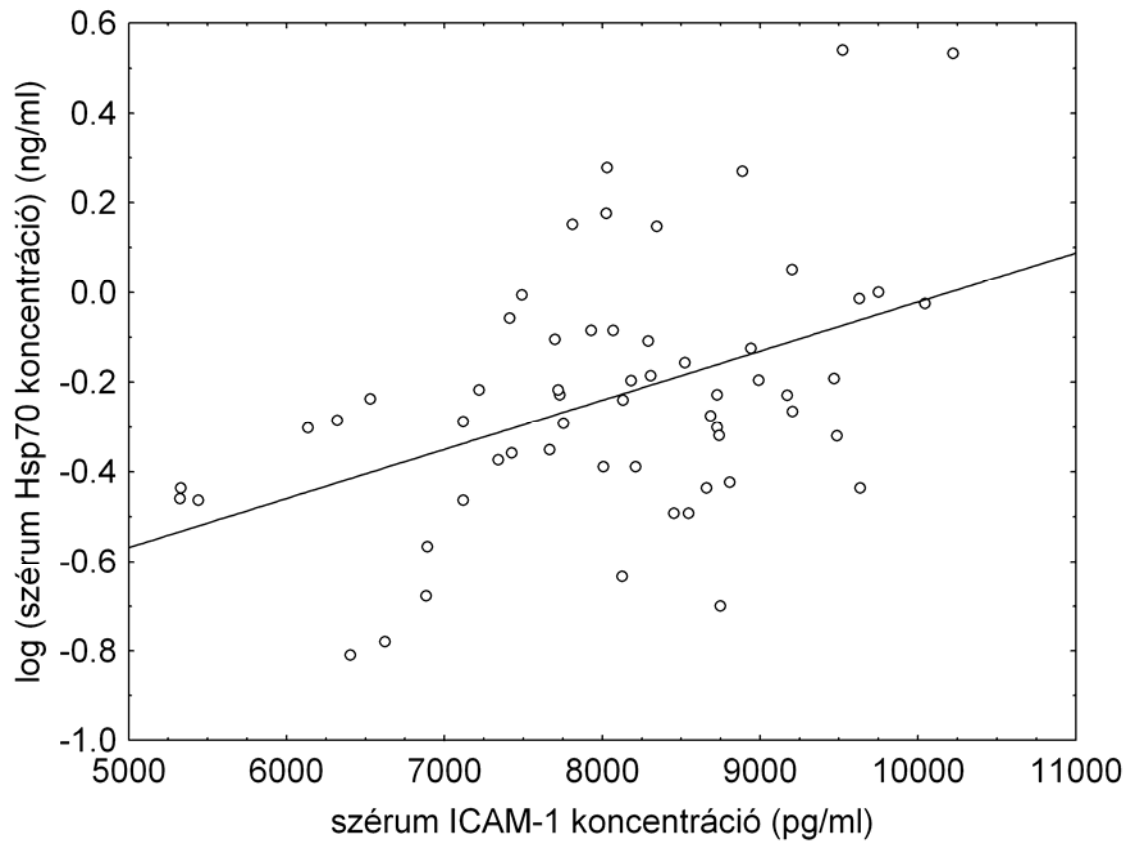
10. ábra

Praeclampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70) szérumkoncentrációja (logaritmikus értékek) az interleukin (IL)-12p40 szérumszintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével ( $R=0.59$ ,  $p<0.001$ )



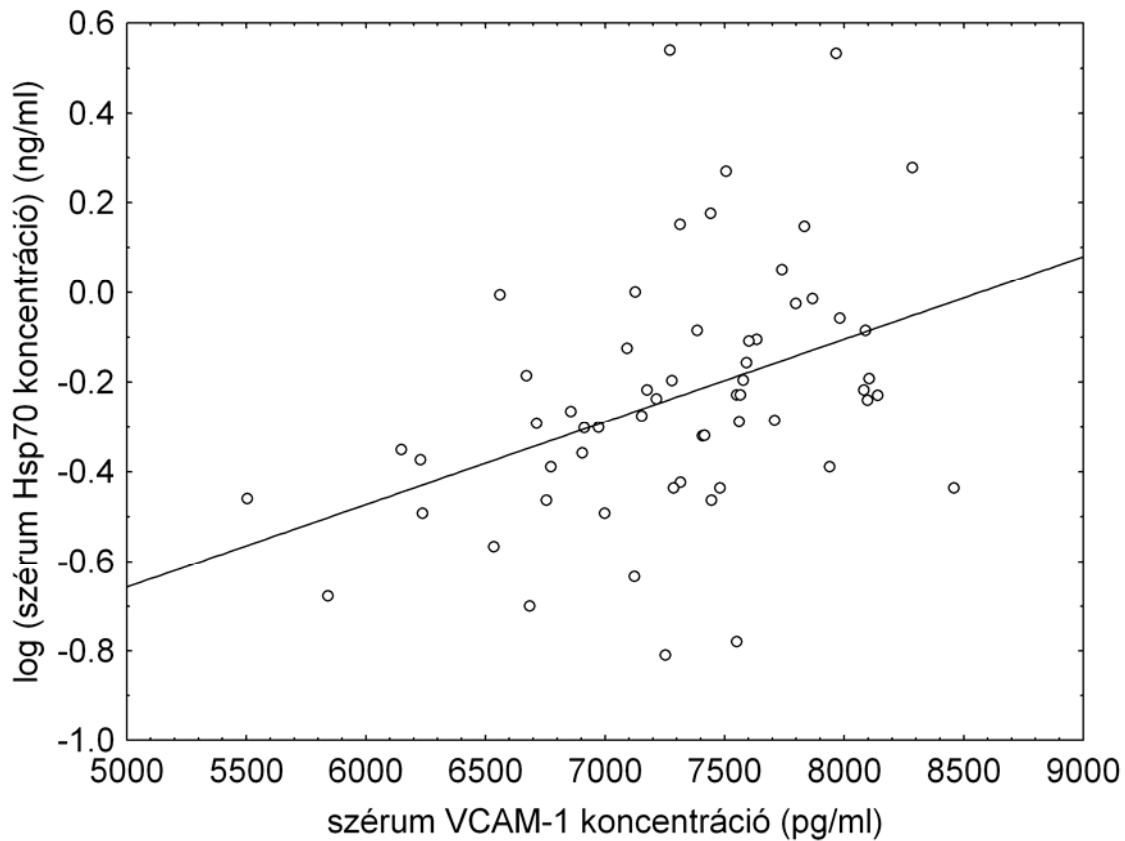
11. ábra

Praeclampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje (Hsp70) szérumkoncentrációja (logaritmikusk értékek) a monocyta kemotaktikus protein (MCP)-1 szérumszintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével ( $R=0.43$ ,  $p<0.001$ )



12. ábra

Praeclampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70) szérumkoncentrációja (logaritmikus értékek) az intercellularis adhéziós molekula (ICAM)-1 szérum szintek függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével ( $R=0.39$ ,  $p=0.0020$ )

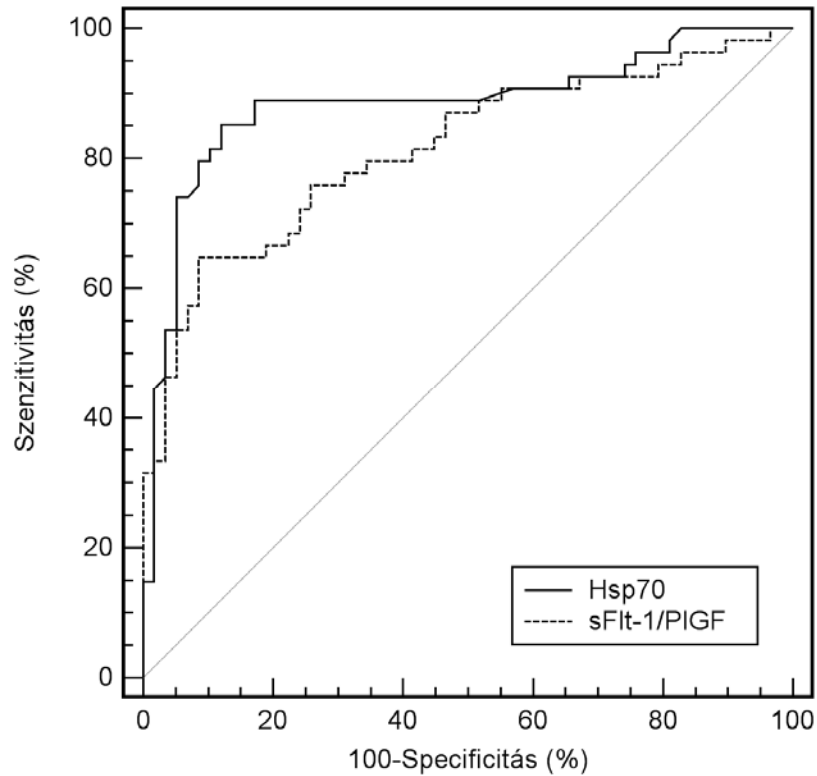


13. ábra

Praeclampsziás terhesek 70 kDa molekulatömegű hőszokkfehérje (Hsp70) szérumszintje (logaritmusos értékek) a vasculáris sejtadhéziós molekula (VCAM)-1 szérumszintjének függvényében szórás diagramon ábrázolva, lineáris illesztéssel és a regressziós egyenes feltüntetésével ( $R=0.46$ ,  $p<0.001$ )

A Receiver Operating Characteristic (ROC) analízist használva (14. ábra) meghatároztuk a szérumszintű Hsp70 koncentrációját ( $>0.34$  ng/ml; szenzitivitás: 86.7%, specificitás: 86.7%) és az sFlt-1/PIGF hányadosát ( $>31.2$ ; szenzitivitás: 75.9%, specificitás: 74.1%) cut-off értékeit a praeclampsziás terhesek elkülönítésére az egészséges terhesektől. Azon terhes nőknek, akiknek mind a szérumszintű Hsp70 szintje, mind az sFlt-1/PIGF hányadosa emelkedett volt, lényegesen nagyobb esélye volt praeclampsziára, mint azoknak, akiknek csak vagy a Hsp70 koncentrációja, vagy az sFlt-1/PIGF hányadosa volt emelkedett (OR (95% CI) rendre: 72.4 (17.4-300),  $p<0.001$  versus 8.14 (1.82-36.5),  $p<0.05$  és 0.42 (0.05-3.72),  $p>0.05$ ), még az életkorra és a

vérvételtkorai terhességi korra többszörös logisztikus regressziós analízissel történő illesztést követően is (adjusztált OR (95% CI) rendre: 82.6 (17.9-381),  $p < 0.001$  versus 7.80 (1.53-39.7),  $p < 0.05$  és 0.38 (0.04-3.44),  $p > 0.05$ ).



14. ábra

A szérum 70 kDa molekulatömegű hősokkfehérje koncentráció (Hsp70, folyamos vonal) és szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1/placentaris növekedési faktor hányados (sFlt-1/PIGF, szaggatott vonal) Receiver Operating Characteristic (ROC) görbéje a praeclampsias betegek és egészséges terhes nők elkülönítésére

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Keringő angiogén faktorok vizsgálata praeclampszában

Ebben a tanulmányunkban az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszintek kapcsolatát mutattuk ki praeclampszában a szisztolés és diasztolés vérnyomás értékekkel, a veseműködés zavarával, az endothelium diszfunkciójával, a trophoblast deportációs folyamattal (trophoblast-törmelékek megjelenése az anyai vérkeringésben), a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, valamint a klinikai tünetek súlyosságával és korábbi terhességi korban történő jelentkezésével. Az anyai életkor, a testtömeg index, a dohányzás, a paritás, a vérvételkori terhességi kor, a májfunkciós paraméterek, a gyulladás és az oxidatív stressz markerei nem álltak összefüggésben a praeclampsziás betegek keringésében lévő angiogén faktorok szintjével.

A VEGF és PlGF hatásos angiogén fehérjék, amelyek fontos szerepet játszanak az angiogenezisben (új erek képződésében) és az endothelsejtek integritásának megőrzésében, azok nyugalmi állapotában [92]. Mivel a praeclampszia anyai tünetegyüttesét generalizált endothelialis diszfunkció jellemzi, megvizsgáltuk, hogy mutatnak-e összefüggést az anti-angiogén sFlt-1 vagy az angiogén PlGF szérumszintek az endothel-aktiválódás (von Willebrand faktor antigen) és az érfalsérülés (fibronektin) markereivel praeclampszában [93, 94]. Tanulmányunkban szignifikáns korrelációkat találtunk az angiogén/anti-angiogén faktorok szérumszintjei és az endothelialis markerek plazma-koncentrációi között mind normális terhességben, mind praeclampszában. Továbbá a vérnyomás értékek és a praeclampszia súlyossága is kapcsolatban állt a szérumszintekkel. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a VEGF és PlGF az endothelium integritásához nélkülözhetetlenek élettani terhességben, és azt, hogy az angiogén és anti-angiogén faktorok közötti egyensúly felbomlása központi szerepet játszik a praeclampszia patogenezisében.

A VEGF-nek kiváltképpen fontos szerepe van a fenesztrált endothelium integritásának biztosításában, mely a praeclampszia által különösen érintett szervekben fordul elő: a vesében (glomerulus), májban (sinusoid) és az agyban (plexus chorioideus) [92]. Anti-VEGF neutralizáló antitest vagy sFlt-1 adása kísérleti állatokban a

glomerulus endotheliumának károsodását idézte elő [95, 96]. Tanulmányunkban az sFlt-1 szintek erős korrelációt mutattak mind egészséges, mind praeclampsiás terhesek vesefunkciós paramétereivel. A csökkent szérumszintű PIGF szintek összefüggést mutattak praeclampsiában a veseműködés károsodásával, mely arra utal, hogy a PIGF-nek vesevédő hatása is lehet. A mért angiogén faktorok szérumszintjei és a májfunkciós paraméterek között a vizsgálati csoportjainkban nem volt szignifikáns összefüggés kimutatható, de HELLP-szindrómás betegeket nem vontunk be a tanulmányunkba.

Normális terhességben az sFlt-1 fő forrása a placenta [97], ami magyarázza a terhesek perifériás keringésében észlelhető jelentősen magasabb sFlt-1 szérumszinteket nem terhesekéhez képest. Az sFlt-1 termelődését a hypoxia fokozza. Praeclampsiában a keringő sFlt-1 szérumszintek tovább növekednek ezen anti-angiogén fehérjének a hypoxiás placentából történő felszabadulása következtében [98]. Érdekes, hogy az élettani terhesség harmadik trimeszterében a syncytiotrophoblast nagy mennyiségben juttat lepényi fragmentumokat az anyai keringésbe [99], mely egybeesik az sFlt-1 szérumszintjének emelkedésével [49, 100]. Ezen trophoblast-törmelék mennyiségét az anyai plazmában előforduló szabad magzati DNS mérésével becsülhetjük meg. Szignifikáns emelkedés észlelhető praeclampsiában a normális terhességgel összehasonlítva mind a praeclampsiás tünetek jelentkezése előtt, mind azután [101-103]. A praeclampsiás csoportunkban a keringő sFlt-1 és a szabad magzati DNS szintek között megfigyelhető szignifikáns korreláció arra utal, hogy a syncytiotrophoblastokból származó törmelékek részben felelősek lehetnek a praeclampsiában észlelhető emelkedett sFlt-1 szérumszintekért. Mindazonáltal, praeclampsiás nők perifériás vérében lévő mononuclearis sejtek lényegesen nagyobb mennyiségű sFlt-1-t termelnek, mint a normális terhesek vérében lévők, ezért feltételezhető, hogy praeclampsiában ezen sejtek az sFlt-1 extra-placentaris forrásául szolgálhatnak [104].

Tanulmányunk másik érdekes megfigyelése, hogy magzati növekedési retardációval társuló praeclampsiában szignifikánsan alacsonyabb PIGF szérumszintek észlelhetők, mint eutróf magzatok esetében. Az intrauterin retardációval társuló praeclampsiás eseteket a méhlepény vérkeringésének jelentős beszűkülése jellemzi [41, 105]. A tenyésztett trophoblastsejtek hypoxiás körülmények között kevesebb PIGF-t expresszálnak és szekretálnak [105, 106], ami arra enged



következtetni, hogy az IUGR-val szövődött praeclampsias esetekben észlelt csökkent PIGF koncentrációk kifejezett lepényi ischaemiát tükröznek. Másrészt pedig a csökkent lepényi PIGF szintek szerepet játszhatnak a lepényi diszfunkció kialakulásában, hozzájárulva ezzel a magzati növekedési retardáció létrejöttéhez [107]. A lepényi tényezők kiemelkedő szerepet játszanak a korai praeclampsia kialakulásában, ami tanulmányunkban szintén szignifikánsan alacsonyabb PIGF koncentrációval társult. Az egészséges terhes csoportunkban a PIGF szérumszintek és az újszülöttek születési súlya közötti szignifikáns pozitív korreláció is alátámasztja a PIGF normális lepényi funkcióban betöltött fontosságát. Megfigyeltük, hogy praeclampsias betegek PIGF szérum-koncentrációja párhuzamosan emelkedett a szüléskori terhességi korrallal, jelezve ezzel manifeszt praeclampsiasban a PIGF meghatározások prognosztikus értékét.

Az egészséges primiparáknál talált szignifikánsan magasabb sFlt-1/PIGF hányados megfelel a korábbi megfigyeléseknek, és ha csak részben is, de magyarázhatja a primiparákban a praeclampsia kifejlődésének fokozott kockázatát [108]. A terhesség harmadik trimeszterében a szérum sFlt-1 szintek emelkedése és a PIGF szérumszintek csökkenése figyelhető meg [49, 100]. Korábbi tanulmányokban mind a szövődésménymentes, mind a praeclampsias terhesek esetén a dohányzás alacsonyabb anyai sFlt-1 koncentrációkkal társult [109]. Továbbá túlsúlyos praeclampsias terheseknél alacsonyabb sFlt-1 és magasabb PIGF szinteket mutattak ki, mint a normális súlyúaknál [110]. Azonban a vérvételkori terhességi kor szűk tartománya, a dohányzók és a normális súlyú praeclampsias betegek alacsony száma tanulmányunkban nem tette lehetővé a fenti megfigyelések megerősítését.

Nemrégiben számoltak be arról, hogy gyulladáshoz vezető stimulusok a lepény sFlt-1 termelését képesek fokozni [46, 111]. Mivel a vizsgálati csoportjainkban a szérum sFlt-1 szintek nem korreláltak a CRP koncentrációkkal, úgy tűnik, hogy a szisztémás gyulladás, ami a harmadik trimeszterben az élettani terhességnek, valamint a praeclampsiasnak is jellemzője, nem járul hozzá lényegesen a megnövekedett sFlt-1 termeléshez. Mindössze gyenge inverz korrelációt figyeltünk meg egészséges terhesek szérum PIGF és CRP szintjei között, melynek klinikai jelentősége még meghatározásra vár. Ahogy tanulmányunkban a keringésben lévő malondialdehid és angiogén fehérjék közötti korreláció hiánya is jelzi, a praeclampsiasra jellemző szisztémás oxidatív stressz

szintén nem mutatott összefüggést az angiogén egyensúlyzavarral. Mindazonáltal a jövőben a keringő sFlt-1 és PlGF szintek kapcsolatát a gyulladás és oxidatív stressz egyéb markereivel is vizsgálni kell, hogy alátámasszuk e negatív megfigyeléseinket.

Korábbi vizsgálatokkal [88] összhangban, tanulmányunkban is jobb diagnosztikus pontosságúnak bizonyult praeclampszában az sFlt-1/PlGF hányados, mint az sFlt-1 és PlGF szintek önmagukban. Ahogy a szenzitivitási és specificitási értékek is mutatják, nem minden magas sFlt-1 és alacsony PlGF szérumszintű terhes nőben fejlődik ki praeclampsia, és néhány esetben alacsony sFlt-1 és magas PlGF szérumszint mellett is előfordul. Számos genetikai, életviteli és környezeti tényező egymásra hatása szükséges, hogy ezen multifaktoriális kórkép klinikai képe kialakuljon. A praeclampsia patogenezisében számos más angiogén faktor, úgymint a transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ 1 és az angiopoietinek (Ang-1, Ang-2), valamint szolubilis receptoraik (szolubilis endoglin és sTie-2) is közrejátszanak [52, 112-114]. Érdekes módon újabb keletű vizsgálatok korai és késői praeclampszában eltérő keringő angiogén faktor profilokat állapítottak meg [115, 116]. Az utóbbit alacsonyabb sFlt-1/PlGF hányados jellemzi és adipocitokinek (például az adiponektin) valószínűleg szintén részt vesznek a patogenezisében [117, 118]. Megjegyezzük, hogy a praeclampsziás betegeink többsége túlsúlyos volt, bennük későn ( $\geq 34$ . hét) és enyhe formában alakult ki a kórkép, melyek magyarázhatják a megfigyelt szenzitivitási és specificitási értékeket.

Összegzésül megállapítható, hogy praeclampszában az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszintek összefüggésben állnak a vérnyomás értékekkel, a vese- és endothel funkciózavarral, a trophoblast-törmelékek anyai vérkeringésben történő megjelenésével, valamint a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, a kórkép súlyosságával és korábbi terhességi korban történő jelentkezésével. Megfigyeléseink alátámasztják az angiogén egyensúlyzavar e terhességi kórkép patogenezisében betöltött központi szerepét.

## 5.2. A szérum citokin profil vizsgálata szövődménymentes terhességben és praeclampsiában

E tanulmányunkban nagy teljesítményű multiplex szuszpenziós array technológiával meghatároztuk egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsiás betegek keringésében számos citokin, kemokin és adhéziós molekula koncentrációját. Az IL-1 $\beta$  és TGF- $\beta$ 1 szintek kivételével minden mért paraméter szignifikánsan különbözött a három vizsgálati csoportban. A praeclampsia kialakulásában szerepet játszó patofiziológiai folyamat számos markerének szimultán meghatározása lehetővé tette számunkra a kórkép patogenezisében betöltött szerepük vizsgálatát.

A szövődménymentes terhességet a Th2-típusú immunitás túlsúlya és a magzatra ártalmas citotoxikus Th1-es immunválasz (ezt tükrözi tanulmányunkban egészséges terhesek IL-2 és IFN- $\gamma$  szintjeinek fordított arányossága a szüléskori terhességi korrall) gátlása jellemzi [119]. Az IL-18 és IL-12 citokinek játszanak kulcsszerepet a Th1/Th2 egyensúly szabályozásában. Az IL-18 önmagában Th2-es immunitást indukál, míg az IL-18 és IL-12 együttes jelenléte Th1-es immunválaszt stimulál [120]. Szövődménymentes terhességben a PBMC által termelt IL-18 és IL-12 arányának szignifikáns növekedéséről számoltak be [121]. A keringő IL-18 IL-12-vel szembeni relatív többlete (tanulmányunkban az emelkedett szérum IL-18/IL-12p70 arány által kifejezve), valamint a bioaktív IL-12p70 IL-12p40-nel (kompetitív inhibitor) szembeni relatív hiánya (csökkent IL-12p70/IL-12p40 hányados) egészséges terheseknél a Th2-típusú immunitást támogatja. Praeclampsiás betegeink szérum IL-12p70 szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges terheseké. Bár az IL-18 és IL-12p40 szintek is emelkedtek a szövődménymentes terhességhez hasonló IL-18/IL-12p70 és IL-12p70/IL-12p40 arányokhoz vezetve, azonban praeclampsiában a keringésben lévő IL-2 és IFN- $\gamma$  IL-4-gyel szembeni relatív túlsúlya (az emelkedett IL-2/IL-4 és IFN- $\gamma$ /IL-4 arányok által jelezve) egy Th1-túlsúlyos szisztémás környezetet eredményez.

A Th1/Th2 egyensúly megváltozása mellett számos más szolubilis gyulladásozó változó módosul normális terhességben és praeclampsiában. Szövődménymentes terhességgel összehasonlítva praeclampsiában a keringésben található proinflammatorikus citokinek (IL-6 és TNF- $\alpha$ ), kemokinek (IL-8, IP-10 és MCP-1),

valamint az ICAM-1 és VCAM-1 adhéziós molekulák szintjei emelkedettek, egy pro-inflammatorikus szisztémás környezetet eredményezve. A praeclampsziában észlelhető emelkedett keringő IL-1 receptor antagonistá koncentráció a pro-inflammatorikus IL-1 $\alpha$  és  $\beta$  megnövekedett aktivitását tükrözi, amelyek féléletideje a keringésben igen rövid, így szérumszintjeik vizsgálata nehézkes [122]. Az immunregulátoros IL-10 praeclampsziás betegeinkben emelkedett szérumszintje összhangban van korábbi megfigyelésekkel és kompenzációs jelenséggént értékelhető [123]. Másfelől az egészséges terheseknél a nem terhes nőkkel történő összehasonlításban észlelt citokin profil-változások részben anti-inflammatorikus irányba mutatnak, ahogy azt a csökkent IL-1 receptor antagonistá, TNF- $\alpha$  és MCP-1 koncentrációk jelzik. Mindamellet egészséges terhesek csökkent IL-10 és növekedett IP-10 szérumszintjei pro-inflammatorikus válaszhoz vezethetnek. Valóban, a szövődménymentes terhesség harmadik trimeszterét egy kontrollált szisztémás gyulladós állapot jellemzi, melyet vizsgálataink során észlelt emelkedett szérum CRP szintek is alátámasztanak [124]. Érdekes megfigyelés, hogy koraterhességben a feto-maternális határfelületen pro-inflammatorikus citokin- és kemokintermeléssel járó kontrollált gyulladós állapot kedvez a trophoblast-invázióknak [125, 126]. Habár a TGF- $\beta$ 1 szérum-koncentrációja nem különbözött vizsgálati csoportjainkban, de szolubilis koreceptorának, az endoglinnek magasabb szérumszintjét figyelték meg korábban praeclampsziában [127]. A szolubilis endoglin megakadályozza a TGF- $\beta$ 1-nek receptorához való kötődését és a jelátviteli folyamatokat, ezáltal az érrendszerben a TGF- $\beta$ 1 hatásának zavarához vezet.

Az anyai szisztémás gyulladós válaszreakció, mely a szövődménymentes terhesség harmadik trimeszterére és – egy kifejezett formában – a praeclampsziára is jellemző, magába foglalja az akut fázis reakciót és szisztémás oxidatív stresszel jár együtt, mely kórélettani folyamatokban a keringő citokinek központi szerepet játszanak [44]. A pro-inflammatorikus citokinek, elsődlegesen az IL-6, akut fázis választ idéznek elő [128]. Továbbá a citokinek oxigén szabadgyökök felszabadulását váltják ki, míg a reaktív oxigén metabolitok a pro-inflammatorikus citokinek és adhéziós molekulákat kódoló gének átírását serkentik [129]. Valóban, a szérum IL-6 és TNF- $\alpha$  koncentrációk korreláltak a CRP szérumszintekkel az egészséges nem terhes és terhes nők csoportjában. Egészséges terhesek esetében a TGF- $\beta$ 1 és a malondialdehid szérumszintjének fordított arányossága arra utal, hogy a TGF- $\beta$ 1 normális terhességben

a lipid-peroxidok termelését gátolhatja. Érdekes megfigyelés, hogy a szérumban MCP-1 és ICAM-1 koncentrációk praeclampsziás terhességben pozitív korrelációt mutattak a szérumban CRP és malondialdehid szintekkel, jelezve ezzel, hogy a leukocyták kemotaxisa és endothelsejtekhez történő adhézioja központi eleme a praeclampsziában megfigyelhető generalizált intravasculáris gyulladási reakciónak és oxidatív stressznek. Az MCP-1 és ICAM-1 szérumban-koncentrációk összefüggése a vérnyomásértékekkel és a májfunkciós laboratóriumi paraméterekkel arra enged következtetni, hogy ezen citokinek és az általuk vezérelt gyulladási folyamatok közreműködhetnek a terhességi kórkép esetében a magasvérnyomás és a hepatocelluláris károsodás kialakulásában.

A citokinek, a kemokinek és az adhézio molekulák a praeclampsia anyai tünetegyüttesét fémjelző endothelialis diszfunkció potenciális mediátorai. Ezért megvizsgáltuk, hogy e gyulladási faktorok milyen összefüggésben állnak az endothel-aktiváció (von Willebrand faktor antigén) és az endothel-sérülés (fibronektin) markereivel. Tanulmányunkban szignifikáns korrelációkat találtunk az IP-10, az MCP-1 és a VCAM-1 szérumszintek, valamint az endothelialis markerek között mind szövődmenymentes terhességben, mind pedig praeclampsziában. Egyes fenesztrált (diszkontinuus) endothellel rendelkező szervek, mint a vese (glomerulus), a máj (sinusoid) és az agy (plexus chorioideus), különös mértékben érintettek praeclampsziában. Érdekes, hogy tanulmányunkban a szérumban IP-10, MCP-1 és VCAM-1 koncentrációk összefüggésben álltak a vese- és májfunkciós paraméterekkel is. Mindezen megfigyeléseink jelzik e gyulladási molekulák endothel-sérülés kialakulásában betöltött fontos szerepét. Az IP-10 mutatta a legszorosabb összefüggést az endothel-diszfunkcióval egészséges és praeclampsziás terhesek esetében is. Az IP-10 (CXCL10) csakugyan rendelkezik pro-inflammatorikus és anti-angiogén tulajdonságokkal, és praeclampsziában ezen kemokint tartják a gyulladás és anti-angiogenezis közötti potenciális kapcsolatnak [130]. Egészséges terheseknél az IP-10 szérumszintje és az újszülött születési súlya közötti fordított arányosság az IP-10 lepenyi angiogenezisben betöltött gátló szerepét sugallja. Annak ellenére, hogy a TNF- $\alpha$  szintén az endothelsejtek diszfunkcióját és károsodását képes előidézni, szérumban-koncentrációja és az endothelialis markerek között nem volt szignifikáns összefüggés megfigyelhető vizsgálatunkban [131]. Mindazonáltal tanulmányunkban nem mértük

meg a szolubilis TNF receptorok szintjeit, melyek felezési ideje hosszabb, mint a TNF- $\alpha$ -é, és ezért a TNF- $\alpha$  aktivitás megbízhatóbb markereiként ismertek.

Praeclampsziában a keringésben található gyulladásoos citokinek egyik potenciális forrása a méhlepény [132]. Érdekes, hogy praeclampsziában a syncytiotrophoblast nagy mennyiségben árasztja el az anyai vérkeringést lepenyi törmelékkel. A trophoblast-törmelék mennyiségét az anyai plazmában lévő szabad magzati DNS koncentrációja mutatja [102, 103]. Tanulmányunkban a keringésben található gyulladásoos citokinek és más gyulladásoos molekulák koncentrációi nem mutattak szignifikáns összefüggést a szabad magzati DNS plazmaszintjével, jelezve ezzel, hogy a gyulladásoos molekulák keringésben mért emelkedett szintjéhez a trophoblast deportációs folyamat nem járul hozzá szervesen. Mások is megkérdőjelezték, hogy a méhlepény-e a praeclampsziás betegek keringésében a pro-inflammatorikus citokinek fő forrása [133]. Ezen kórképben a gyulladásoos molekulák a diszfunkcionális anyai endothelsejtekből és a keringésben lévő aktivált leukocytákból is felszabadulhatnak. Továbbá a citokintermelés szoros genetikai szabályozás alatt áll. Így a praeclampsziában megfigyelhető kóros citokin profilért – legalábbis részben – genetikai faktorok is felelősek lehetnek [134-138].

Tanulmányunkban a praeclampsziás betegek alcsoportjaiban észlelt hasonló citokin profil, mely a kórkép súlyosságától, jelentkezésének idejétől, illetve a magzati növekedési retardáció meglététől független volt, magyarázható a praeclampszia multifaktoriális kórereditével. Számos genetikai, viselkedési és környezeti tényező kölcsönhatása szükséges, hogy a praeclampszia klinikai képe kialakuljon. Kutatócsoportunk több genetikai és szolubilis faktort azonosított, melyek összefüggésben álltak a praeclampszia súlyosságával és a szövődmények előfordulásával, a HELLP-szindrómát és a magzati növekedési retardációt is beleértve [82, 139-141]. Mindazonáltal az is lehetséges, hogy tanulmányunk viszonylag alacsony esetszáma nem tette lehetővé az alcsoportok közötti különbségek megfigyelését.

Összefoglalva, eredményeink szerint a praeclampszia egy pro-inflammatorikus szisztémás környezettel párosul. A pro-inflammatorikus citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák megnövekedett mennyisége az anyai keringésben központi szerepet játszhat a praeclampszia anyai tünetegyüttesére jellemző kifejezett szisztémás gyulladásoos válaszreakcióban és generalizált endothel-diszfunkcióban.

### **5.3. A 70 kDa molekulatömegű hőszokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) szérumszintjének összefüggése praeclampsziás nők keringésében található citokinekkal, kemokinekkal, adhéziós molekulákkal és angiogén faktorokkal**

Egészséges és praeclampsziás terhesek keringésében egyidejűleg megmértük számos citokin, kemokin, adhéziós molekula és angiogén faktor, valamint a Hsp70 koncentrációját. Megfigyeléseink szerint praeclampsziás betegek esetében az emelkedett szérum Hsp70 koncentráció szignifikáns összefüggést mutat az IL-12p40, az MCP-1, az ICAM-1 és a VCAM-1 szérumszintekkel. Továbbá, az emelkedett Hsp70 szérumszintek és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeclampsia rizikóját.

Az intracelluláris Hsp70 a chaperon rendszer elemeként kulcsfontosságú szerepet játszik a sejt-homeostasis fenntartásában, azonban a stressz hatásnak kitett, illetve károsodott, necroticus sejtekből származó extracelluláris Hsp70 a természetes és adaptív immunrendszer aktiválásával képes egy pro-inflammatorikus immunválaszt létrehozni [78]. Az extracelluláris Hsp70 hatását az antigén-prezentáló sejtek felszíni receptoraihoz (CD14, CD36, CD40, CD91, LOX-1, Toll-like receptor 2 és 4) kötődve fejti ki, gyulladáshoz vezető citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-12), kemokinek (az MCP-1-t is beleértve) és a nitrogén-monoxid termelődését, valamint kostimulátoros molekulák expresszióját serkentve [79, 142-146]. A praeclampsziás betegcsoportunkban megfigyelt kapcsolat az emelkedett szérum Hsp70 és MCP-1, ICAM-1, valamint VCAM-1 szintek között arra utal, hogy a keringésben lévő Hsp70-nek szerepe lehet a praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős kifejezett szisztémás gyulladáshoz vezető válaszreakció kialakulásában. Valóban, az emelkedett keringő Hsp70 szintek összefüggést mutattak a gyulladáshoz vezető válasszal számos kórállapot esetében, mint például akut fertőzésekben, szisztémás sclerosisban, krónikus obstruktív tüdőbetegségben, májresectio és koszorúér-bypass műtét után, myocardialis infarctust követően és idősebb életkorban [147-154].

A 4.2. alfejezetben beszámoltunk praeclampsziás betegek esetében arról, hogy a megnövekedett szérum MCP-1, ICAM-1 és VCAM-1 koncentrációk szignifikáns korrelációt mutatnak a vérnyomás értékekkel, a vese- és májfunkciós paraméterekkel, valamint a plazma fibronectin szintjével. Mindezek alapján felmerül a lehetősége annak,

hogy a keringésben lévő Hsp70 közvetett módon hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyüttesét fémjelző generalizált endothel-diszfunkcióhoz. Azon megfigyelések, hogy az extracelluláris Hsp70 kötődik az endothelsejtekhez [155], valamint, hogy a Hsp70 összefüggést mutat az endothel-aktivációval a méhlepény vasculáris megbetegedéseiben [156], arra utalnak, hogy a keringésben lévő Hsp70 praeclampsia esetén közvetlen szerepet is játszhat az endothel aktiválódásában vagy sérülésében. Érdekes megfigyelés, hogy az ICAM-1 és a VCAM-1 alacsony koncentrációban jelen van az endothelsejtek membránjában, és az endothelsejtek aktiválódása esetén koncentrációja jelentősen megemelkedik. Ily módon a praeclampsias csoportunkban a szérumban Hsp70 és ICAM-1, valamint VCAM-1 koncentrációk közötti szignifikáns korreláció alátámaszthatja e hipotézisünket. Mindazonáltal nemrég megfigyelték a Hsp70 internalizációját humán endothelsejtekbe, ami magyarázhatja a Hsp70 atheroprotectiv hatását [157].

Nemcsak az extracelluláris Hsp70 tudja a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-12 termelődését előidézni, hanem a pro-inflammatorikus citokinek is képesek a Hsp70 intracelluláris expresszióját és extracelluláris felszabadulását kiváltani [158-160]. A TNF- $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  féléletideje az anyai keringésben azonban igen rövid, mely magyarázhatja a Hsp70 és ezen citokinek szérumszintje közti korreláció hiányát. Másrészt pedig a Hsp70 rendelkezik anti-inflammatorikus tulajdonságokkal is [161-164], és ezáltal a gyulladási folyamatok gátlásában is részt vehet. A Hsp70 és az IL-12p40 (a bioaktív IL-12p70 kompetitív gátlója) szérumban koncentrációja között tanulmányunkban megfigyelt összefüggés a keringő Hsp70 gyulladásgátló szerepét sejteti praeclampsiasban. Az IL-12p70 és az IL-12p40 aránya azonban változatlan volt praeclampsias terhesek esetében egészséges terhesekkel összehasonlítva, és a keringésben lévő Hsp70 koncentrációjával sem mutatott összefüggést praeclampsias betegekben.

Az IL-12p40 amellet, hogy az IL-12p70 kompetitív antagonistája, önálló funkcionális aktivitással is rendelkezik [165]. Az IL-12p40 a makrofágok számára kemoattraktáns és fokozza a baktériumok által stimulált dendritikus sejtek vándorlását. Számos patológiás gyulladási folyamattal, mint az asthma, a szilikózis és a graft rejekció volt kapcsolatba hozható. Az IL-12p40 mindezen felül a Th17-választ indukáló IL-23-as citokin komponense. Fontos megjegyezni, hogy a Th17-típusú immunitást a



közelmúltban a praeclampsia patogenezisével is összefüggésbe hozták [166, 167]. Az IL-12p40 immunstimuláló hatásának tükrében a praeclampsias vizsgálati csoportunkban az emelkedett szérumszintű Hsp70 és IL-12p40 koncentrációk közötti összefüggés is a keringésben található Hsp70 praeclampsiasban betöltött gyulladást serkentő szerepét látszik alátámasztani.

Számos tanulmány kimutatta már a Hsp70 emelkedett szérumszintjét praeclampsiasban [81, 168, 169], de az mindeddig nem került teljes mértékben tisztázásra, hogy honnan is származik az anyai keringésben megnövekedett mennyiségű Hsp70. Korábbi vizsgálataink szerint, ha ugyan csak részben is, de a praeclampsiasban emelkedett Hsp70 szérumszintekért a hepatocellularis károsodás tehető felelőssé [82]. Jelen tanulmányunkban praeclampsias terhesekben megfigyelt, a Hsp70 és a gyulladáshoz vezető molekulák szérumszintje közötti szignifikáns korreláció felveti a lehetőségét annak, hogy a perifériás vérkeringésben található leukocyták, melyek kifejezetten aktiválódnak praeclampsiasban és képesek Hsp70 és gyulladáshoz vezető molekulák kibocsátására [75], a keringő Hsp70 további forrásai lehetnek praeclampsiasban. Érdekes megfigyelés, hogy praeclampsias betegek teljes vérében a Hsp70 mRNA expressziója jóval kifejezettebb, mint normotensív terhesekben [170]. Az ICAM-1 és a VCAM-1 az endothelsejteken is kifejeződik. Ezáltal praeclampsiasban a keringésben lévő Hsp70 koncentrációjának ezen adhéziós molekulák szérumszintjének emelkedésével arányos növekedése a Hsp70-nek az aktiválódott, illetve károsodott endothelsejtekből történő felszabadulását is tükrözheti. Továbbá az ischaemiás és oxidatív stressznek kitett praeclampsias méhlepény is szolgálhat a Hsp70 forrásul. Valóban, a placentaris szövetekben a Hsp70 fokozott expressziója figyelhető meg praeclampsiasban szövődménymentes terhességgel összehasonlítva [156, 171-173]. Tekintettel arra, hogy a Hsp70 képes a sejtmembránhoz kötődni, illetve beágyazódni abba, a Hsp70 a syncytiotrophoblast membrán mikropartikulumokkal (STBM) is bekerülhet az anyai vérkeringésbe praeclampsiasban.

A keringésben lévő angiogén faktorok és antagonistáik központi szerepet játszanak a praeclampsia patogenezisében [45, 174]. Tanulmányunkban az sFlt-1 és PlGF szérumszintjeit is megmértük praeclampsiasban szövődött és szövődménymentes terhességben elektrokemilumineszcens immunoassay útján. Az emelkedett sFlt-1 és a csökkent PlGF szintek azonban nem mutattak összefüggést a

szérum Hsp70 koncentrációval praeclampsias betegekben, jelezve, hogy ezen multifaktoriális kórkép patogenezisében az angiogén citokin profil és a keringésben lévő Hsp70 koncentrációjának változása egymástól független mechanizmusok. Eredményeink szerint az emelkedett szérum Hsp70 koncentrációnak és sFlt-1/PlGF hányadosnak szinergetikus hatása van a praeclampsia rizikójában, ahogy azt a kombinációjuk lényegesen nagyobb esélyhányadosa mutatja. Figyelemre méltó, hogy a CD40, mely az angiogenesisben és a tubularis átalakulásban kulcsszerepet játszik, a Hsp70 extracelluláris receptora az endothelsejteken. Az extracelluláris Hsp70 kezelés gátolta a CD40 ligand által kiváltott apoptózis gátlást és tubularis átalakulást humán köldökzsinórvéna endothelsejtekben, így lehetséges, hogy a Hsp70 anti-angiogén hatást is ki tud fejteni [175]. Az extracelluláris Hsp70 angiogenesisben betöltött szerepének tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Az emelkedett szérum Hsp70 szintek és számos mért változó közötti összefüggés hiányát praeclampsiaiban azonban a Hsp70 termelésének, extracelluláris térbe történő kijutásának és stabilitásának genetikai változékonysága is okozhatja. Továbbá a Hsp70-t azon intrinsic képessége, hogy chaperonként működve más makromolekulákhoz kötődni képes, elfedheti az ELISA-val történő kimutatás elől.

Összefoglalva megállapítható, hogy praeclampsias nőknél a megnövekedett Hsp70 szérum-koncentráció összefüggésben áll a szérum citokin profil pro-inflammatorikus irányú változásával, ami arra utal, hogy a keringésben lévő Hsp70 hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakció kialakulásához.

## 6. Következtetések

1. Az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szérumszintek kapcsolatát mutattuk ki a praeeclampsia során a szisztolés és diasztolés vérnyomás értékekkel, a veseműködés zavarával, az endothelium diszfunkciójával, a trophoblast deportációs folyamattal, a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, valamint a klinikai tünetek súlyosságával és korábbi terhességi korban történő jelentkezésével. Az anyai életkor, a testtömeg index, a dohányzás, a paritás, a vérvételkor előforduló terhességi kor, a májfunkciós paraméterek, a gyulladás és az oxidatív stressz markerei nem álltak összefüggésben a praeeclampsias betegek keringésében lévő angiogén faktorok szintjével. Megfigyeléseink alátámasztják az angiogén egyensúlyzavar e terhességi kórkép patogenezisében betöltött központi szerepét.
2. Tanulmányunk során nagy teljesítményű multiplex szuszpenziós array technológiával meghatároztuk egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeeclampsias betegek keringésében számos citokin, kemokin és adhéziós molekula koncentrációját. Az IL-1 $\beta$  és TGF- $\beta$ 1 szintek kivételével minden mért paraméter szignifikánsan különbözött a három vizsgálati csoportban. Eredményeink szerint a praeeclampsia egy pro-inflammatorikus szisztémás környezettel párosul. A pro-inflammatorikus citokinek, kemokinek és adhéziós molekulák megnövekedett mennyisége az anyai keringésben központi szerepet játszhat a praeeclampsia anyai tünetegyüttesére jellemző kifejezett szisztémás gyulladásos válaszreakcióban és generalizált endothel-diszfunkcióban.
3. Megfigyeléseink szerint praeeclampsias betegek esetében az emelkedett szérumszintű Hsp70 koncentráció összefüggésben áll a szérumszintű citokin profil pro-inflammatorikus irányú változásával, ami arra utal, hogy a keringésben lévő Hsp70 hozzájárulhat a praeeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős generalizált intravaszkuláris gyulladásos reakció kialakulásához. Az emelkedett Hsp70 szérumszintek és sFlt-1/PlGF hányados együttes előfordulása additív módon növeli a praeeclampsia rizikóját.

## 7. Összefoglalás

A praeclampsia a terhesség egy súlyos szövődménye, melyet a keringő angiogén és anti-angiogén faktorok egyensúlyának felbomlása és egy kifejezett anyai szisztémás gyulladással válaszreakció jellemez. Tanulmányunkban meghatároztuk egészséges nem terhes és terhes nők, valamint praeclampsias betegek keringésében számos angiogén faktor, citokin, kemokin, adhézions molekula és a 70 kDa molekulatömegű hő sokkfehérje (Hsp70, HSPA1A) koncentrációját. A praeclampsia kialakulásában szerepet játszó patofiziológiai folyamat számos markerének szimultán meghatározása lehetővé tette számunkra a kórkép patogenezisében betöltött szerepük vizsgálatát. Az emelkedett szérumban szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) és csökkent placentaris növekedési faktor (PIGF) szintek praeclampsiasban összefüggést mutattak a vérnyomás értékekkel, a kóros vesefunkcióval, az endothel-diszfunkcióval, a trophoblast-degradációval, továbbá a terhesség rövidebb időtartamával, a magzati növekedési retardációval, valamint a praeclampsias tünetek súlyosságával és korai terhességi korban történő jelentkezésükkel. Megfigyeléseink alátámasztják az angiogén egyensúlyzavar e terhességi kórkép patogenezisében betöltött központi szerepét. Az interleukin (IL)-1béta és transzformáló növekedési faktor (TGF)-béta1 szintek kivételével minden mért gyulladással paraméter szignifikánsan különbözött a három vizsgálati csoportban. Eredményeink szerint a praeclampsia egy pro-inflammatorikus szisztémás környezettel párosul. A pro-inflammatorikus citokinek, kemokinek és adhézions molekulák megnövekedett mennyisége az anyai keringésben központi szerepet játszhat a praeclampsia anyai tünetegyüttesére jellemző kifejezett szisztémás gyulladással válaszreakcióban és generalizált endothel-diszfunkcióban. Praeclampsias betegek esetében a megnövekedett Hsp70 szérumban-koncentráció összefüggésben állt a szérumban citokin profil pro-inflammatorikus irányú változásával, ami arra utal, hogy a keringésben lévő Hsp70 hozzájárulhat a praeclampsia anyai tünetegyütteséért felelős generalizált intravasculáris gyulladással reakció kialakulásához. Továbbá, az emelkedett Hsp70 szérumban-szintek és sFlt-1/PIGF hányados együttes előfordulása additív módon növelte a praeclampsia rizikóját.

## 8. Summary

Preeclampsia is a severe complication of pregnancy characterized by an imbalance between circulating angiogenic and anti-angiogenic factors and an excessive maternal systemic inflammatory response. We determined circulating levels of several angiogenic factors, cytokines, chemokines and adhesion molecules, as well as those of 70 kDa heat shock protein (Hsp70, HSPA1A) in healthy non-pregnant and pregnant women and preeclamptic patients. Simultaneous measurement of several markers of disease processes enabled us to explore their role in the pathogenesis of preeclampsia. Increased serum soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and decreased placental growth factor (PlGF) levels were associated with blood pressure values, renal and endothelial dysfunction, trophoblast degradation, as well as with a shorter duration of pregnancy, fetal growth restriction, the severity and preterm onset of the disease in preeclampsia. These findings indicate the central role of an angiogenic imbalance in the pathogenesis of this pregnancy-specific disorder. Except for serum interleukin (IL)-1beta and transforming growth factor (TGF)-beta1 levels, all of the measured inflammatory variables differed significantly among the three study groups. According to our findings, preeclampsia is associated with an overall pro-inflammatory systemic environment. Elevated amounts of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules in the maternal circulation might play a central role in the excessive systemic inflammatory response, as well as in the generalized endothelial dysfunction characteristics of the maternal syndrome of preeclampsia. Increased serum Hsp70 concentrations in women with preeclampsia were associated with pro-inflammatory changes in circulating cytokine profile, suggesting that circulating Hsp70 might contribute to the development of the generalized intravascular inflammatory reaction characteristic of the maternal syndrome of the disease. Furthermore, the combination of elevated serum Hsp70 level and sFlt-1/PlGF ratio was found to be additive for the risk of preeclampsia.

## 9. Irodalomjegyzék

- [1] Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308: 1592-1594.
- [2] Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM. (2009) Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstet Gynecol*, 113: 1075-1081.
- [3] Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. (2008) Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*, 21: 521-526.
- [4] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. (2010) Pre-eclampsia. *Lancet*, 376: 631-644.
- [5] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet*, 365: 785-799.
- [6] Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P, Smith WC. (2003) Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. *BMJ*, 326: 845.
- [7] Smith GC, Pell JP, Walsh D. (2001) Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*, 357: 2002-2006.
- [8] Roberts JM, Gammill H. (2005) Pre-eclampsia and cardiovascular disease in later life. *Lancet*, 366: 961-962.
- [9] Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. (2003) Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy*, 22: 109-127.
- [10] (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 183: S1-S22.
- [11] Sibai BM. (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 102: 181-192.
- [12] (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol*, 99: 159-167.

- [13] Weinstein L. (1982) Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142: 159-167.
- [14] Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA. (1993) Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol*, 169: 1000-1006.
- [15] Martin JN, Jr., Rinehart BK, May WL, Magann EF, Terrone DA, Blake PG. (1999) The spectrum of severe preeclampsia: comparative analysis by HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet count) syndrome classification. *Am J Obstet Gynecol*, 180: 1373-1384.
- [16] Sibai BM. (2004) Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 103: 981-991.
- [17] Cavkaytar S, Ugurlu EN, Karaer A, Tapisiz OL, Danisman N. (2007) Are clinical symptoms more predictive than laboratory parameters for adverse maternal outcome in HELLP syndrome? *Acta Obstet Gynecol Scand*, 86: 648-651.
- [18] Sibai BM. (1990) The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): much ado about nothing? *Am J Obstet Gynecol*, 162: 311-316.
- [19] Douglas KA, Redman CW. (1994) Eclampsia in the United Kingdom. *Bmj*, 309: 1395-1400.
- [20] Duckitt K, Harrington D. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 330: 565.
- [21] Vatten LJ, Skjaerven R. (2004) Is pre-eclampsia more than one disease? *Bjog*, 111: 298-302.
- [22] Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, Catalano PM, Morris CD. (2000) Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol*, 95: 24-28.

- [23] Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, VanDorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P, Thurnau G. (1998) Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med*, 338: 701-705.
- [24] Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M, Roberts J, McNellis D. (2000) Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol*, 182: 938-942.
- [25] Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC. (2004) Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 191: 254-258.
- [26] Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. (2003) Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*, 41: 437-445.
- [27] Sibai BM. (2002) Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 100: 369-377.
- [28] Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V. (2002) How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 101: 6-14.
- [29] Kupferminc MJ. (2003) Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, 1: 111.
- [30] van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, Buller HR. (1999) High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 180: 1146-1150.
- [31] Dekker G, Sibai B. (2001) Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet*, 357: 209-215.



- [32] Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizan JM, Kafury-Goeta AC. (1999) Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 181: 1026-1035.
- [33] Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. (2003) Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 188: 1241-1243.
- [34] Dekker G, Robillard PY. (2003) The birth interval hypothesis--does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis. *J Reprod Immunol*, 59: 245-251.
- [35] Robillard PY, Dekker GA, Hulsey TC. (1999) Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 84: 37-41.
- [36] Ness RB, Roberts JM. (1996) Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*, 175: 1365-1370.
- [37] Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. (2003) The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review. *Placenta*, 24 Suppl A: S86-93.
- [38] Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. (2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*, 200: 957-965.
- [39] Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. (2007) Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 149: 139-145.
- [40] Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Nakashima A, Shiozaki A. (2007) Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*, 76: 30-39.
- [41] Roberts JM, Gammill HS. (2005) Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*, 46: 1243-1249.
- [42] Redman CW, Sargent IL. (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta*, 24 Suppl A: S21-27.

- [43] Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufmann P. (2003) Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta*, 24: 181-190.
- [44] Redman CW, Sargent IL. (2004) Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol*, 24: 565-570.
- [45] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111: 649-658.
- [46] Ahmad S, Ahmed A. (2004) Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*, 95: 884-891.
- [47] Maynard SE, Karumanchi SA. (2011) Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol*, 31: 33-46.
- [48] Kendall RL, Thomas KA. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10705-10709.
- [49] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350: 672-683.
- [50] Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Goncalves LF, Gomez R, Edwin S. (2004) Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol*, 190: 1541-1547; discussion 1547-1550.
- [51] Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. (2006) Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 195: 255-259.

- [52] Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355: 992-1005.
- [53] Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, Thadhani R. (2007) Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension*, 50: 137-142.
- [54] Robinson CJ, Johnson DD. (2007) Soluble endoglin as a second-trimester marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 197: 174.e1-5.
- [55] Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*, 140: 947-959.
- [56] Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE. (2008) VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, 358: 1129-1136.
- [57] Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. (2007) The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*, 28: 192-209.
- [58] Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. (1999) Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol*, 117: 550-555.
- [59] Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. (1999) Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 41: 297-306.
- [60] Ohkuchi A, Minakami H, Aoya T, Haga T, Kimura H, Suzuki M, Sato I. (2001) Expansion of the fraction of Th1 cells in women with preeclampsia: inverse correlation between the percentage of Th1 cells and the plasma level of PAI-2. *Am J Reprod Immunol*, 46: 252-259.
- [61] Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. (2002) The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol*, 48: 381-386.

- [62] Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, Oleszczuk J. (1999) T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 86: 165-170.
- [63] Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. (2005) Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 54: 30-37.
- [64] Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. (2006) Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*, 70: 83-91.
- [65] Visser N, van Rijn BB, Rijkers GT, Franx A, Bruinse HW. (2007) Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. *Obstet Gynecol Surv*, 62: 191-201.
- [66] Hightower LE. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66: 191-197.
- [67] Wand-Wurttenberger A, Schoel B, Ivanyi J, Kaufmann SH. (1991) Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. *Eur J Immunol*, 21: 1089-1092.
- [68] Di Cesare S, Poccia F, Mastino A, Colizzi V. (1992) Surface expressed heat-shock proteins by stressed or human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphoid cells represent the target for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology*, 76: 341-343.
- [69] Multhoff G, Hightower LE. (1996) Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones*, 1: 167-176.
- [70] Soltys BJ, Gupta RS. (1997) Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol Int*, 21: 315-320.
- [71] Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. (1998) Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*, 27: 367-377.
- [72] Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*, 12: 1539-1546.

- [73] Saito K, Dai Y, Ohtsuka K. (2005) Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Exp Cell Res*, 310: 229-236.
- [74] Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M. (2003) Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem*, 278: 21601-21606.
- [75] Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. (2004) Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324: 511-517.
- [76] Lancaster GI, Febbraio MA. (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem*, 280: 23349-23355.
- [77] Mambula SS, Calderwood SK. (2006) Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol*, 177: 7849-7857.
- [78] Pockley AG. (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 362: 469-476.
- [79] Asea A. (2005) Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev*, 11: 34-45.
- [80] Molvarec A, Rigó J, Jr., Nagy B, Walentin S, Szalay J, Füst G, Karádi I, Prohászka Z. (2007) Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 74: 163-169.
- [81] Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J, Jr. (2006) Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens*, 20: 780-786.
- [82] Molvarec A, Rigó J, Jr., Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. (2009) Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*, 14: 151-159.

- [83] Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Füst G, Karádi I, Rigó J, Jr. (2007) Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol*, 73: 172-179.
- [84] Madách K, Molvarec A, Rigó J, Jr., Nagy B, Péntes I, Karádi I, Prohászka Z. (2008) Elevated serum 70 kDa heat shock protein level reflects tissue damage and disease severity in the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 139: 133-138.
- [85] Molvarec A, Derzsy Z, Kocsis J, Bóze T, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J, Jr. (2009) Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*, 14: 491-498.
- [86] von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. (2003) Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 22: 143-148.
- [87] Joubert K. (2000) Standards of the body mass and body length of birth in Hungary on the basis of the 1990-1996 nation-wide liveborn data. *Magy Nőorv L*, 63: 155-163.
- [88] Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H, Takahashi K, Yoshida M, Matsubara S, Suzuki M. (2010) Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. *Hypertens Res*, 33: 422-427.
- [89] Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H. (2010) An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 202: 161.e1-11.
- [90] Lázár L, Nagy B, Bán Z, Nagy GR, Papp Z. (2006) Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem*, 52: 1599-1601.
- [91] Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. (1966) Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16: 359-364.

- [92] Maharaj AS, D'Amore PA. (2007) Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res*, 74: 100-113.
- [93] Molvarec A, Rigó J, Jr., Bóze T, Derzsy Z, Cervenak L, Makó V, Gombos T, Udvardy ML, Hársfalvi J, Prohászka Z. (2009) Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost*, 101: 305-311.
- [94] Paternoster D, Stella A, Simioni P, Trovo S, Plebani P, Girolami A. (1994) Clotting inhibitors and fibronectin as potential markers in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 47: 215-221.
- [95] Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. (2001) Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku J Exp Med*, 195: 43-54.
- [96] Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. (2003) Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*, 278: 12605-12608.
- [97] Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS. (1998) A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod*, 59: 1540-1548.
- [98] Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y. (2004) Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology*, 145: 4838-4845.
- [99] Johansen M, Redman CW, Wilkins T, Sargent IL. (1999) Trophoblast deportation in human pregnancy--its relevance for pre-eclampsia. *Placenta*, 20: 531-539.
- [100] Hirashima C, Ohkuchi A, Arai F, Takahashi K, Suzuki H, Watanabe T, Kario K, Matsubara S, Suzuki M. (2005) Establishing reference values for both total soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and free placental growth factor in pregnant women. *Hypertens Res*, 28: 727-732.

- [101] Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. (2002) The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 21: 77-83.
- [102] Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*, 45: 184-188.
- [103] Lazar L, Rigó J, Jr., Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z, Molvarec A. (2009) Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. *BMC Med Genet*, 10: 120.
- [104] Rajakumar A, Michael HM, Rajakumar PA, Shibata E, Hubel CA, Karumanchi SA, Thadhani R, Wolf M, Harger G, Markovic N. (2005) Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta*, 26: 563-573.
- [105] Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. (1997) Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*, 18: 657-665.
- [106] Lash GE, Taylor CM, Trew AJ, Cooper S, Anthony FW, Wheeler T, Baker PN. (2002) Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors*, 20: 189-196.
- [107] Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. (2003) Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig*, 10: 178-188.
- [108] Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, Taylor RN, Ecker JL, Karumanchi SA, Thadhani R. (2005) Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 193: 16-22.
- [109] 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: 943-947.



- [110] Suwaki N, Masuyama H, Nakatsukasa H, Masumoto A, Sumida Y, Takamoto N, Hiramatsu Y. (2006) Hypoadiponectinemia and circulating angiogenic factors in overweight patients complicated with pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 195: 1687-1692.
- [111] Nakada E, Walley KR, Nakada T, Hu Y, von Dadelszen P, Boyd JH. (2009) Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. *Placenta*, 30: 774-779.
- [112] Nadar SK, Karalis I, Al Yemeni E, Blann AD, Lip GY. (2005) Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. *Thromb Haemost*, 94: 1071-1076.
- [113] Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y, Makino H. (2005) Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens*, 18: 1181-1188.
- [114] Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y, Makino H. (2007) Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron Clin Pract*, 106: c43-50.
- [115] Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Arai F, Watanabe T, Kario K, Suzuki M. (2007) Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia. *Hypertens Res*, 30: 151-159.
- [116] Masuyama H, Segawa T, Sumida Y, Masumoto A, Inoue S, Akahori Y, Hiramatsu Y. (2010) Different profiles of circulating angiogenic factors and adipocytokines between early- and late-onset pre-eclampsia. *BJOG*, 117: 314-320.
- [117] Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. (2007) Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2672-2679.
- [118] Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y. (2008) Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients. *Endocr J*, 55: 565-573.

- [119] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 14: 353-356.
- [120] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, 19: 423-474.
- [121] Sakai M, Shiozaki A, Sasaki Y, Yoneda S, Saito S. (2004) The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. *J Reprod Immunol*, 61: 133-143.
- [122] Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. (1994) Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol*, 84: 937-940.
- [123] Benian A, Madazli R, Aksu F, Uzun H, Aydin S. (2002) Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 100: 327-331.
- [124] Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. (1998) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol*, 179: 80-86.
- [125] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*, 12: 1065-1074.
- [126] Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R, Mor G. (2007) Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 57: 55-66.
- [127] Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, 12: 642-649.

- [128] Gabay C, Kushner I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340: 448-454.
- [129] Conner EM, Grisham MB. (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12: 274-277.
- [130] Gotsch F, Romero R, Friel L, Kusanovic JP, Espinoza J, Erez O, Than NG, Mittal P, Edwin S, Yoon BH, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hassan SS. (2007) CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J Matern Fetal Neonatal Med*, 20: 777-792.
- [131] Pober JS, Min W. (2006) Endothelial cell dysfunction, injury and death. *Handb Exp Pharmacol*: 135-156.
- [132] Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. (2007) Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol*, 29: 151-162.
- [133] Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. (2001) Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 2505-2512.
- [134] de Lima TH, Sass N, Mattar R, Moron AF, Torloni MR, Franchim CS, Daher S. (2009) Cytokine gene polymorphisms in preeclampsia and eclampsia. *Hypertens Res*, 32: 565-569.
- [135] Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. (1996) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 104: 154-159.
- [136] Haggerty CL, Ferrell RE, Hubel CA, Markovic N, Harger G, Ness RB. (2005) Association between allelic variants in cytokine genes and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 193: 209-215.
- [137] Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R. (2006) Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 55: 130-135.
- [138] Vural P, Degirmencioglu S, Saral NY, Demirkan A, Akgul C, Yildirim G, Issever H, Eroglu H. (2010) Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 36: 64-71.

- [139] Molvarec A, Jermendy A, Nagy B, Kovács M, Várkonyi T, Hupuczi P, Prohászka Z, Rigó J, Jr. (2008) Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *Clin Chim Acta*, 392: 52-57.
- [140] Rosta K, Molvarec A, Enzsöly A, Nagy B, Rónai Z, Fekete A, Sasvári-Székely M, Rigó J, Jr., Vér A. (2009) Association of extracellular superoxide dismutase (SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 142: 134-138.
- [141] Nagy B, Várkonyi T, Molvarec A, Lázár L, Hupuczi P, Than NG, Rigó J. (2009) Leptin gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Clin Chem Lab Med*, 47: 1033-1037.
- [142] Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6: 435-442.
- [143] Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14: 303-313.
- [144] Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, 277: 15028-15034.
- [145] Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. (2002) Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol*, 168: 2997-3003.
- [146] Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T. (2002) Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol*, 169: 2422-2429.
- [147] Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. (2002) Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*, 105: 685-690.

- [148] Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. (2003) Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol*, 58: 664-669.
- [149] Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimamura F, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M. (2004) Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection. *Am J Surg*, 187: 777-784.
- [150] Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. (2005) Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*, 91: 299-304.
- [151] Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. (2008) Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clin Exp Rheumatol*, 26: 659-662.
- [152] Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ. (2009) Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab*, 55: 31-40.
- [153] Njemini R, Demanet C, Mets T. (2004) Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. *Biogerontology*, 5: 31-38.
- [154] Njemini R, Bautmans I, Onyema OO, Van Puyvelde K, Demanet C, Mets T. (2011) Circulating heat shock protein 70 in health, aging and disease. *BMC Immunol*, 12: 24.
- [155] Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. (2005) Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*, 579: 1951-1960.
- [156] Liu Y, Li N, You L, Liu X, Li H, Wang X. (2008) HSP70 is associated with endothelial activation in placental vascular diseases. *Mol Med*, 14: 561-566.

- [157] Pockley AG, Calderwood SK, Multhoff G. (2009) The atheroprotective properties of Hsp70: a role for Hsp70-endothelial interactions? *Cell Stress Chaperones*, 14: 545-553.
- [158] Prohászka Z, Füst G. (2004) Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol*, 41: 29-44.
- [159] Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. (2005) Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol*, 175: 2900-2912.
- [160] Njemini R, Lambert M, Demanet C, Vanden Abeele M, Vandebosch S, Mets T. (2003) The induction of heat shock protein 70 in peripheral mononuclear blood cells in elderly patients: a role for inflammatory markers. *Hum Immunol*, 64: 575-585.
- [161] Kingston AE, Hicks CA, Colston MJ, Billingham ME. (1996) A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol*, 103: 77-82.
- [162] Tanaka S, Kimura Y, Mitani A, Yamamoto G, Nishimura H, Spallek R, Singh M, Noguchi T, Yoshikai Y. (1999) Activation of T cells recognizing an epitope of heat-shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. *J Immunol*, 163: 5560-5565.
- [163] Wendling U, Paul L, van der Zee R, Prakken B, Singh M, van Eden W. (2000) A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol*, 164: 2711-2717.
- [164] House SD, Guidon PT, Jr., Perdrizet GA, Rewinski M, Kyriakos R, Bockman RS, Mistry T, Gallagher RA, Hightower LE. (2001) Effects of heat shock, stannous chloride, and gallium nitrate on the rat inflammatory response. *Cell Stress Chaperones*, 6: 164-171.
- [165] Cooper AM, Khader SA. (2007) IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*, 28: 33-38.
- [166] Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. (2009) Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-

- producing CD4<sup>+</sup> T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol*, 183: 7023-7030.
- [167] Saito S. (2010) Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol*, 88: 615-617.
- [168] Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Tempfer C, Knofler M, Husslein P, Zeisler H. (2002) Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: a pilot-study. *Wien Klin Wochenschr*, 114: 730-732.
- [169] Fukushima A, Kawahara H, Isurugi C, Syoji T, Oyama R, Sugiyama T, Horiuchi S. (2005) Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 31: 72-77.
- [170] Boutet M, Roland L, Thomas N, Bilodeau JF. (2009) Specific systemic antioxidant response to preeclampsia in late pregnancy: the study of intracellular glutathione peroxidases in maternal and fetal blood. *Am J Obstet Gynecol*, 200: 530.e1-7.
- [171] Padmini E, Lavanya S, Uthra V. (2009) Preeclamptic placental stress and over expression of mitochondrial HSP70. *Clin Chem Lab Med*, 47: 1073-1080.
- [172] Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Kandemir NO, Aktunc E, Harma M, Harma MI, Ozdamar SO. (2010) Expression of heat shock protein 70 and endothelial nitric oxide synthase in placental tissue of preeclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pathol Res Pract*, 206: 651-656.
- [173] Roland-Zejly L, Moisan V, St-Pierre I, Bilodeau JF. (2011) Altered placental glutathione peroxidase mRNA expression in preeclampsia according to the presence or absence of labor. *Placenta*, 32: 161-167.
- [174] Molvarec A, Ito M, Shima T, Yoneda S, Toldi G, Stenczer B, Vásárhelyi B, Rigó J, Jr., Saito S. (2010) Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 203: 567.e1-8.
- [175] Futagami S, Hiratsuka T, Shindo T, Hamamoto T, Horie A, Ueki N, Kusunoki M, Gudis K, Miyake K, Tsukui T, Sakamoto C. (2008) Extracellular HSP70 blocks CD40L-induced apoptosis and tubular formation in endothelial cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 2: S222-228.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Molvarec A, **Szarka A**, Walentin S, Szűcs E, Nagy B, Rigó J Jr. (2010) Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with preeclampsia. *Hypertens Res*, 33: 892-898. (IF: 2.353)
2. **Szarka A**, Rigó J Jr, Lázár L, Bekő G, Molvarec A. (2010) Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol*, 11: 59. (IF: 3.0)
3. Molvarec A, **Szarka A**, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. (2011) Serum heat shock protein 70 levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in women with preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 412: 1957-1962. (IF: 2.535)

### Az értekezés témájától független közlemények

1. **Szarka A**, Gerlei Zs, Berkes E, Kóbori L, Molvarec A, Garamvölgyi Z, Rigó J Jr. (2008) Májtranszplantációt követően sikeresen kiviselt terhesség. *Magy Nőorv L*, 71(6): 277-279.
2. Molvarec A, Kalabay L, Derzsy Z, **Szarka A**, Halmos A, Stenczer B, Arnaud P, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. (2009) Preeclampsia is associated with decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein (fetuin-A) concentration. *Hypertens Res*, 32: 665-669. (IF: 2.426)
3. Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, Toldi G, Stenczer B, **Szarka A**, Nakashima A, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. (2011) Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 91: 56-63. (IF: 2.966)
4. Molvarec A, **Szarka A**, Walentin S, Bekő G, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. (2011) Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines,



- adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 124. (IF: 2.045)
5. 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. *Thromb Res*, 129: 470-473. (IF: 2.440)
  6. Lázár L, Nagy B, Molvarec A, **Szarka A**, Rigó J Jr. (2012) Role of hsa-miR-325 in the etiopathology of preeclampsia. *Mol Med Report*, 6: 597-600. (IF: 0.418)
  7. Wettstein D, Gerlei Zs, Rigó J Jr, **Szarka A**, Asztalos L, Langer R. (2012) Szolid szerv transzplantációját követő gyermekvállalás Magyarországon. *Magy Nőorv L*, 75(4): 4-7.

**Összegzett impakt faktor: 18.183.**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Rigó János Professor Úrnak, aki tudományos szemléletével elindított kutatómunkám során, és támogatta kutatási munkámat a kezdetektől egészen a disszertáció elkészítéséig, ugyanakkor munkahelyi vezetőmként lehetőséget biztosított tudományos munkám végzéséhez és disszertációm elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Molvarec Attila egyetemi adjunktus Úrnak, témavezetőmnek, aki időt és fáradságot nem kímélve segített kutatómunkám minden lépésénél.

Köszönetet mondok Bekő Gabriellának, Prohászka Zoltánnak, Nagy Bálintnak, Lázár Leventének, Makó Veronikának, Cervenak Lászlónak, Balogh Krisztiánnak, Mézes Miklósnak, Walentin Szilviának és Szigeti Antalnénak a laboratóriumi meghatározásokban nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I. számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak, kollégáimnak, akik támogatásukkal lehetővé tették disszertációm elkészítését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet szeretném kifejezni családomnak, a kutatómunkám végzéséhez és disszertációm létrejöttéhez biztosított nyugodt háttérért.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatómunkát a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kara támogatta.