DOI:10.14753/SE.2016.1883

Az endocannabinoid rendszer vizsgálata praeeclampsiában

Doktori értekezés

Dr. Fügedi Gergely

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Margittai Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Molnár Andrea, PhD., szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Siklósi György, Ph.D.,
az orvostudomány doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bazsa Sándor, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Keltai Katalin, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2015

DOI:10.14753/SE.2016.1883

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
1. BEVEZETÉS 6
1.1. A praeeclampsia általános bemutatása 6
1.1.1 A praeeclampsia jelentősége, epidemiológiája és rizikófaktorai 6
1.1.2. Szövődmények 8
1.1.3. Előrejelzés és megelőzés 9
1.1.4. Patofiziológia 11
1.1.5. Klinikai megjelenés 17
1.1.6. Terápia 18
1.2. Az endocannabinoid rendszer 20
1.2.1. Az endocannabinoid rendszerről általában 20
1.2.2. Az endocannabinoid rendszer cardiovascularis vonatkozásai 24
1.2.3. Reprodukció és az endocannabinoid rendszer 26
2. CÉLKITŰZÉSEK 31
3. MÓDSZEREK 32
3.1. A tanulmányban részt vevők 32
3.2. Szérumkoncentrációk meghatározása 33
3.3. Western blot és immunhisztokémia 34
3.4. Statisztikai analízis 36
4. EREDMÉNYEK 38
4.1. Szérum anandamid szint vizsgálata praeeclampsiában 38
4.1.1. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői 38
4.1.2. Laboratóriumi paraméterek 39
4.2. CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálata a placentában 42
4.2.1. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői 42
4.2.2. Western blot 43
4.2.3. Immunhisztokémia 47
5. MEGBESZÉLÉS 51
5.1. Szérum anandamid szint vizsgálata praeeclampsiában 51
5.2. CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálata a placentában 54

DOI:10.14753/SE.2016.1883

6. KÖVETKEZTETÉSEK 57
7. ÖSSZEFOGLALÁS 58
8. SUMMARY 59
9. IRODALOMJEGYZÉK 60
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 83
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 84

DOI:10.14753/SE.2016.1883

Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonoilglicerol
ADAM-12	ADAM metallopeptidáz domén 12
AEA	N-arachidonoiletanolamin
Akt	protein-kináz B
β-hCG	béta humán choriogonadotropin
BMI	testtömeg-index (body mass index)
cAMP	ciklikus adenozin-3'-5'-monofoszfát
CB1	cannabinoid receptor 1
COX-2	ciklooxigenáz-2
CRH	corticotropin-releasing hormon
CVD	cardiovascularis betegség (cardiovascular disease)
Δ^9-THC	delta-9-tetrahidrokannabinol
DAGL	sn-1-diacil-glicerol-lipáz
DIC	disszeminált intravascularis coagulopathia
eCB	endocannabinoid
ECS	endocannabinoid rendszer
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAAH	zsírsav-amid hidroláz (fatty acid amide hydrolase)
FAK	fokális adhéziós kináz
FSH	folliculus stimuláló hormon
GPR55	G-protein kapcsolt receptor 55
HELLP	haemolysis, emelkedett májenzim értékek, alacsony thrombocytaszám
HPLC-MS	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (high performance liquid chromatography-mass spectrometry)
IL	interleukin
IUGR	intrauterin növekedési retardáció
LH	luteinizáló hormon
LR	lipid raft
MAGL	monoacil-glicerol-lipáz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz

NADA	N-arachidonoildopamin
NAPE-PLD	N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz-D
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NO	nitrogén-monoxid
OEA	oleoiletanolamin
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein A
PEA	palmitoiletanolamin
PlGF	placentaris növekedés faktor (placental growth factor)
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PP13	placentaris protein 13
PPAR	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
ROS	reaktív oxigéngyök (reactive oxygene species)
sEng	szolubilis endoglin
sFlt-1	szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1
TGF-β	transzformáló növekedési faktor-β
TNF-α	tumor nekrózis faktor-α
TRPV1	1-es típusú vanilloid receptor (transient receptor potential vanilloid 1)
UtADV	arteria uterina Doppler áramlásmérés (uterine artery Dopple velocimetry)
VEGF	vascularis endothelialis növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

DOI:10.14753/SE.2016.1883

1. Bevezetés

1.1. A praeeclampsia általános bemutatása

1.1.1. A praeeclampsia jelentősége, epidemiológiája és rizikófaktorai

Bár a súlyos görcsrohammal járó szülészeti kórképet, az eclampsiát megelőző *praeeclampsiát* már több mint 2000 évvel ezelőtt felismerték és leírták, pontos patomechanizmusa a világszerte nagy aktivitással zajló kutatások ellenére napjainkig ismeretlen. A jellemzően a terhesség második felében megjelenő betegség teljes populációra becsült incidenciája primipara várandósoknál 3-8%, a fejlett országokban az anyai halálozások közel 15%-áért felelős [1, 2]. Ez az arány jelentősen magasabb ikerterheseknél (14%) és anamnézisükben praeeclampsiával rendelkező multipara nőknél (18%) [3-5]. Kutatások az elmúlt két évtizedben mind a teljes incidencia, mind a betegség súlyos formájának esetszám-növekedését kimutatták a világ fejlett régióiban [6, 7], amely elsősorban a betegséget kiváltó ismert rizikófaktorok növekvő előfordulásának eredménye. Ez igen nagy jelentőséget ad a betegségre irányuló mindenfajta kutatásnak, hiszen jelenleg sem megelőzésében, sem kezelésében nem rendelkezünk olyan, érdemben hatásos módszerrel, amely a terhesség megtartását is lehetővé teszi. Ez alapján szerencsésnek mondható, hogy a praeeclampsia primipara várandósoknál az esetek 75%-ában enyhe formában jelentkezik, a perinatalis mortalitás mértéke pedig súlyos formákban is viszonylag alacsony [8].

A betegség legfőbb rizikófaktorait az *1. táblázat* sorolja fel. Az anya alapvető általános és szülészeti jellemzői közül több is meghatározó lehet a kialakulás szempontjából. A 40 év feletti várandósok kétszeres kockázattal rendelkeznek a betegségre vonatkozóan, függetlenül attól, hogy primi- vagy multiparák [9], míg a primiparitás önmagában közel háromszorosára növeli a kialakulás kockázatát [10-12]. Praeeclampsia előfordulása az adott várandós szülészeti és családi anamnézisében is növeli a betegség kialakulásának kockázatát: az első terhességben kialakult betegség hétszeresére növeli a kialakulás veszélyét a második gyermeknél, míg a pozitív családi anamnézis (édesanya kórtörténetében praeeclampsia) háromszoros kockázatnövekedést jelent [12-15]. Ikerterhesség a kialakulás kockázatát közel háromszorosára növeli [10, 12, 16].

Számos betegség is szerepet játszik a praeeclampsia kialakulásában, ezek közül kiemelendő az inzulin-dependens diabetes mellitus (négyszeres kockázat) [12, 17, 18], előzetesen kialakult hypertonia [19, 20], vesebetegség [20], krónikus autoimmun betegség [21] és az antifoszfolipid-szindróma [22, 23].

1. táblázat. A praeeclampsia rizikófaktorai [24, 25]

- magas anyai életkor
- primiparitás
- többes terhesség
- előző terhességben praeeclampsia
- családi anamnézisben praeeclampsia
- krónikus betegségek
    - inzulin dependens diabetes mellitus
    - chronicus hypertonia
    - vesebetegség
    - autoimmun megbetegedés
    - antifoszfolipid szindróma
- előző terhesség óta eltelt hosszú idő
- limitált spermaexpozíció
- donor-inseminatio, oocyta donáció, embryo donáció
- az anya alacsony születési súlya
- obesitas és inzulin-rezisztencia
- anyai fertőzés

Összefüggést találtak a praeeclampsia kialakulásának veszélye és az előző terhesség óta eltelt időtartam hossza között, ez alapján minél később következik be az újabb terhesség, annál nagyobb a betegség kialakulásának valószínűsége; 10 évvel az előző terhesség után a rizikó lényegében megegyezik egy primipara várandós rizikójával [26, 27]. Szintén magasabb kockázati csoportba esnek azok a nők, akik a megtermékenyülés előtt azonos partnertől limitált ideig voltak kitéve spermaexpozíciónak, ez magyarázhatja azt is, hogy miért gyakoribb a betegség a 20 évnél fiatalabb terhesekben, mivel ott nincsen idő a hosszútávú spermaexpozíció protektív hatásának kialakulására [28]. Az apai faktorok szerepére utal, hogy a korábbi, praeeclampsiával végződő terhesség után a partnerváltás csökkenti az újbóli kialakulás kockázatát [29].

Kifejezett rizikófaktor önmagában az obesitas (átlagosan kétszeres kockázat különböző felmérések szerint) és az inzulinrezisztencia is [30-34]. 35 feletti testtömeg-

indexxel (BMI) rendelkező nők esetében a praeeclampsia kockázata négyszeres volt a 19-27-es BMI közötti értékekkel rendelkező várandósokhoz képest [32].

Egy másik megközelítés alapján az egészséges terhesség is egyfajta szisztémás gyulladásos állapot, főként a harmadik trimeszterben. Ez alapján a praeeclampsia nem egy önálló betegség, csupán egy extrém szélsőséges megjelenése az anyai szervezet terhességre adott gyulladásos reakciójának. Ennek megfelelően minden olyan betegség, amely erősíti ezt a gyulladásos választ, egyben rizikófaktora is a praeeclampsiának, többek közt az urogenitalis és periodontalis fertőzések, chlamydia, cytomegalovírus fertőzés. [21, 35, 36].

1.1.2. Szövődmények

A kialakult praeeclampsia kimenetele a következő meghatározó tényezőktől függ: terhességi kor a betegség kezdetekor, a kórkép súlyossága, a kezelés minősége és más fennálló anyai társbetegségek jelenléte vagy hiánya [3, 24]. A 36. gestatiós hetet követően kialakult, enyhe fokú kórkép jellemzően kedvező kimenetelű, míg jelentősen magasabb morbiditás és mortalitás jellemzi azon nőket, akiknél a kórkép kialakulása a 33. gestatiós hét előtt, vagy várandósságot megelőzően fennálló betegség mellett következik be, illetve ha az illető kevésbé fejlett egészségüggyel rendelkező ország lakosa [3, 8, 24, 37, 38]. A súlyos praeeclampsiában kialakuló szövődményeket a *2. táblázat* listázza.

Több tanulmány számolt be arról, hogy praeeclampsiával komplikált terhességen átesett nőknél későbbi életkorban a cardiovascularis betegségek (cardiovascular disease, CVD) kialakulásának kockázata szignifikánsan magasabb [39-42], súlyos, korai kezdetű preeclampsia esetén pedig ez a kockázat több mint kilencszeresére nő az egészséges terhességen átesett nőkhöz viszonyítva [43]. A jelenségre több lehetséges magyarázat is létezik, ezek egyike szerint a praeeclampsia közvetlen okozója a cardiovascularis betegség kialakulásának, míg más elmélet alapvetően fogékony anyai szervezetet feltételez, amelyet a várandósság által okozott addicionális stressz indít el a korai CVD megjelenés irányába [44]. Ezt az elméletet erősíti meg, hogy számos tényező egyaránt rizikófaktora a CVD-knek és a praeeclampsiának is (pl. chronicus hypertonia, obesitas, diabetes) [40].

A betegség kezelésének egyetlen definitív gyógymódja, a terhesség befejezése ellenére egyes esetekben tovább progrediál a kórkép a szülést követő 48 órában. Ekkor nagyobb eséllyel fordul elő veseelégtelenség, postpartum eclampsia, tüdőoedema, HELLP-szindróma és stroke [45].

2. táblázat. Anyai és magzati komplikációk súlyos fokú praeeclampsiában [24]

Anyai komplikációk

- lepényleválás (1-4%)
- DIC / HELLP-szindróma (10-20%)
- tüdőoedema / aspiráció (2-5%)
- akut veseelégtelenség (1-5%)
- eclampsia (<1%)
- májelégetelenség vagy májhaematoma (<1%)
- stroke (ritka)
- halál (ritka)
- hosszútávú cardiovascularis morbiditás

Magzati komplikációk

- koraszülés (15-67%)
- intrauterin növekedési retardáció (10-25%)
- hypoxiás neurológiai károsodás (<1%)
- perinatalis halálozás (1-2%)
- felnőttkori hosszútávú cardivascularis morbiditás összefüggésben az alacsony születési súllyal

1.1.3. Előrejelzés és megelőzés

A közelmúltban számos kutatás irányult olyan módszerek és biomarkerek azonosítására, amelyek megjósolhatják a praeeclampsia kialakulását már az első trimeszterben [46, 47]. Több marker (úm. PAPP-A és PP13 [48], inhibin A, activin A, α-fetoprotein, szabad β-hCG [49]) önálló mérése és egyéb módszerek, mint a placenta morfológiai és/vagy perfúziós vizsgálata [50], illetve az arteria uterina Doppleres áramlásmérése (UtADV) [51, 52], azonban nem hoztak meggyőző eredményeket.

Nagyobb sikerrel alkalmazták a fenti és további biomarkerek kombinációját: a hét leginkább kutatott marker (ADAM 12, szabad β-hCG, inhibin A, activin A, PP13, PlGF és PAPP-A) kettős vagy többes kombinációja az első trimeszterben 55-75%-os valószínűséggel jelezte előre a betegség korai formájának, míg 30-40%-os biztonsággal

bármely praeeclampsia típus kialakulását (10%-os fals pozitív arány mellett) [47]. További tanulmányok magasabb sikeres előrejelzési arányt közöltek a markerek mellett további faktorok bevonásával (anyai jellemzők, szülészeti anamnézis, UtADV, artériás középnyomás), azonban ezen kísérletek tartalmaznak számított vagy szimulált adatokat is, ezért nem összehasonlíthatóak megbízhatóan a tradicionális mérési módszereken alapuló mérésekkel [53-55].

A praeeclampsia feltételezett patomechanizmusai közül az utóbbi években leginkább az angiogén és antiangiogén faktorok közötti kóros egyensúly kialakulásának elmélete terjedt el, amelynek részleteit a 1.1.4. alfejezet tartalmazza. Ezen faktorok plazmaszintje alapján előre jelezhető a korai kezdetű praeeclampsia kialakulása [56], valamint több tanulmány szerint a plazmaszint eltérés mértéke korrelál a kialakuló betegség súlyosságával [57, 58].

Összességében elmondható, hogy a kombinált mérési módszerek (különösen azon esetekben, ahol biomarkerek alkalmazását UtADV-vel kombinálják) leginkább a korai kezdetű praeeclampsia detektálásában teljesítenek jól már első trimeszterben is, míg a késői kezdetű betegségformát gyengébb eredményekkel mutatják ki [59]. A betegség összes terhességhez viszonyított alacsony incidenciája miatt azonban a biomarkerek mérésének szűrő tesztként való alkalmazása nehézkes [46], ezáltal elsősorban magas kockázatú várandósoknál preferált [29], a praeeclampsia széleskörű, olcsó és megbízható szűrése és előrejelzése pedig továbbra is megoldandó feladat.

A praeeclampsia megelőzésére irányuló stratégiák a mai napig változó eredményt adnak több módszer esetében is. A prostacyclin és thromboxán közötti egyensúlyzavar, mint a praeeclampsia lehetséges oka [60] vetette fel a trombocita aggregáció gátlók, ezen belül az aspirin alkalmazását megelőzés céljából. Az ezirányú vizsgálatok eredményei megoszlanak. Egy multicentrikus randomizált klinikai vizsgálat alacsony dózisú aspirin szedése mellett nem mutatott ki szignifikáns csökkenést a praeeclampsia előfordulásában [61], ugyanakkor a koraszülés előfordulási valószínűségének csökkenését állapította meg. Később egy másik metaanalízis a korai kezdetű praeeclampsia incidenciájának 50%-os (RR 0,47, 95% CI 0,34-0,65) csökkenését írta le szülészeti anamnézis vagy kóros UtADV mérés következtében megállapított magas kockázatú nők esetén, akik 16. gestatiós hét előtt alacsony dózisú aspirin terápiában

részesültek [62]. További kiterjesztett metaanalízisek megerősítették ez utóbbi eredményt [63, 64], azonban mivel az utóbbiak csak alcsoport analízisekből származnak, randomizált, kontrollált vizsgálatok szükségesek a biztos validáláshoz.

Az oxidatív stressz praeeclampsiában betöltött szerepéből kiindulva antioxidánsok alkalmazását is vizsgálták. Bár a C és E vitaminok adása önmagában nem bizonyult eredményesnek a megelőzésben [65], 24. gestatiós hetet megelőző, L-argininnal kombinált adásuk 63%-kal csökkentette a betegség előfordulását személyes vagy családi anamnézis alapján magas kockázatúnak ítélt betegek esetében [66]. A biztató eredmények további megerősítést igényelnek.

A kalciumhiány, mint a betegség kialakulásának lehetséges összetevője, indokolta a kalciumpótlás alkalmazásának vizsgálatát, alapvetően azonban nem találtak szignifikáns csökkenést kalciumbevitel esetén sem az incidenciát, sem a betegség súlyosságát tekintve [67]. Eredményt mindössze az alacsony baseline kalcium bevitelű egyének esetében sikerült kimutatni [68].

Az angiogén és antiangiogén faktorok közötti egyensúlyzavar visszaállításában a sztatinok pleiotrop hatásuk révén játszhatnak szerepet, amely által stimulálhatják a trophoblastok PlGF termelését, javíthatják az endothel funkciót, fokozhatják a hemoxigenáz-1 működését és csökkenthetik az oxidatív stresszt [69]. E célból a vízben oldódó sztatinok alkalmazását vizsgálják, amelyek eddigi eredmények szerint nem okoznak a lipofil sztatinokhoz hasonlóan kongenitális rendellenességeket [70]. További lehetőségként merült fel az antiangiogén túlsúly visszaszorítására vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) adása [71, 72] vagy a szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) extracorporalis eltávolítása [73], azonban ezen módszerek valószínűleg nem alkalmasak a már kialakult kórkép kezelésére, eredményességük pedig további vizsgálatokat igényel.

1.1.4. Patofiziológia

A praeeclampsia tünetegyüttesének kialakulása minden esetben a placenta jelenlétéhez kötött, utóbbi szerepének fontosságát számos megfigyelés támasztja alá. Ezek közül a legszemléletesebb bizonyíték a molaterhességben, magzat nélkül is fellépő betegség, ahol a tünetek a mola eltávolítása után megszűnnek [74]. Méhen kívüli terhességben kialakult praeeclampsia esetén a magzat eltávolítása önmagában nem, csak a placenta

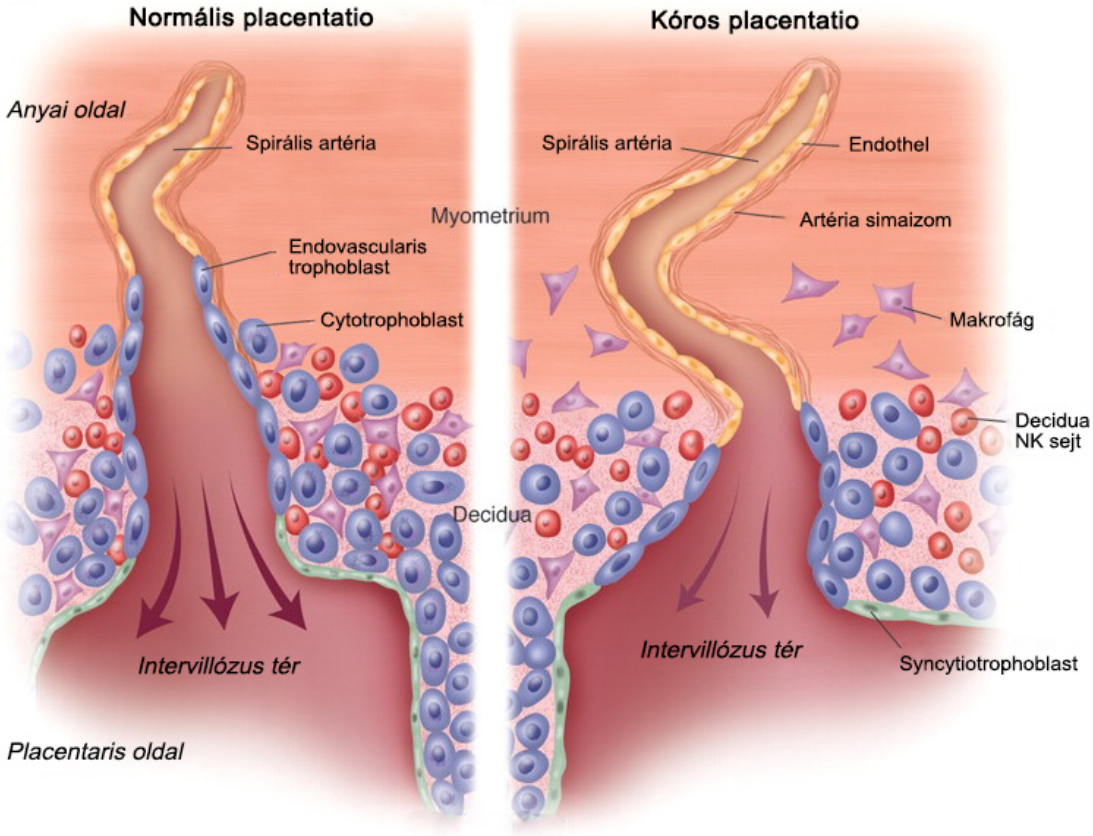
kivételével együtt eredményezett állapotjavulást [75], valamint leírt jelenség a placenta retenció következtében kialakuló postpartum eclampsia, amely esetekben méhűri betapintást és curettage-t követően rapid állapotjavulást tapasztaltak [76].

A betegség pontos oka a mai napig tisztázatlan. A meghatározást bonyolítja az a felvetés, amely szerint elképzelhető, hogy több betegség hasonló formában való megjelenéséről van szó, a meglehetősen általános diagnosztikus kritériumokból adódóan. A praeeclampsia két nagy kategóriájaként a placentaris és maternalis típust különítik el [77]. A placentaris formát a szakirodalomban elterjedt kétlépcsős praeeclampsia modell írja le: az első lépcső a placenta kóros kialakulása („poor placentation", azaz kóros placentáció), majd a második lépcső az ebből következő hypoxiás állapot, következményes oxidatív stressz és a klinikai tünetek megjelenése. A maternalis forma esetében a normális placenta kóros anyai gyulladásos reakciókészséggel párosul, a tünetek ezen fokozott szisztémás gyulladásos válaszreakción alapulnak. A klinikai tünetegyüttes kiinduló pontja mindkét típusban a generalizált anyai endothel diszfunkció.

1.1.4.1. Spirális artériák és kóros placentáció

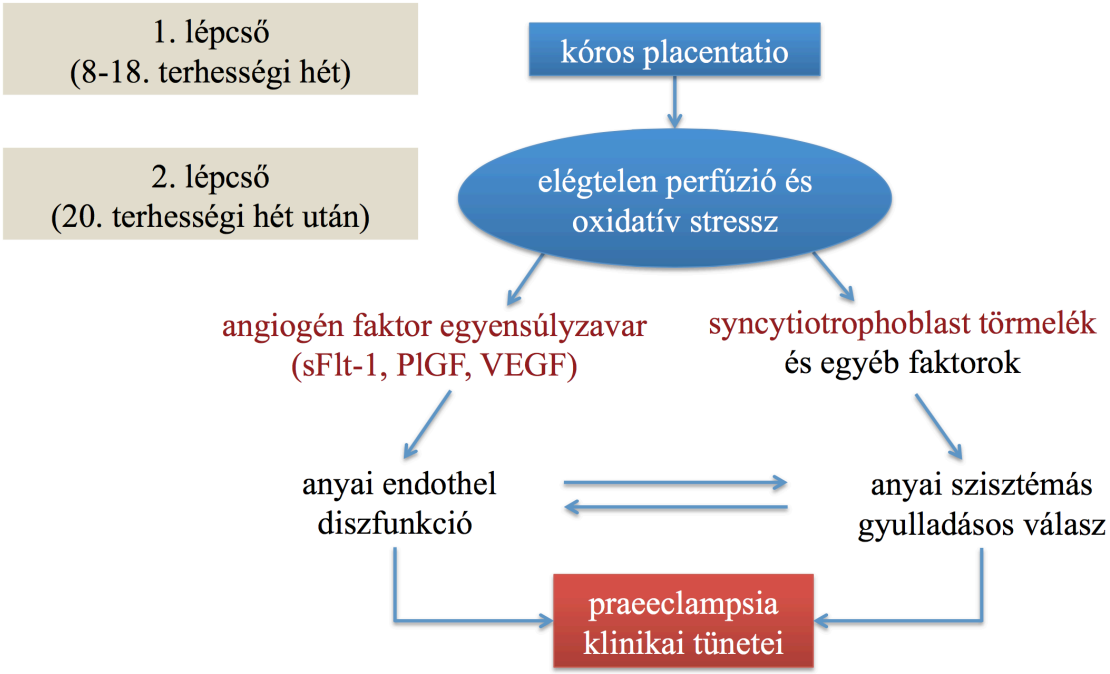
A placentaris praeeclampsia kialakulásának során központi szerepet játszik a decidua spirális artériáinak elégtelen átépülése [78]. A spirális artériák az uteroplacentaris keringés azon végartériái, amelyek az anyai artériás vért az intervillózus térbe juttatják. A terhesség 7-8. hetéig azonban az intervillózus tér nem kommunikál közvetlenül a spirális artériákkal; az utóbbiak disztális végét trophoblast dugók tömítik el [79], amelyek feltehetően védelmet nyújtanak a magzatnak a magas oxigén koncentráció ellen, idő előtti elvesztésük pedig vetéléshez vagy praeeclampsia kialakulásához vezethet. A 9. hét után megindul a spirális artériák recanalisatiója a dugók leépülésével, a trophoblastok intravascularis migrációjának köszönhetően [80]. Az extravillózus invazív cytotrophoblastok behatolnak az érfal endothelbe és mediába, szétroncsolva annak elasztikus, muscularis és neurális elemeit, ezáltal a szűk átmérőjű, magas rezisztenciájú artériákból tág, nagy kaliberű, vasomotoros kontrollal nem rendelkező, petyhüdt kapacitancia ereket létrehozva (remodelling) [77, 81-83]. A 20. terhességi hétig tartó folyamat során az invazív cytotrophoblastok epithelialis sejtekre jellemző adhéziós sejtfelszíni molekuláinak expressziója downregulálódik, és endothel sejtekhez

hasonló felszíni adhéziós fenotípust vesznek fel – ezt a folyamatot *pseudovasculogenesisnek* nevezik [84].



1. ábra. Kóros placentáció és praeeclampsia *Redman* ábrája alapján [77]

Praeeclampsiában az utóbbi folyamat zavart szenved: a cytotrophoblastok fenotípusváltása elégtelen, ezáltal nem képesek megfelelően betörni a spirális artériák falába [85-88], az átépülés a decidua superficialis rétegére limitált, a myometrialis szegmentumok szűkek maradnak (lásd *1. ábra*). Ez a kétlépcsős modell első (preklinikai) fázisa, amely a terhesség 20. hetéig, már a klinikai tünetek megjelenése előtt végbemegy [77]. A fokozodó oxigénigény miatt oxidatív stresszben szenvedő placenta a modell második (klinikai) fázisában kóros mértékben juttat antiangiogén faktorokat és trophoblast eredetű sejttörmelék-aggregátumokat az anyai keringésbe, amelyek a klinikai kórkép kialakulásához vezetnek (lásd *2. ábra*). Ezen folyamatok az alábbiakban kerülnek részletes kifejtésre.



2. ábra. A praeeclampsia patogenezisének kétlépcsős modellje [77]

1.1.4.2. Angiogén faktorok szerepe praeeclampsiában

Napjainkig tisztázatlan az angiogén faktorok pontos szerepe praeeclampsiában, funkciójukról megoszlik a szakma véleménye. Egyes kutatások szerint a pro- és antiangiogén faktorok egyensúlyzavara szerepet játszik a placentaris érfejlődésben, és oka lehet az elégtelen cytotrophoblast inváziónak [81]. A szolubilis VEGF receptor sFlt-1 csökkenti a cytotrophoblastok invazivitását *in vitro* [85], ezen fehérje szintje fiziológiásan csak a harmadik trimeszterben emelkedik meg [57], amely egy természetes antiangiogén válaszfolyamat lehet a placenta angiogén fázisának befejeződésére. Egy másik faktor, a transzformáló növekedési faktor-β (TGF-β) szintje fordított korrelációt mutat a cytotrophoblast inváziával: normál terhességben a 9. héten mutat csökkenést, segítve a trophoblast inváziót. Mindkét előbbi folyamat zavara, úm. az sFlt-1 korai emelkedése, vagy a TGF-β szint késői csökkenése kóros placentációhoz, ezáltal praeeclampsia kialakulásához vezethet [89, 90].

A fentiekkel ellentétben a praeeclampsia kétlépcsős modelljében az angiogén faktorok egyensúlyzavara az elégtelen arterialis remodelling következtében kialakuló hypoxia következménye. A hypoxiás környezet reaktív oxigén gyökök megjelenését

eredményezi [91], amelyek oxidatív stresszt és placenta diszfunkciót okoznak, következményes endoplazmatikus retikulum stresszel és kóros proteinszintézissel [92], valamint elősegítik a syncytialis csomók („syncytial knots”) képződését [93]. Utóbbiak degeneratív syncytiotrophoblastokból kialakuló sejtklaszterek, amelyeket az antiangiogén faktorok domináns forrásaként azonosítottak praeeclampsiában [94]. Az utóbbi években a tudományos kutatások célpontjába kettő, placentából származó antiangiogén faktor, az sFlt-1 és a szolubilis endoglin (sEng) került, amelyek szintje emelkedett praeeclampsiában, velük párhuzamosan a proangiogén fehérje VEGF és PlGF szintjei pedig csökkentek [95-97].

A praeeclampsia patogenezisében leginkább kutatott sFlt-1 a VEGF és PlGF receptor Flt-1-ből alternatív splicing mechanizmus útján, a transzmembrán és intracelluláris szignalizációs domén elvesztésével keletkező szolubilis fehérje [83], hatását a VEGF és PlGF faktorok keringésben történő megkötésével fejti ki. Praeeclampsiában a kóros placentaris expresszió következtében emelkedett az sFlt-1 szintje [96]; az eltérés hetekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt kimutatható. A szérum sFlt-1/PlGF arány emellett a standard klinikai paramétereknél (vérnyomás, proteinuria és egyéb laborértékek) erősebb prediktív értékkel bír két hetes távlatban a magzati és anyai kimenetelre nézve [98], illetve erősen korrelál a terhesség hátralevő időtartamával [99] (ez alól kivételt képeznek a betegség egyes, későn manifesztálódó esetei, amikor nem tapasztalható angiogén faktor eltérés [100] – ez felveti a félrediagnosztizálás lehetőségét, vagy egy második, benignus betegségtípus létezését). *In vitro* kimutatták az sFlt-1 vasoconstrictív, endothel diszfunkciót okozó hatását: állatmodellben a keringő sFlt-1 szint növelésével humán praeeclampsiára jellemző tüneteket idéztek elő; illetve a méh vérellátásának korlátozása patkányokban és főemlősökben is a keringő és placentaris sFlt-1 szint növekedését eredményezte [101, 102]. Mindezek alapján a magas sFlt-1 expresszió közvetlen összekötő kapocs a placentaris diszfunkció és az anyai endothel diszfunkció között.

A TGF-β sejtfelszíni receptorából eredő sEng (CD105) szérumszintje praeeclampsiában az sFlt-1-hez hasonló mintázatot mutat, a faktor állatmodellben felerősíti az sFlt-1 endothelkárosító hatását, súlyos praeeclampsia-szerű szindrómát létrehozva [103]. A sEng szintje az sFlt-1-hez hasonlóan hetekkel a klinikai tünetek kialakulása előtt megemelkedik [104, 105]. Praeeclampsiás nőktől származó

placentából nyert trophoblast sejtkultúra megnövekedett sEng és sFlt-1 expressziót mutatott mind normoxiás, mind hypoxiás körülmények között normál trophoblastokhoz képest [106]. A fenti hasonlóság közös upstream regulációt feltételez a két faktor esetében.

A VEGF/PlGF útvonalak szignalizációs zavarának jelentőségét praeeclampsiában további megfigyelések is alátámasztják. A VEGF egyik alapvető funkciója az endothelsejtek stabilizációja, amely szerepe különösen fontos a vese glomerulus, máj és agy fenesztrált endotheliumában [107]. A humán onkoterápiás vizsgálatok során alkalmazott érfejlődést gátló anti-VEGF kezeléseknél a praeeclampsiának megfelelő karakterisztikát mutató proteinuria, magas vérnyomás és a glomerularis endothel fenesztrációjának csökkenése mutatkozott [108], amely látványosan illusztrálja a VEGF antagonizmus hatásait, egyben megerősíti az azonos hatású sFlt-1 kórosan magas szérumszintjének patognosztikus szerepét. A PlGF fiziológiás szerepe kevésbé tisztázott, azonban feltételezhetően angiogenesist stimuláló hatással bír az ischaemia, gyulladás vagy sebgyógyulás folyamataiban [109]. Terhes patkányokban a VEGF és PlGF együttes gátlása szükséges praeeclampsia-szerű tünetek kiváltásához, amely az sFlt-1 által okozott PlGF gáltás szerepét hangsúlyozza az endothel diszfunkció kialakulásában [96].

1.1.4.3. A placentaris törmelék hipotézis

A placentaris praeeclampsia kialakulásában az antiangiogén túlsúly mellett egyéb folyamatok szerepét is feltételezik. Az oxidatív stressz hatására a lepényben apoptotikus és nekrotikus folyamatok indulnak meg, amelyek a syncytialis struktúra felbomlásához vezetnek [110]. Ennek következtében az intervillózus térből placentaris trophoblast törmelék kerül az anyai keringésbe, amely syncytiotrophoblast membrán mikropartikulumokat, cytokeratin fragmentumokat, szolubilis magzati RNS-t és DNS-t, valamint cytotrophoblastokat is tartalmaz [111]. Ezen törmelék proinflammatórikus hatású, és mennyisége megnövekedett praeeclampsiában [77, 112], amely az angiogén faktorok mellett a betegség kialakulásának másik lehetséges útvonalát feltételezi; ez a placentaris törmelék hipotézis („placental debris hypothesis”).

1.1.4.4. Maternalis praeeclampsia

A fentiekben bemutatott placentaris praeeclampsia típussal szemben maternalis praeeclampsia esetében a kiváltó ok (egészséges lepény mellett) az anyai szervezet kóros gyulladásos reakciókészsége [113]. Ezen esetekben jellemző valamely predisponáló, szisztémás gyulladással vagy microvascularis károsodással járó krónikus megbetegedés jelenléte, úm. obesitas, diabetes mellitus, hypertonia vagy egyéb artériás betegség [77]. Ez esetben a terhesség egyfajta metabolikus és vascularis stressz tesztként jelenik meg, amely kórosan magas válaszreakciót kiváltva eredményezi a praeeclampsia kialakulását.

1.1.5. Klinikai megjelenés

Az előbbiekben felvázolt patofiziológiai útvonalak lényegében egy kóros vaszkuláris válaszreakcióhoz vezetnek, amely szisztémás gyulladás kialakulását jelenti. A folyamat része a vaszkuláris ellenállás megnövekedése, a fokozott thrombocyta aggregáció és az alvadási rendszer aktivációja, valamint általános endothel diszfunkció [114]. A klinikai szindróma elkülöníthető anyai (maternalis) és magzati (fetalis) szindrómára: az előbbire jellemző a hypertonia és proteinuria, illetve egyéb esetleges multiszisztémás eltérések; az utóbbira a magzat növekedésbeli elmaradása, csökkent amnialis folyadékmennyiség és elégtelen magzati oxigenizáció [3, 113, 114]. Az anyai tünetegyüttes esetében jelentős az eltérés a terminusközeli időszakban fellépő, kimutatható magzati eltérést nem eredményező praeeclampsia, és a koraszüléssel, alacsony születési súllyal járó forma között [113, 115]. Fontos elkülönítési szempont a betegség megjelenési ideje, amely szerint megkülönböztethető korai praeeclampsia (a 34. betöltött terhességi hét előtt fellépő tünetek esetén), és késői praeeclampsia (terminus előtt, vajúdás alatt, vagy postpartum megjelenés esetében) [8, 115].

A betegség általános diagnosztikus kritériuma a várandósság 20. hetét követően fellépő hypertonia (140 Hgmm-es vagy azt meghaladó systolés, vagy 90 Hgmm-es vagy azt meghaladó diastolés vérnyomásérték előzetesen normotenzív nőkben, legalább két alkalommal, hét napon belül, de minimum 4-6 óra különbséggel mérve [3]) és proteinuria (vizeletben megjelenő legalább 300 mg fehérje 24 óra alatt) fellépte. A korábban fennálló hypertonia talaján kialakuló betegséget rárakódásos (superimposed) praeeclampsiaként különböztetik meg, amely rendszerint rosszabb anyai és magzati

morbiditási, mortalitási következményekkel jár [114]. Emellett a kórkép atípusos formája megjelenhet a 20. terhességi hét előtt, a két fő tünet egyikének önálló prezentációjával, illetve postpartum két napon túl is, amely eshetőségek bonyolítják a diagnózis felállítását [116].

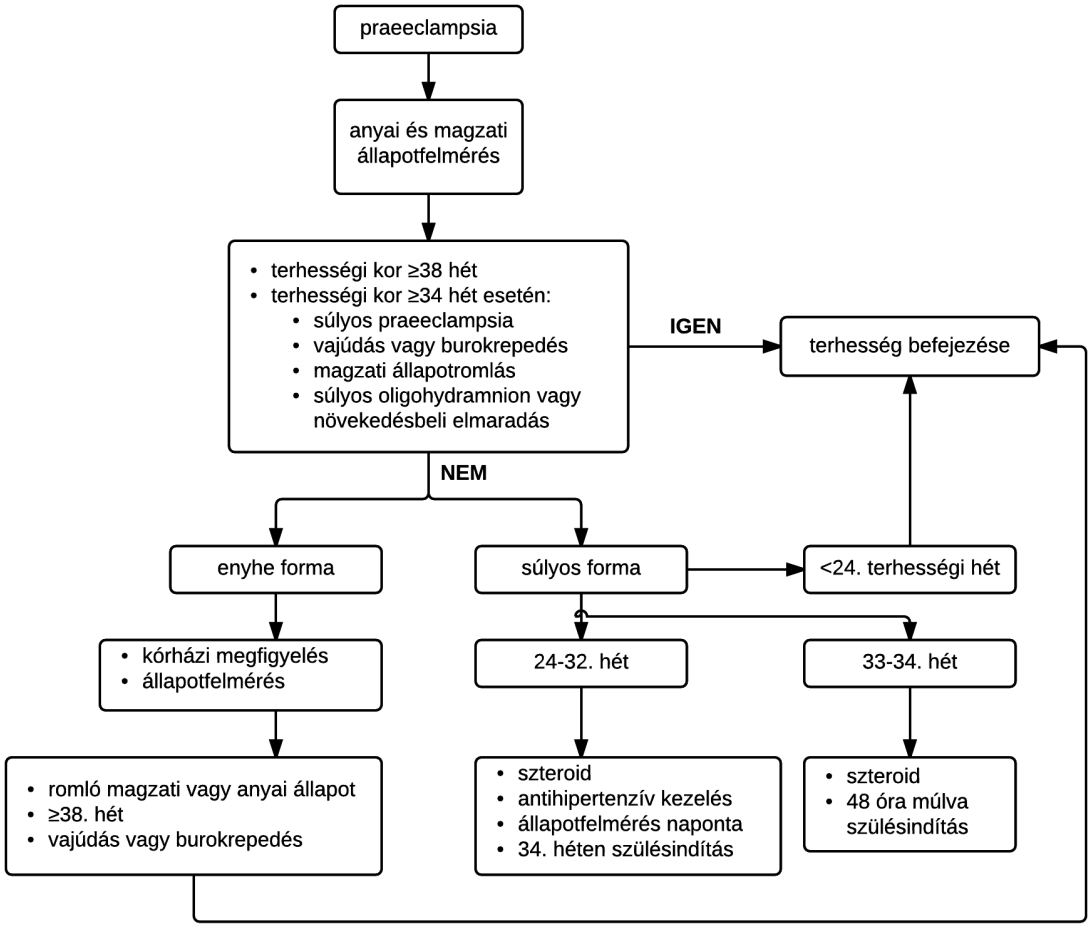
A praeeclampsia súlyos formája (praeeclampsia gravis gradus) diagnosztizálható, amennyiben a hypertonia és/vagy proteinuria súlyos formája jelenik meg (hypertonia esetén ≥160 Hgmm systolés vagy ≥110 Hgmm diastolés érték; illetve 5 g/24 óra, vagy ezen érték feletti fehérjeürítés). Ezen kívül súlyosnak minősül a betegség társuló szervi eltérések jelenlétében, úm. tüdőoedema, cynosis, szívelégtelenség, hyperreflexia, perzisztens vagy súlyos központi idegrendszeri zavarok (megváltozott mentális státusz, fejfájás, látászavar vagy vakság), oliguria (<500 ml/nap vizelet), 100 000/mm^3 alatti thrombocytaszám, valamint kóros májenzimszintek és epigastrialis fájdalom megjelenésekor [3, 117, 118].

1.1.6. Terápia

A praeeclampsia kezelésének különböző alkalmazott és kutatás alatt álló formái kívül esnek jelen dolgozat témáján, ezért a terápiás megoldásokról csupán rövid áttekintés formájában esik szó. Napjainkig a betegség egyetlen definitív terápiája a szülés indukálása, ezáltal a magzat és a placenta világra segítése [24, 46, 81]. Minden egyéb beavatkozás az anya és a magzat védelmére irányul, figyelembe véve az anyai és magzati károsodások minimalizálását és a magzat intrauterin fejlődésének időben minél további biztosítását. Ennek értelmében érett, terminusközeli állapotban a szülés megindítása a választandó út, míg éretlen/kora magzat esetén a szülész feladata a koraszülés és a szülés halasztása következtében potenciálisan kialakuló szövődmények kockázata közötti mérlegelés [119]. A praeeclampsia kezelésének főbb szempontjait és lépéseit a *3. ábra* foglalja össze.

A szülésindítás előtt alkalmazott expektáns (várakozó, kiváró) kezelés fő elemei az akut hypertoniás krízis és a görcsroham prevenciójára irányulnak. Antihipertenzív szerek csökkentik a súlyos hypertoniás roham kockázatát, azonban a betegség természetes lefolyását nem változtatják meg [3], ennek megfelelően nem mutattak ki érdemi változást a magzati perinatalis halálozás, a koraszülés és az alacsony születési súly értékeiben [120]. A súlyos görcsrohammal jelentkező eclampsia megelőzésére

magnézium-szulfát adása javasolt, amely a diazepamhoz képest 52%-kal, a phenytoinhoz képest 67%-kal eredményesebben csökkenti a görcs kialakulásának arányát [121, 122].



3. ábra. A praeeclampsia terápiás stratégiája [24]

1.2. Az endocannabinoid rendszer

1.2.1. Az endocannabinoid rendszerről általában

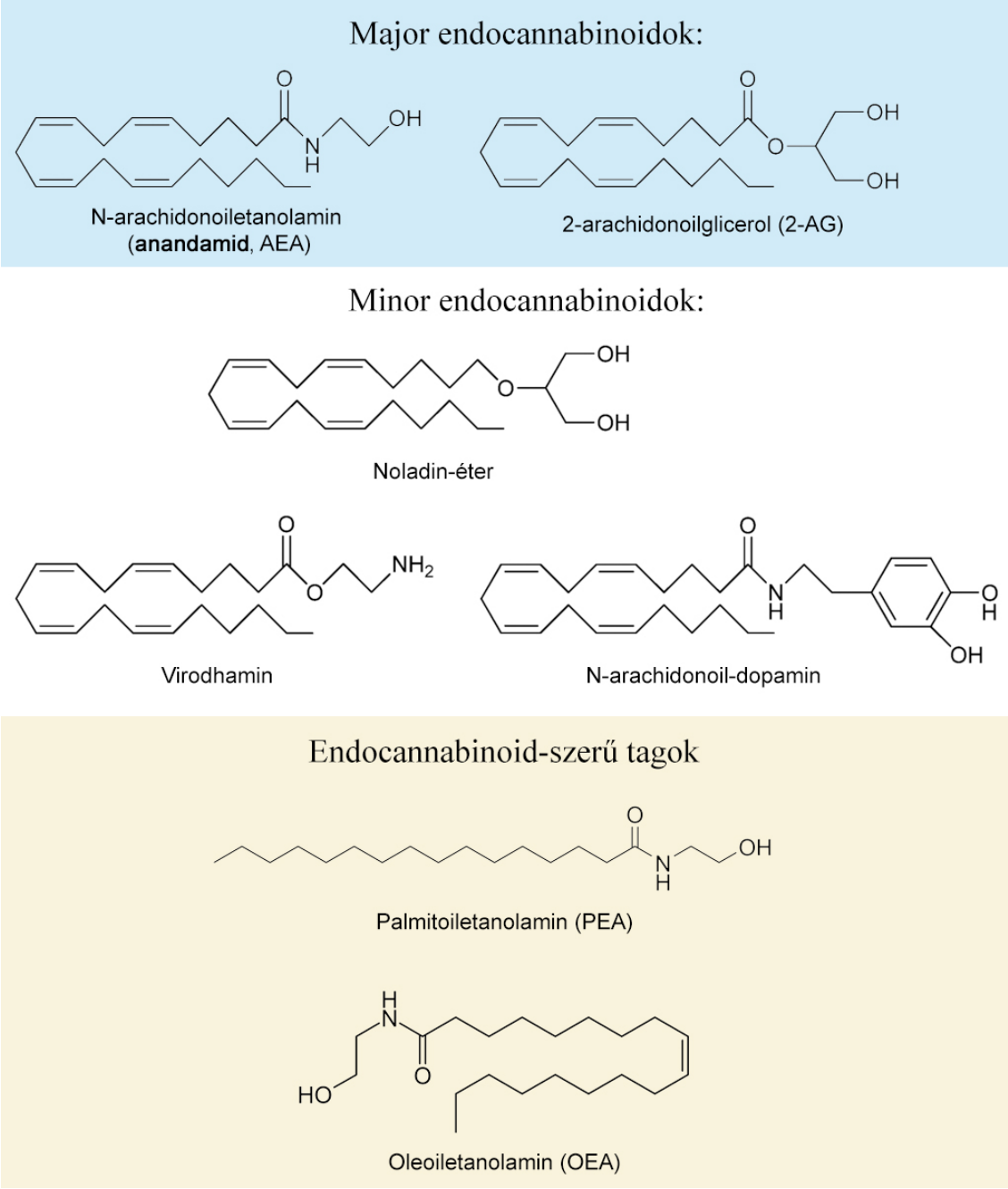
Bár a *Cannabis sativa* (kender) tulajdonságait évszázadok óta ismerték számos kultúrában, a hatásáért felelős fő komponensét, a Δ^9-tetrahidrokannabinolt (THC) csak 1964-ben izolálták. Lipofil természete miatt feltételezték, hogy pszichotróp aktivitását nem specifikus receptoron, hanem a membránfluiditás megváltoztatásán keresztül fejti ki, azonban a ’80-as évek közepén számos szelektív hatására derült fény, amelynek nyomán aktív kutatás indult a cannabinoid receptor után. Végül az 1980-as évek végén fedezték fel az első cannabinoid receptort (CB1), majd 1993-ban a másodikat (CB2) [123-125]. Ezen kutatásokkal párhuzamosan, 1992-ben azonosították az első, cannabinoid hatással bíró endogén molekulát, az anandamidot [126], ezzel lényegében felfedezve az endocannabinoid rendszert (endocannabinoid system, ECS).

Az endocannabinoidok (eCB-k) a THC-val megegyező hatású, endogén termelődő lipid mediátorok. Eddig leginkább ismert és kutatott tagjaik az anandamid (N-arachidonoiletanolamin, AEA) és a 2-arachidonoilglicerol (2-AG), azonban a rendszernek számos további molekulája ismert, köztük a virodhamin, noladin-éter, N-arachidonoildopamin (NADA), illetve további, a CB1 és CB2 iránt jelentősen kisebb affinitású, azonban endocannabinoid-szerű aktivitással rendelkező tagok, úm. a palmitoiletanolamin (PEA) és oleoiletanolamin (OEA), amely utóbbiak feltételezhetően az endocannabinoid katabolizmus gátlásával is erősítik hatásukat (*4. ábra*) [123, 127].

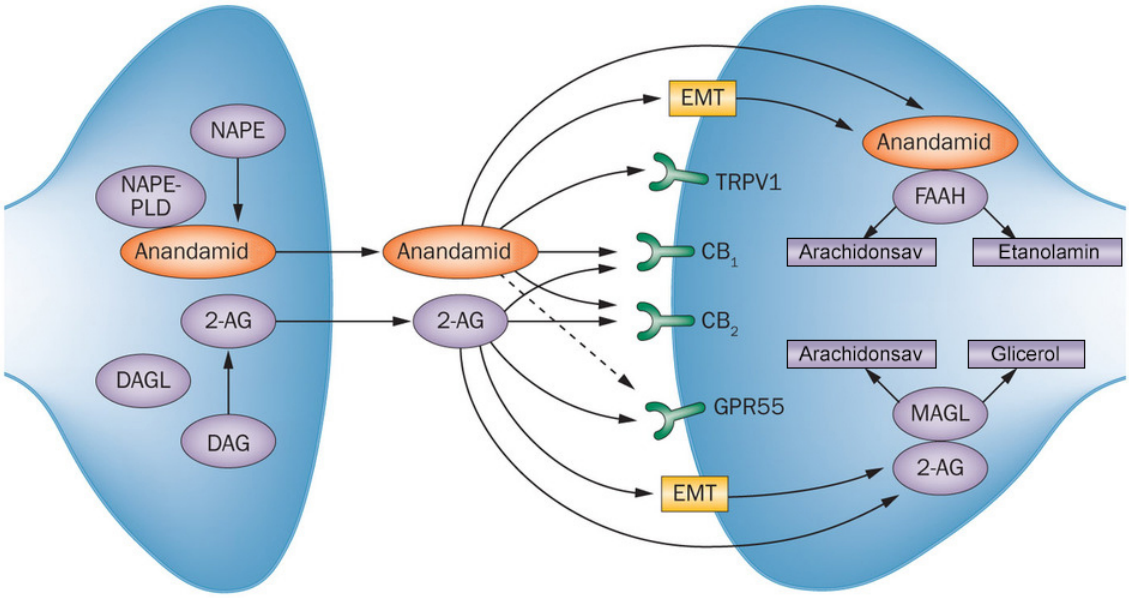
Jelen ismereteink szerint az endocannabinoidok lokális igény szerint („on demand”) szintetizálódnak, elsősorban membrán foszfolipid prekurzorokból [128]. Bár az anandamid szintézise több útvonalon is megvalósulhat, a termelés nagyjáért az N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz-D (NAPE-PLD) felel; ez egyben a szintézis sebességmeghatározó lépése („rate-limiting step”) is [129, 130]. A 2-AG termelés az *sn*-1-diacil-glicerol-lipáz (DAGL) és azt követően egy specifikus foszfolipáz-C közreműködésével történik [131]. Az endocannabinoidok sejtbe történő felvétele még nem teljesen tisztázott útvonalon, feltételezhetően valamilyen „endocannabinoid membrán transzporter” (EMT) segítségével történik, ahol bekövetkezik inaktivációjuk és katabolizmusuk: az anandamid esetében a lebontásért felelős fő enzim a zsírsav-amid hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH), míg a 2-AG lebontását egy specifikus monoacil-glicerol-lipáz (MAGL) végzi (*5. ábra*), a

DOI:10.14753/SE.2016.1883

végtermékek az anandamid esetén arachidonsav és etanolamin, 2-AG esetén pedig arachidonsav és glicerol [132, 133]. A lebontásban kisebb szereppel, de további enzimek is részt vesznek, így a ciklooxigenáz-2 (COX-2) és más lipoxigenázok (LOX), valamint a citokróm P450, amely ezáltal prosztaglandin-etanolamidok, prosztaglandin-gliceril-észterek és hidroxi-anandamid molekulák termelődéséhez vezet [134-136].



4. ábra. Az endocannabinoid rendszer effektor molekulái (saját szerkesztés)



5. ábra. A major endocannabinoidok szintézise, receptoraik és katabolizmusuk. [137] (NAPE-PLD: N-arachidonoil-foszfatidil-etanolamin-specifikus foszfolipáz-D; DAGL: *sn*-1-diacil-glicerol-lipáz; 2-AG: 2-arachidonoilglicerol; EMT: endocannabinoid membrán transzporter; TRPV1: 1-es típusú vanilloid receptor; CB: cannabinoid receptor; GPR55: G-protein kapcsolt receptor 55; FAAH: zsírsav-amid hidroláz; MAGL: monoacil-glicerol-lipáz)

Az endocannabinoid ligandok hatásukat elsősorban a heptahelikális, G-fehérje kapcsolt cannabinoid CB1 és CB2 receptorokon keresztül fejtik ki, amelyek $G_{i/o}$ fehérjéket aktiválnak [138]. A közelmúltban emellett kimutatták egyes cannabinoid és nem-cannabinoid ligandok GPR55-fehérjéhez való kötődését, amelyet egyesek új, hármas típusú cannabinoid receptorként (CB3) emlegetnek [139, 140]. A két előbbi receptor anatómiailag erősen eltérő eloszlást mutat az emberi szervezetben: a CB1 elsősorban a központi idegrendszerre lokalizált, emellett megtalálható a mellékvesében, szívben, uterusban, herében és májban; míg a CB2 főleg az immun- és haematopoeticus sejtekre korlátozottan, illetve a lépben van jelen [141]. A cannabinoid receptorok mellett az anandamid kötődését figyelték meg a nem szelektív kation csatorna 1-es típusú vanilloid receptorhoz (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1), valamint még újabban sejtmagi peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorokat (PPAR) is azonosítottak, mint fiziológiás endocannabinoid kötési célpontot [142, 143]. Az endocannabinoidok emellett eltérést mutatnak a receptorok iránti affinitásukban is: a

szövetekben egyébként 10-100-szor nagyobb koncentrációban kimutatott 2-AG magasabb affinitással kötődik a CB1 és CB2 receptorokhoz, mint az anandamid [123, 130].

3. táblázat. Az endocannabinoidok által aktivált szignáltranszdukciós útvonalak [144]

Receptor	**Hatás**
CB1 és CB2	↓ Adenilát-cikláz
	↑ Fokális adhéziós kináz (FAK) és mitogén-aktivált protein kináz (MAPK)
	↑ ERK, p38 (CB1-en keresztül) és PI3K/Akt (CB2-n keresztül)
	↑ K^+-csatornák
	↓ Ca^{2+}-csatornák
GPR55	↑ Intracelluláris [Ca^{2+}]
	↑ RhoA, Rac és Cdc42
	↑ ERK foszforiláció
TRPV1	↑ Intracelluláris [Ca^{2+}]
	↑ Kaszpázok
	↑ Citokróm C felszabadulás
	↑ Mitokondriális uncoupling
	↑ Pro-apoptotikus kinázok
PPARs	↑ ROS
	↑ Tirozin-kinázok
	↑ Adiponektin és lipoprotein-lipázok

Az endocannabinoidok által aktivált receptorok szignalizációs útvonalait *Battista és mtsai* munkája alapján a *3. táblázat* foglalja össze. Ezek közül kiemelendő a különböző (N-, P/Q- és L-típusú) Ca^{2+}-csatornák gátlása, illetve az adenilát-cikláz gátlásán keresztül cAMP-szint csökkentő hatásuk, amely a K^+-csatornák csökkent foszforilációjához vezet. Az endocannabinoidok részt vesznek a fokális adhéziós kináz és a mitogén-aktivált protein kináz-kaszkád aktiválásában is [145]. Az eddig leírtak mellett a korábban említett PPAR-aktiváción keresztül az endocannabinoidok hosszú távú hatást is kifejtenek genom-szintű és rapid nem-genom-szintű változtatások útján,

szemben a „klasszikus” sejtfelszíni receptorok által aktivált útvonalakkal. A PPAR-ok többek közt a lipidmetabolizmus, energiaegyensúly, táplálkozási magatartás, cirkadián ritmus és további rendszerek szabályozásában vesznek részt [143]. Ebből adódóan az endocannabinoid rendszer működése a szervezet számos fiziológiás és patológiás folyamatához kapcsolódik, többek között az étvágy, a malignus folyamatok, cardiovascularis betegségek, a fertilitás, immunfunkciók, memória, neuroprotekció és fájdalom moduláció befolyásolásához [144].

Kimutatták, miszerint a CB1 receptor (a CB2-es típussal ellentétben) úgynevezett „lipid raftokhoz” (LR) kapcsoltan jelenik meg a sejtfelszínen, ezáltal az utóbbiak képesek a CB1-szignalizáció befolyásolására. A LR és CB1 közötti kapcsolatot ugyanis meghatározza a sejtmembrán koleszterintartalma: koleszterinben gazdag sejtmembrán esetében csökken a CB1 és LR közötti kapcsolat, ezáltal a G-fehérjéken keresztüli szignalizáció aktivitása [146]. Emellett a raftok koleszterin depléció következtében bekövetkező diszrupciója megzavarja az anandamid-indukálta CB1 endocitózist, az utóbbi lizoszómába történő transzportjának csökkenését okozva. Mindezek alapján a lipid raftok potenciális regulációs felületet nyújthatnak a CB1 szignalizáció befolyásolására, valamint feltételezhetően szerepet játszanak az intracelluláris tranpszortban is [147, 148].

Bár az endocannabinoid rendszer elemei testszerte expresszálódnak és kimutathatóak, genetikai ablációjuk vagy gyógyszeres blokkolásuk egészséges állatokban kevés következménnyel jár, amelyből következtethető, hogy tónusos aktivitásuk minimális vagy teljesen hiányzik fiziológiás körülmények között [149]. Ezzel szemben különböző patológiás állapotokban a cannabinoid tónus emelkedése vagy csökkenése következik be. Ekkor a megváltozott ECS aktivitás lehet átmeneti jellegű, a szervezet kompenzatórikus mechanizmusainak része (pl. adott betegségek tüneteinek csökkentése vagy a progresszió lassítása céljából); más esetben viszont patológiás, vagy adott deficienciát jelző jelenség [150].

1.2.2. Az endocannabinoid rendszer cardiovascularis vonatkozásai

Az endocannabinoidok cardiovascularis rendszerre gyakorolt hatása elsősorban a vérnyomás és a myocardialis kontraktilitás csökkentésében nyilvánul meg, amelyek

elsődlegesen a myocardiumban, érfalakban és központi, valamint autonóm idegrendszerben lokalizált CB1 receptorok által mediált folyamatok [149].

Míg a CB1 aktiváció stressz szignalizáció és következményes sejthalál indukálásán keresztül csökkenti a kontraktilitást, a CB2 receptorok ingerlése nem jár káros haemodinamikai következményekkel [151-153]. Az előző alfejezetben említetteknek megfelelően az endocannabinoid rendszer működésének változása egészséges állatokban nem jár jelentős cardiovascularis változásokkal: CB1-, CB2- vagy FAAH-kiütött egerek normál vérnyomásértékeket és myocardialis kontraktilitást és/vagy baroreflex-érzékenységet mutattak [150].

Az endocannabinoidok hypotenzív hatása számos különböző, szövet- és fajspecifikusan eltérő útvonalon érvényesül, és magában foglal CB1 és TRPV1 receptor, valamint NO-dependens és -independens mechanizmusokat, illetve eddig nem tisztázott endothelialis útvonalakat is [154]. Elsősorban az anandamid vazorelaxáns hatását vizsgálták, amely több párhuzamos mechanizmus eredményeként jön létre. Elsőként a CB1 receptor közvetlen aktiválásának vérnyomáscsökkentő hatását mutatták ki [155], később azonban felfedezték, hogy az anandamid degradáció gátlása hatásosabbnak bizonyult hypotensio előidézésében a direkt aktiválásnál [156]. Ebből kiindulva kimutatták a molekula TPRV1 receptoron kifejtett (CB1 receptortól független) hypotenzív hatását, amely perivascularis neuronokon vazodilatációs peptidek felszabadításával érvényesül [157]. További, hypotensiót eredményező anandamid hatásmechanizmus az indukálható NO-szintáz (inducible NO synthase) expressziójának és aktivitásának fokozása [158]; valamint az agyi keringésben a vascuralis simaizmok L-típusú kalcium csatornáinak közvetlen gátlásán keresztül a kalciumszint csökkentése [159].

Az előzőekben leírt hatásokon kívül a közelmúltban szoros korrelációt mutattak ki a magas anandamid és 2-AG szint, valamint az atherosclerosis között [160]. Eszerint instabil anginával rendelkező betegek coronaria atheromáiban jelentősen magasabb CB1 receptor mRNS expressziót találtak a stabil anginában szenvedőkhöz képest; a legsérülékenyebb, magas lipid- és makrofágtartalmú plakkok kifejezetten gazdagok voltak CB1 receptorokban. Ezzel összhangban kísérletes körülmények közötti a CB1 gátlás csökkentette a gyulladást és oxidánsok felszabadulását cukorbeteg alanyokban [161]. Az előbbiekkel szemben kimutatták, hogy a CB2 receptor szelektív aktiválásával

csökkenthető az atheroscleroticus gyulladás: CB2 agonisták alkalmazása csökkenti a kemokin-receptor expressziót és kemotaxist (amely folyamatok atheroscleroticus plakkokban fokozottak), valamint gátolja a TNF-α-mediált endothelsejt aktivációt, ezáltal feltételezhetően csökkenti a monocyták transendothelialis migrációját és adhézióját, ezáltal fokozva az endothelium közvetlen védelmét [162, 163].

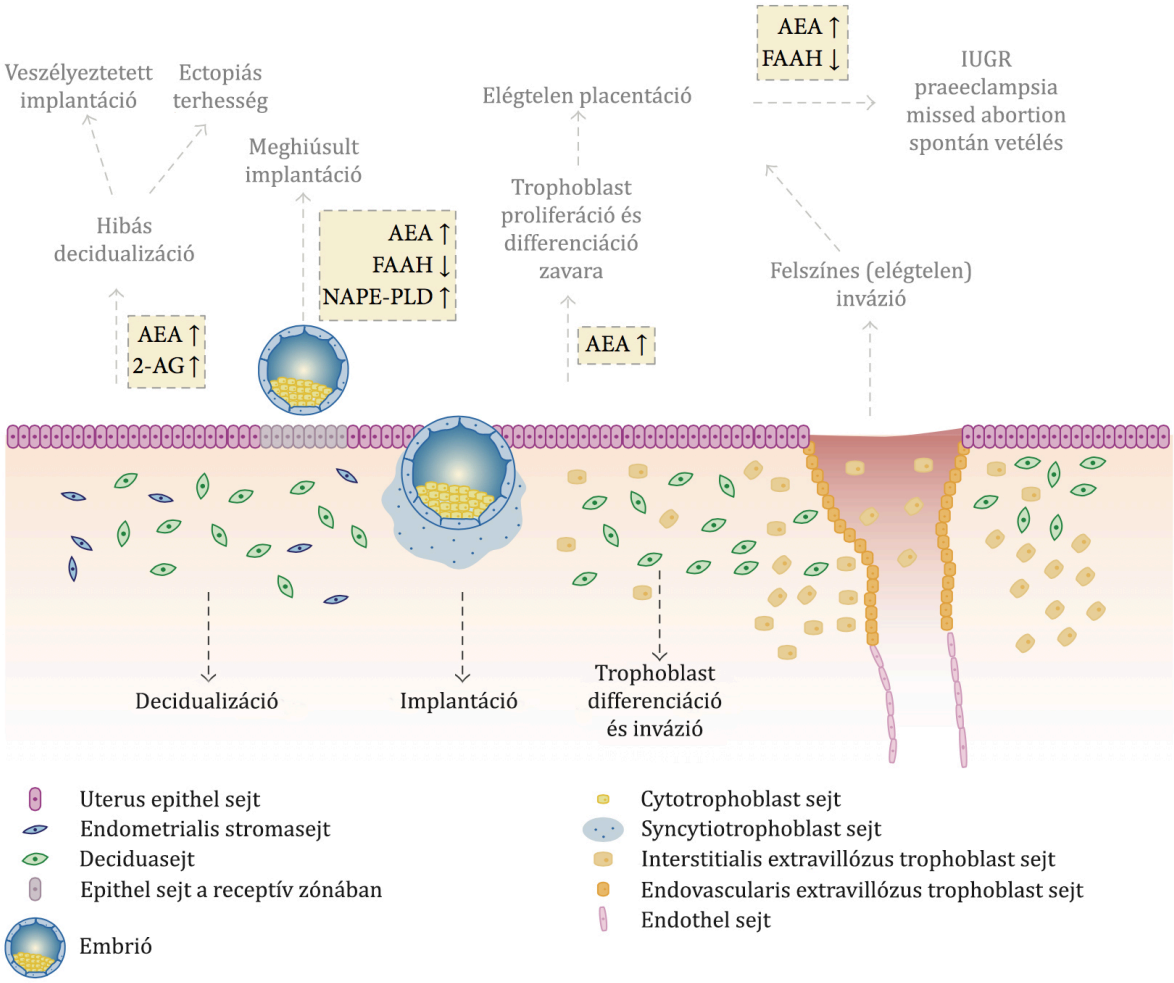
Végezetül megemlítendő még az ECS cardioprotektív hatása: izolált patkányszív-modellen a 2-AG és a PEA csökkentették a myocardialis infarktus kiterjedését (az előbbi feltételezhetően elsődlegesen a CB2 receptor, míg az utóbbi a PPARα aktivációján, a MAPK és ERK1/2 protektív foszforilációján és más endocannabinoidok aktivitásának növelésén keresztül) [164, 165]. Az anandamidnak hasonló jótékony hatása nem volt kimutatható.

1.2.3. Reprodukció és az endocannabinoid rendszer

Napjainkra jelentős tudományos irodalom áll rendelkezésre arról, hogy az endocannabinoidok a reprodukciós folyamat szinte minden fontosabb lépésében szerepet játszanak. A terhesség korai szakaszának endocannabinoid rendszerhez kötődő egyes folyamatait a *6. ábra* mutatja be. Emlősökben CB1 és CB2 receptorok jelenlétét azonosították az oocytaérés minden fázisában, valamint lokalizálták a NAPE-PLD és FAAH enzimeket a szekunder és későbbi folliculus stádiumokban [166]. Továbbá infertilitással kezelt nőkben kimutatták, hogy az anandamid koncentráció szorosan korrelál az oocyták érettségi fokával és minőségével [167]. Az endocannabinoidok folliculogenesisben betöltött moduláló szerepének pontos molekuláris mechanizmusa napjainkig még nem teljesen tisztázott, THC-hatás elemzése alapján feltételezhető azonban, hogy a gonadotropinszintek befolyásolásán keresztül, illetve a CB1-en keresztüli cAMP-szint szabályozása által hatnak [168, 169]. Mindkettő esetben a magas endocannabinoid koncentráció az oocytaérést hátráltatja.

Az ECS a női mellett a férfi gametogenesisben is szerepet játszik. Szintén THC-vel végzett kutatásokban mutatták ki a cannabinoidok spermium motilitást és életképességet közvetlen gátló hatását *in vitro* [170], valamint az LH és FSH-felszabadulás gátlásán keresztül a spermatogenesis és tesztoszteron-termelésben betöltött inhibitoros szerepét [171, 172]. Később az anandamid hasonló, spermium motilitást csökkentő tulajdonságát

azonosították, ezen túlmenően pedig kimutatták, hogy CB1 és TRPV1 receptorokon keresztül gátolja a kapacitációt és akroszóma-reakciót [173-175].



6. ábra. Sematikus vázlat az endocannabinoid reguláció lehetséges zavarairól a terhesség korai szakaszában, *Fonseca* munkája alapján. [123]

A fertilizációt követően az endocannabinoidok további kiemelt szerepét is kimutatták. Egérkísérletekben egyértelműen bizonyították, hogy a blastocysta megfelelő fejlődéséhez alacsony anandamid koncentráció szükséges, ezért már a kétsejtes stádiumban kimutatható az FAAH expressziója, amely a fejlődéssel párhuzamosan erősödik [176]. Kiemelt szerepet tulajdonítanak az endocannabinoid rendszernek az oviductalis transzportban is, amelyre utal, hogy CB1-kiütött egerekben a morula vagy blastocysta hosszabb időre a petevezetékben rekedt, valamint ectopiás terhességen

átesett nőkben szignifikánsan alacsonyabb CB1 transzkripciós szinteket mértek [177, 178].

A CB1 receptor aktivációjának decidualizációt gátló hatását mutatták ki humán sejtekben, amely feltehetően cAMP-dependens apoptotikus folyamatokon keresztül érvényesül – ez esetben az anandamid és 2-AG proapoptotikus hatása jelenik meg [179]. Ugyanakkor megfigyelték az endocannabinoid rendszer stromasejtek migrációjában betöltött potenciális szerepét is: a szintetikus metanandamid CB1 receptoron keresztül, a PI3K/Akt és ERK1/2 útvonalak aktiválásával serkentő hatással bírt a stromasejtek migrációjára [180]. Ez a jelenség felveti az endocannabinoidok potenciális szerepét fokozott endometrialis invazivitással járó kórképek esetében.

Több közlemény számol be az endocannabinoidok implantációt szabályozó tulajdonságáról, ezen belül kiemelt tekintettel az anandamid uterus „receptivitási időablakát" befolyásoló szerepéről [123, 130, 181]. A blastocysta uterusüregbe való belépésekor kitetté válik a lokális anandamid koncentrációnak: alacsony koncentrációban az anandamid az ERK szignalizációt aktiválja, valamint serkenti a blastocysta növekedését és differenciációját (ez CB1-mediált folyamat), magas koncentrációban viszont a Ca^{2+} influx gátlása válik dominánssá [182]. Ezzel összhangban állatkísérletekben alacsony anandamid és magas FAAH szinteket azonosítottak az uterus implantációs oldalán [183], míg az inter-implantációs oldalon fordított értékeket mértek. Ennek értelmében az alacsony lokális anandamid koncentráció növeli az uterus blastocysta iránti receptivitását, míg a magas koncentráció embryotoxikus, csökkent trophoblast proliferációt és sikertelen implantációt eredményez [184, 185]. A megfelelően alacsony anandamid szintet a NAPE-PLD és FAAH által biztosított szoros reguláció biztosítja [186].

Az implantációt követően meginduló placentáció során ennek megfelelően az első trimeszterben magas FAAH expressziót mértek az anyai vérhez közeli rétegekben lévő trophoblastokban, amely feltehetően a magzat védelmében játszik szerepet a magas anyai anandamid szinttel szemben [187]. A placenta fejlődése során mind a cytotrophoblastok, mind a syncytiotrophoblastok expresszálják a másik major endocannabinoid, a 2-AG szintéziséért és hidrolíziséért felelős, korábban leírt MAGL és DAGL enzimeket [188]. Utóbbiak a 2-AG lokális szintjének szabályozásáért felelnek: az emelkedett 2-AG szint *in vitro* megzavarja a cytotrophoblastok

syncytiotrophoblastokká történő funkcionális és morfológiai differenciációját – ez a megfigyelés megerősíti az endocannabinoid rendszer placentatióban betöltött szerepének fontosságát [189].

Taylor és mtsai meghatározták az anandamid plazmaszintjének változását a terhesség előrehaladtával, amelynek során azt tapasztalták, hogy az alacsony plazmaszint a harmadik trimeszterben emelkedni kezd, majd a vajúdás megindulásakor kettő-négyszeresére emelkedik [190]. Állatkísérletek megerősítették ezt a jelenséget, ahol feltételezték, hogy az anandamid szint emelkedése összefüggésben áll a decidua apoptózis-indukálta regressziójával, ezáltal szerepe lehet a vajúdás megindulásában [191]. Ezzel összefüggésben rágcsálókban kimutatták, hogy a terhesség során emelkedő endocannabinoid szint a metabolizáló FAAH enzimek változatlansága mellett, a NAPE-PLD enzim fokozódó aktivitásának köszönhető [123]. Legújabb kutatások szerint az anandamid *in vitro* csökkenti a humán cytotrophoblast sejtek viabilitását, apoptózisra jellemző morfológiai elváltozásokat és a kaszpáz-3/7, illetve 8 és 9 enzimek aktivációját okozva [192].

A vajúdás megindulásában központi szereppel bír a progeszteron és a corticotropin-releasing hormon (CRH): az előbbi esszenciális jelentőségű a myometrium nyugalmi állapotának megőrzéséhez terhesség alatt; szintcsökkenése jellemzően a szülés megindulását eredményezi. Állakísérletek alapján a fiziológiás endocannabinoid jelátvitel fontos szerepet játszhat a vajúdás megindulása előtti progeszteron/ösztrogén arány megőrzésében [193]: CB1-kiütött egerekben a szérum progeszteron szint idő előtti csökkenését, ezáltal koraszülés magasabb arányú előfordulását mutatták ki [194]. Bizonyították azt is, miszerint az endocannabinoidok CB1 receptoron keresztül fokozzák a COX-2 expressziót, ezáltal a prostaglandin E_2 termelést humán magzatburokban [195]. A prostaglandin E és F pedig fontos szabályozó funkciót tölt be a méhkontrakciók kialakulásában vajúdás alatt a myometriumban található prostaglandin receptorokon keresztül [196]. Ezzel összhangban korrelációt mutattak ki az anandamid szint és a vajúdás megindulása között: szignifikánsan magasabb plazma anandamid koncentrációt mértek vajúdó nőkben nem vajúdókhoz képest [197], valamint jelentősen magasabb CB1 expressziót mutattak ki nem vajúdó nőkből vett placentamintákban, vajúdásban levő nők lepénymintáihoz viszonyítva. Eszerint a magas anandamid és alacsony CB1 expresszió feltétele a vajúdás megfelelő időben történő

beindulásának. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az emelkedett anandamid szint korrelál többek közt a koraszülés bekövetkeztével, bár pontos szerepe még nem tisztázott a vajúdásban.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

2. Célkitűzések

1. Napjainkra bizonyítást nyert, hogy az endocannabinoid rendszer központi szerepet játszik a női reprodukciós folyamatban, ide értve az implantációt, decidualizációt és placentációt. Több tanulmány számolt be a placentaris és perifériás anandamid szintek szoros korrelációjáról spontán vetéléssel és ectopiás terhességgel összefüggésben, emellett felmerült az anandamid vérnyomást szabályozó lehetséges szerepe is. Ezen tapasztalatok alapján tanulmányunkban az anandamid szintek és a praeeclampsia közötti összefüggésre kerestünk választ: meghatároztuk egészséges várandós és praeeclampsiás nők szérum anandamid, sFlt-1 és PlGF koncentrációit. A mért anandamid koncentrációkat emellett összevetettük a vizsgált alanyok praeeclampsia szempontjából releváns klinikai paramétereivel.
2. A praeeclampsia patogenezisében központi szerepet játszó kóros placentáció az endocannabinoid rendszer lokális szerepének vizsgálatát is indokolja. Ezért a szérum anandamid szintek mellett meghatároztuk az endocannabinoid rendszer további tagjainak, köztük a CB1 és CB2 receptorok, illetve az FAAH enzim expresszióját egészséges és praeeclampsiás várandósokból vett placenta mintákon.
3. Korábbi tanulmányban leírták az endocannabinoidok lokális hatásának szerepét az uterus receptivitásának és a trophoblastsejtek invazivitásának szabályozásában. A fokozott lokális endocannabinoid aktivitás (magas anandamid szint) a placentáció zavarához, és potenciálisan praeeclampsia kialakulásához vezethet. Ez alapján a szöveti expressziók meghatározása mellett a CB1 és CB2 receptorok, illetve az FAAH enzim pontos lokalizációját vizsgáltuk egészséges terhesektől és praeeclampsiában szenvedő nőktől nyert placenta mintákon.

3. Módszerek

3.1. A tanulmányban részt vevők

A szérum anandamid, sFlt-1 és PlGF szintek meghatározásához 43 praeeclampsiás és 71 egészséges, normál vérnyomásértékekkel rendelkező, szövődménymentes várandóst vontunk be eset-kontroll vizsgálatunkba. A vizsgálati alanyok kivétel nélkül a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról kerültek beválogatásra, kaukázusi rasszhoz tartoztak és Magyarország azonos földrajzi régiójából érkeztek. A praeeclampsiás és egészséges várandósokat vérvételkori anyai életkor és terhességi kor szerint illesztettük. Kizáró tényező volt a többes terhesség, krónikus hypertonia, diabetes mellitus, autoimmun betegség, angiopathia, vesebetegség, anyai vagy magzati fertőzés és magzati congenitalis rendellenesség. A mintavétel éhgyomorra történt, az alanyoknál nem indult meg a vajúdás és nem volt észlelhető burokrepedés.

A CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció meghatározásához 18 praeeclampsiás és 18 egészséges, normál vérnyomásértékekkel rendelkező, szövődménymentes várandóst vontunk be az eset-kontroll vizsgálatba, minden más kritérium az előző bekezdésben taglaltakkal megegyező.

A praeeclampsia kritériumaként az előzetesen normotenzív nőkben, 20. terhességi hetet követően jelenetkező magas vérnyomást (≥140 Hgmm szisztolés vagy ≥90 Hgmm diasztolés érték kettő vagy több alkalommal, legalább hat óra különbséggel mérve) és proteinuriát (≥0,3 g/24 óra vagy ≥1 keresztes vizelet gyorsteszt eredmény, húgyúti fertőzés hiányában) határoztuk meg. Minden bevont praeeclampsiás beteg esetében a vérnyomásérték normál tartományba tért vissza a szülést követő 12. hétig. A praeeclampsia súlyos formáját állapítottuk meg a következő értékek jelentkezésekor: ≥160 Hgmm-es szisztolés vagy ≥110 Hgmm-es diasztolés vérnyomásérték, vagy 5 g/24 óra vagy afeletti értéket elérő proteinuria (vagy ≥3 kereszt a gyorsteszten). A 34. terhességi hetet megelőzően jelentkező praeeclampsiát korai kezdetűként kategorizáltuk (20. és 33. terhességi hét közötti megjelenés) [36]. Intrauterin növekedési retardációt (IUGR) állapítottunk meg, amennyiben az újszülött születési súlya a magyar születési súlypercentilis táblázat alapján az adott korra és nemre meghatározott 10 percentilis értéket nem érte el [198].

A vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá, minden vizsgálati alany írásos beleegyező nyilatkozatot írt alá. A tanulmányt a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően végeztük.

3.2. Szérumkoncentrációk meghatározása

A vérmintákat alkari vénából, natív csövekbe vettük hozzáadott adalékanyag nélkül, majd szobahőmérsékleten 10 percig 3000 *g*-vel centrifugáltuk. Az alikvotokat felhasználásig -80 Celsius fokon tároltuk.

A szérum anandamid szinteket nagy teljesítményű folyaddékkromatográfia-tömegspektrometria (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) technikával határoztuk meg. A szérum mintából az analitot belső standard (100 ng/ml D_4-anandamid) hozzáadása után acetonitrillel extraháltuk, majd centrifugáltuk. A tiszta felülúszót bepároltuk N_2 áramban, majd kezdeti eluensben történő visszaoldás után HPLC-MS módszerrel analizáltuk. A kvantitatív meghatározás ismert koncentrációjú anandamidot tartalmazó szérum mintákból nyert kalibrációs görbe segítségével történt (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml anandamid). A HPLC rendszer egy Jasco kétfázisú pumpából és egy Jasco autosamplerből állt. Az analitikai mérést TSQ Quantum Discovery triple quadrupole tömegspektrométer segítségével végeztük, electrospray ionizációs módszerrel, pozitív ion módban. A kromatográfiás elválasztás Merck Purospher Star C18 oszlopon történt gradiens elúcióval (mobil fázisok: 0,1% hangyasavat tartalmazó 100 mM ammónium-acetát és 0,1% hangyasavat tartalmazó metanol 300 μl/min áramlási sebességgel).

A szérum össz sFlt-1 és biológiailag aktív PlGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 05109523 és 05144671) technikával határoztuk meg, Cobas e 411-es analizátoron (Roche, Mannheim, Németország). A szérum sFlt-1 koncentrációjának meghatározása szendvics-elven alapult, a teljes vizsgálat időtartama 18 perc volt. Az első inkubáció során (20 μl-es minta) immunkomplex képződés zajlott le sFlt-1-specifikus monoklonális biotinilált antitest és ruténium komplexszel jelölt sFlt-1-specifikus monoklonális antitest reakciójával. Ezt követően sztreptavidinnel fedett mikroszemcséket adtunk a mintához, ahol a biotin és a sztreptavidin kötődésével a

komplex a szilárd fázishoz rögzült. A reakcióelegyben képződött mágnesezhető mikroszemcséket elektróda fogta be ezután a mérőküvettából, míg a kötetlen anyagok a ProCell-lel együtt távoztak a rendszerből. Ezt követően az elektródát feszültség alá helyeztük, amely kemilumineszcens fénykibocsátást eredményezett, amely utóbbit fotosokszorozóval mértünk. Az eredmények kalibrációs görbével kerültek meghatározásra, amelyet készülékspecifikusan, kétpontos kalibrációval és reagens vonalkódból leolvasott mestergörbe használatával generált a készülék.

A szérum PlGF koncentráció mérését az előző bekezdésben leírt szendvics-elvhez hasonlóan végeztük, a vizsgálat teljes időtartama 18 perc volt. Az első inkubáció során az 50 µl-es mintában immunkomplex képződött PlGF-specifikus biotinilált monoklonális antitest és a ruténium-komplexszel jelölt PlGF-specifikus monoklonális antitest reakciójával. A vizsgálat további része megegyezik az előző bekezdésben részletezettekkel.

3.3. Western blot és immunhisztokémia

A Western blot mérést a chorionlemeztől a basalis lemezig terjedő, teljes vastagságú blokkokon végeztük a teljes placentaris CB1, CB2 és FAAH expresszió meghatározásának céljából. Homogenizátor alkalmazásával 10 ml lizáló pufferben (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, 25 µg/ml PMSF, 2,5 µg/ml Leupeptin, 2,5 µg/ml Aprotinin, 625 µM nátrium-pirofoszfát, 1mM β-glicerofoszfát, 0,1% Triton) 1 g placentaszövetet daráltunk, majd homogenizáltunk háromszor 15 másodpercig. A homogenátumot 800 *g*-vel 15 percig, 4 Celsius fokon centrifugáltuk, majd a pelletet eltávolítottuk. A felülúszót -80 Celsius fokon tároltuk és négy héten belül felhasználtuk. Az FAAH (AT1983a, egér monoklonális antitest, Abgent Inc., San Diego, Kalifornia, USA), CB1 (EB06945 kecske poliklonális anti-CB1 antitest, Everest Biotech, Upper Heyford, Egyesült Királyság) és CB2 (EB06946 kecske poliklonális anti-CB2 antitest, Everest Biotech, Upper Heyford, Egyesült Királyság) expressziók humán placentában történő meghatározásához 60 µg-ot használtunk fel a kivont fehérjékből a Western blot analízishez.

A mintákat 100 mM ditiotreitolt tartalmazó 2x Laemmli pufferben készítettük elő és vízfürdőben forraltuk 15 percig. A fehérjét (60 µg) SDS-PAGE (9%) gélen választottuk el, majd nedves transzferrel nitrocellulóz membránra vittük fel 90 percig. A

nitrocellulóz membránra történt fehérjetranszfer egyenletességét Ponceau S-sel ellenőriztük. Gyengéd öblítést követően a membránokat szobahőmérsékleten egy órán át blokkoltuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban (TBST) oldott 10% (m/V) zsírmentes liofilizált szárított tejben, majd egy éjszakán át inkubáltuk CB1 vagy CB2 vagy FAAH elleni antitesttel. Az antitesteket TBST-ben oldott 1%-os marha szérum albuminnal higítottuk (CB1 1:1000, CB2 és FAAH 1:500 arányban). Ezt követően a blotokat TBST-ben oldott HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd ECL-Western blot detektáló rendszerrel vizualizáltuk (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Egyesült Királyság). A specifikus sávokat a mintákkal párhuzamosan futtatott egér here homogenátummal és színes molekulasúly markerekkel azonosítottuk. A membránt 60 Celsius fokon harminc percig áztattuk stripping pufferben (100 mM 2-merkaptoetanol, 2% SDS és 62,5 mM TRIS-HCl, pH 7,6) a kötött ellenanyag leválasztása végett, majd a membránt MAPK1 antitesttel (1:1000) újrajelöltük és az elsődleges ellenanyaggal mért denzitási értékeket a MAPK1 sáv denzitási értékére normalizáltuk.

A Western blottal kapott denzitási értékeket GELDOC 1.00-UV rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) kvantifikáltuk. A denzitometriás egységben levő specifikus sávok jeleit ugyanazon membrán megfelelő MAPK1 sáv denzitási jelének értékével korrigáltuk. A CB1, CB2 és FAAH sávok normalizált értékeit a normál placentából nyert értékek százalékában fejeztük ki.

Az immunhisztokémiai (IHC) festést 16 placentamintán végeztük el mindkét vizsgálati csoportból. Az anti-CB1 (GTX100219) és anti-CB2 (GTX101357) nyúl poliklonális antitesteket a GeneTextől (Irvine, Kalifornia, USA), az anti-FAAH (AT1983a) egér monoklonális antitesteket az Abgenttől (San Diego, Kalifornia, USA) szereztük be. A Western blothoz képest történt váltást a CB-antitesteket érintően a régebbi antitestek IHC technológiával való inkompatibilitása indokolta. A placentablokkokból metszett, 3 μm vastag metszeteket SuperFrost Ultra Plus Adhesion Slides (Thermo Scientific, USA) tárgylemezekre vittük fel, majd 1 órán át 56 Celsius fokon, azt követően 24 órát szobahőmérsékleten szárítottuk felhasználás előtt. Az immunfestést Leica BOND-MAX fully automated IHC & ISH system (Leica Biosystems, St. Louis, Missouri, USA) berendezéssel, Bond Polimer Refine Detection kit (Leica Biosystems) felhasználásával

végeztük. Utóbbi tartalmazta a peroxid blokkolót (3% hidrogén-peroxid), poszt-primer polimer penetrációfokozót (Tris-pufferolt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-ben oldott 10% állat szérum), Poly-HRP anti-egér/nyúl IgG polimert (mindkettőt 8 µg/ml higításban, Tris-pufferolt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-t tartalmazva), DAB Part 1-et (66 mM 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid, stabilizáló oldatban), DAB Part B-t (0,05%-os hidrogén-peroxid, stabilizáló oldatban) és hematoxilint (0,02%). A metszeteket háromszor viasztalanítottuk Bond Dewax Solution (Leica Biosystems) oldattal 72 Celsius fokon, majd alkoholsorban rehidráltuk három lépésben, végül pufferoldatban mostuk (Bond Wash Solution, Leica Biosystems). A CB1, CB2 és FAAH antigén előhívást Leica Bond Epitope Retrieval Solution 2 (pH 9,0) oldattal való 20 perces inkubálással végeztük. Az elsődleges antitesteket Bond Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems) oldatban higítottuk 1:1000 arányban a CB1 és CB2, valamint 1:1200 arányban az FAAH esetében. A metszeteket az előbbi oldatokkal 20 percig inkubáltuk, majd újabb 15 percig a poszt-primer polimerrel. Pufferoldattal és ionmentesített vízzel történő mosást követően peroxid blokkolóval három percig inkubálva blokkoltuk a peroxidáz aktivitást. További pufferoldatos és ionmentesített vízzel történt mosást követően kevert DAB oldatot adtunk a metszetekhez 10 percig, majd ezt követően háromszor mostuk a mintákat ionmentesített vízzel, végül 4 percig inkubáltuk hematoxilinnel. Az előbbiekben leírt minden lépés között Leica Wash Solution 10x Concentrate (higítási arány 1:9) oldattal mostuk a metszeteket. Pozitív kontrollként humán kisagyi szövetet alkalmaztunk.

A metszetekről készült képeket AxioCam Icc 1 kamerával felszerelt Zeiss Axiolmager A2 mikroszkóppal (Carl Zeiss Ltd., Thornwood, New York, USA) készítettük, az elkészítéshez AxioVision fényképező és képfeldolgozó szoftvert (4.8.2. verzió, Carl Zeiss Ltd.) alkalmaztunk. A képek 200x-os és 400x-os nagyítás mellett készültek.

3.4. Statisztikai analízis

A folyamatos változók eloszlását Shapiro-Wilk-féle *W*-teszttel határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy azok nem mutattak normális eloszlást, nem-paraméteres statisztikai módszereket alkalmaztunk. Két csoport folyamatos változóinak összehasonlítását Mann-Whitney-féle *U*-teszttel végeztük. A csoportok kategorikus

változóinak összefüggését Fisher-féle egzakt és a Pearson-féle χ^2 teszttel vizsgáltuk. A korrelációs koefficiens számításához Spearman-féle rangkorrelációt végeztünk. Mivel a szérum anandamid, sFlt-1 és PlGF értékek nem mutattak normális eloszlást, a kovariancia analízist (ANCOVA) logaritmusosan transzformált adatokkal végeztük.

A statisztikai analízishez az alábbi szoftvereket alkalmaztuk: STATISTICA (11. verzió, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) és Statistical Package for the Social Sciences (version 22 for Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Minden statisztikai analízisnél a $p<0,05$ értéket vettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az értekezésben az adatokat folyamatos változók esetében medián (interkvartilis tartomány), a kategorikus változók esetében abszolút szám (százalék) formájában adom meg.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

4. Eredmények

4.1. Szérum anandamid szint vizsgálata praeeclampsiában

4.1.1. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői

A vizsgálatba bevont várandósok klinikai jellemzőit a *4. táblázat* mutatja be. Nem volt szignifikáns különbség a két csoport életkorát, vérvételkori terhességi korát és a csoportokon belüli dohányzók arányát tekintve. Ezzel szemben a terhesség előtti BMI, a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek és a primiparák aránya szignifikánsabb magasabb, míg a terhességi kor szüléskor és a magzati születési súly szignifikánsan alacsonyabb volt a praaeclampsiás csoportban a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Magzati növekedési retardációt nem figyeltünk meg az egészséges várandós nők között, ezzel szemben 12 esetben fordult elő a praeeclampsiás csoportban. Huszonhét várandósnál állapítottunk meg súlyos praeeclampsiát, és húsz esetben volt korai kezdetű a betegség.

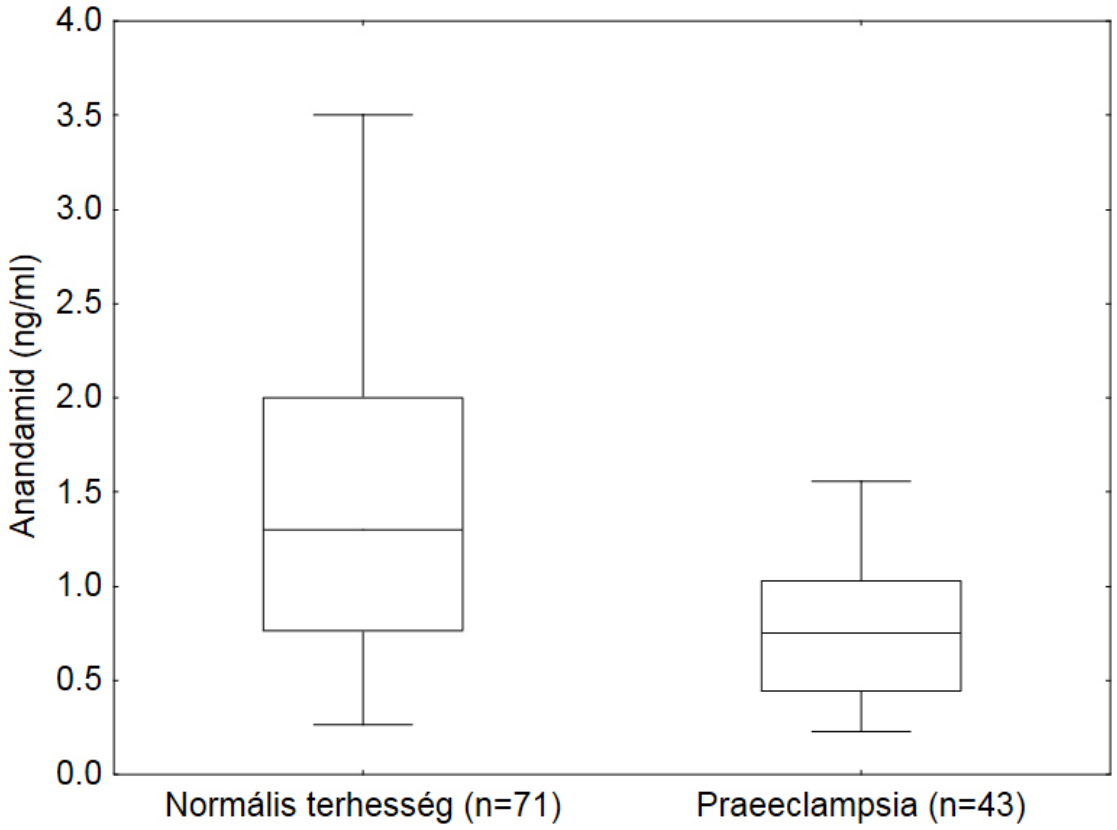
4. táblázat. Egészséges várandós és praeeclampsiás terhes nők klinikai jellemzői a szérum anandamid szintek vizsgálatára kialakított csoportokban

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

Az adatokat folyamatos változók esetében medián (interkvartilis tartomány), a kategorikus változók esetében abszolút szám (százalék) formájában adtuk meg.
(NS: nem szignifikáns. BMI: testtömeg-index)

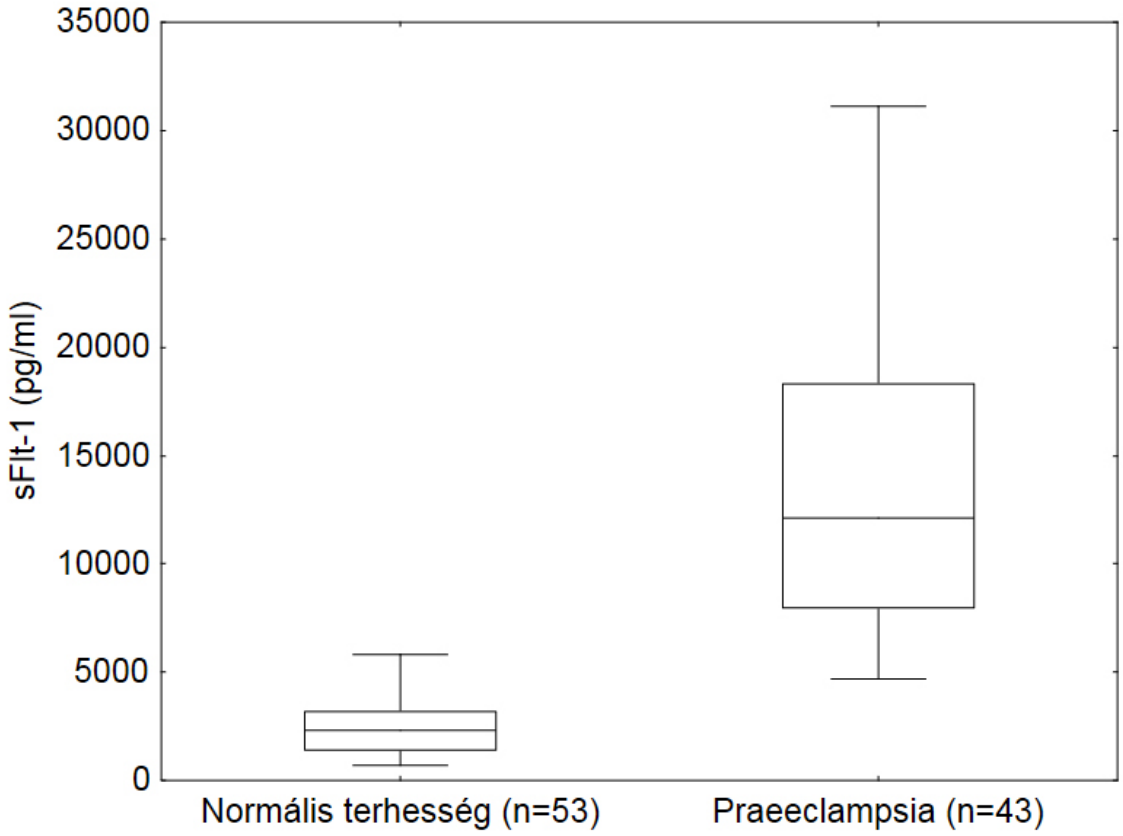
4.1.2. Laboratóriumi paraméterek

A vizsgálati alanyok laborparamétereit a *7., 8. és 9. ábra* mutatja be. Az anandamid szérumszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak praeeclampsiás betegekben az egészséges várandósokhoz képest (0,75 (0,44-1,03) ng/ml versus 1,30 (0,76-2,0) ng/ml, p<0,001; *7. ábra*). A praeeclampsiás terhesek szignifikánsan magasabb sFlt-1 szinttel rendelkeztek (12121 (7963-18316) pg/ml versus 2299 (1393-3179) pg/ml, p<0,001; *8. ábra*) és szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációkkal (71,2 (39,2-86,4) pg/ml versus 256,8 (181,1-421,0) pg/ml, p<0,001; *9. ábra*) összevetve az egészséges várandósok értékeivel. Az előbbi értékek közötti eltérés szignifikáns maradt az életkor, vérvételkori terhességi kor, terhesség előtti BMI érték és a primiparák százalékos aránya szerinti illesztést követően is, kovariancia analízis során (ANCOVA).

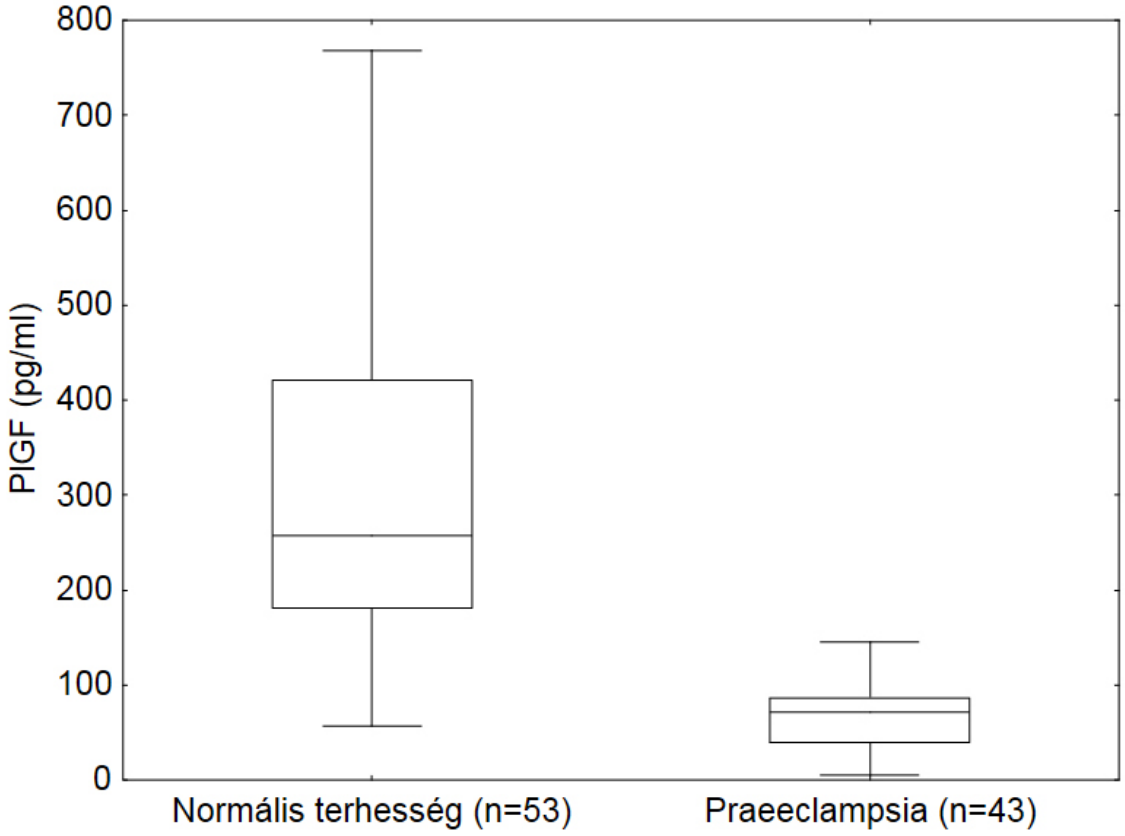


7. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők szérum anandamid szintjei (p<0,001). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)

DOI:10.14753/SE.2016.1883



8. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők szérum szolubilis fms-szerű tirozin-kináz (sFlt-1) szintjei (p<0,001). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)



9. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők szérum placentaris növekedési faktor (PlGF) szintjei (p<0,001). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)

A praeeclampsiás csoportban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a szérum anandamid szintekben a praeeclampsia enyhe vagy súlyos formája, a betegség korai vagy késői megjelenése, illetve az IUGR megléte vagy hiánya között. A korai kezdetű praeeclampsiában szenvedő terhesekben mért sFlt-1 koncentrációk szignifikánsabb magasabbak voltak a késői megjelenésű betegségtípushoz képest (14606 (12239-24333) pg/ml versus 7971 (5991-12805) pg/ml, p<0.001). Ezen felül azon praeeclampsiás betegeknél, akiknél IUGR jelentkezett (41,1 (28,0-73,2) pg/ml), vagy korai megjelenésű volt a betegségük (41,1 (23,8-68,7) pg/ml), szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációkat mértünk, mint azoknál, akiknél nem volt IUGR (77,3 (48,2-93,2) pg/ml, p<0.05), vagy késői fellépésű volt a betegség (80,3 (66,0-99,4) pg/ml, p<0.001).

Az előzőekben részletezetteken felül Spearman rangkorrelációs koefficiens számításával (folyamatos változók esetében) és Mann-Whitney *U*-teszt (kategorikus változók) elvégzésével vizsgáltuk, hogy a kutatásban részt vevők klinikai jellemzői (*4. táblázat*) összefüggésben állnak-e szérum anandamid szintjeikkel. Egészséges várandósokban a mért szérum anandamid koncentrációk szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a terhesség előtti BMI értékekkel ($R=0,33$, $p<0,05$). Ennek megfelelően az egészséges várandós csoportban a túlsúlyos és obez alanyok (BMI≥25 kg/m^2) szignifikánsan magasabb szérum anandamid szintekkel rendelkeztek a normális testsúlyúakhoz képest (1,80 (1,20-2,60) ng/ml versus 1,06 (0,70-1,61) ng/ml, $p<0,05$). További összefüggést a vizsgálatban részt vevők klinikai jellemzői és a szérum anandamid szintek között nem találtunk egyik csoportban sem. Ezen felül a szérum anandamid szintek nem korreláltak a szérum sFlt-1 és PlGF szintekkel sem az egészséges, sem a praeeclampsiás csoportban.

4.2. CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálata a placentában

4.2.1. A tanulmányban részt vevők klinikai jellemzői

Ezen vizsgálatunkba bevont alanyok klinikai jellemzőit az *5. táblázat* foglalja össze. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést a két vizsgálati csoport között az anyai életkor, terhesség előtti BMI, szüléskori terhességi kor, magzati születési súly és csoportokon belül a dohányzók arányának vonatkozásában. Ezzel szemben a praeeclampsiás csoportban szignifikánsan magasabbak voltak a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek, valamint a primiparák aránya a kontrollcsoporthoz képest. Magzati növekedési retardációt nem figyeltünk meg az egészséges várandós nők között, ezzel szemben 4 esetben fordult elő a praeeclampsiás csoportban. Tizennégy várandósnál állapítottunk meg súlyos praeeclampsiát, és öt esetben volt korai kezdetű a betegség.

5. táblázat. Egészséges várandós és praeeclampsiás terhes nők klinikai jellemzői a CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálatára kialakított csoportokban

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

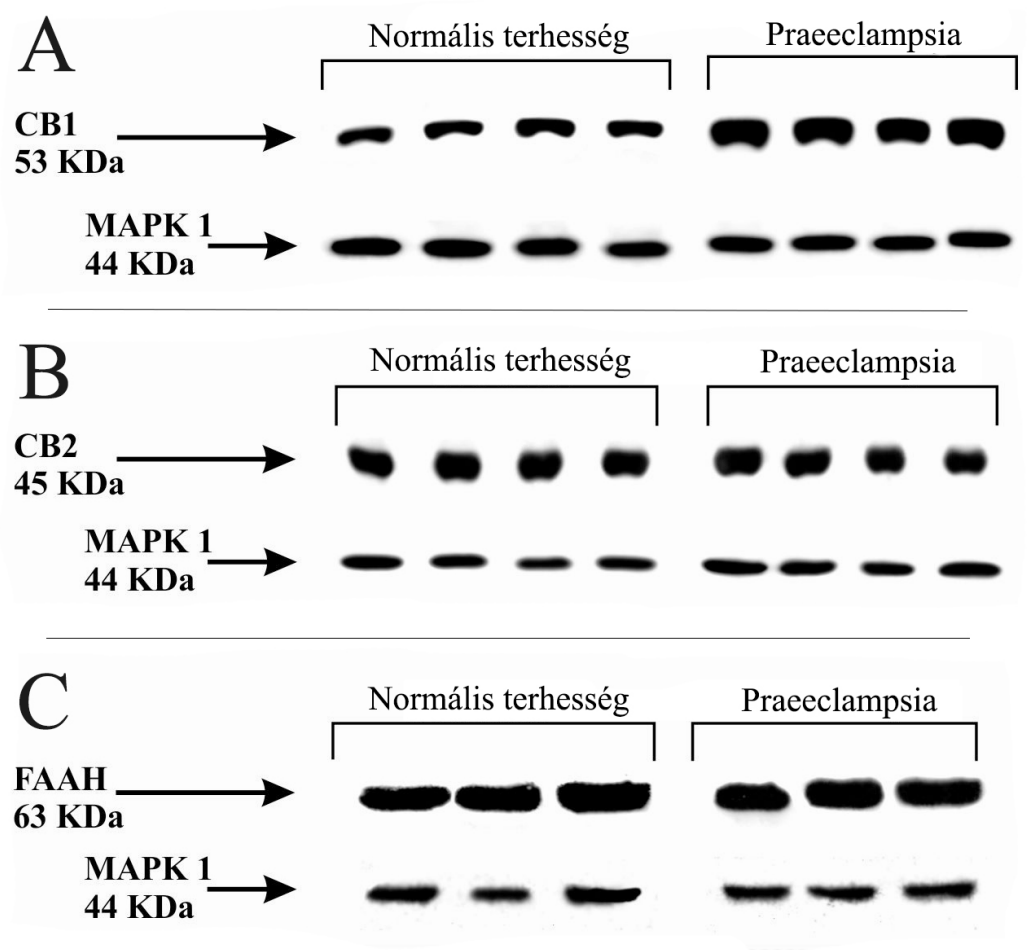
Az adatokat folyamatos változók esetében medián (interkvartilis tartomány), a kategorikus változók esetében abszolút szám (százalék) formájában adtuk meg.

(NS: nem szignifikáns. BMI: testtömeg-index)

4.2.2. Western blot

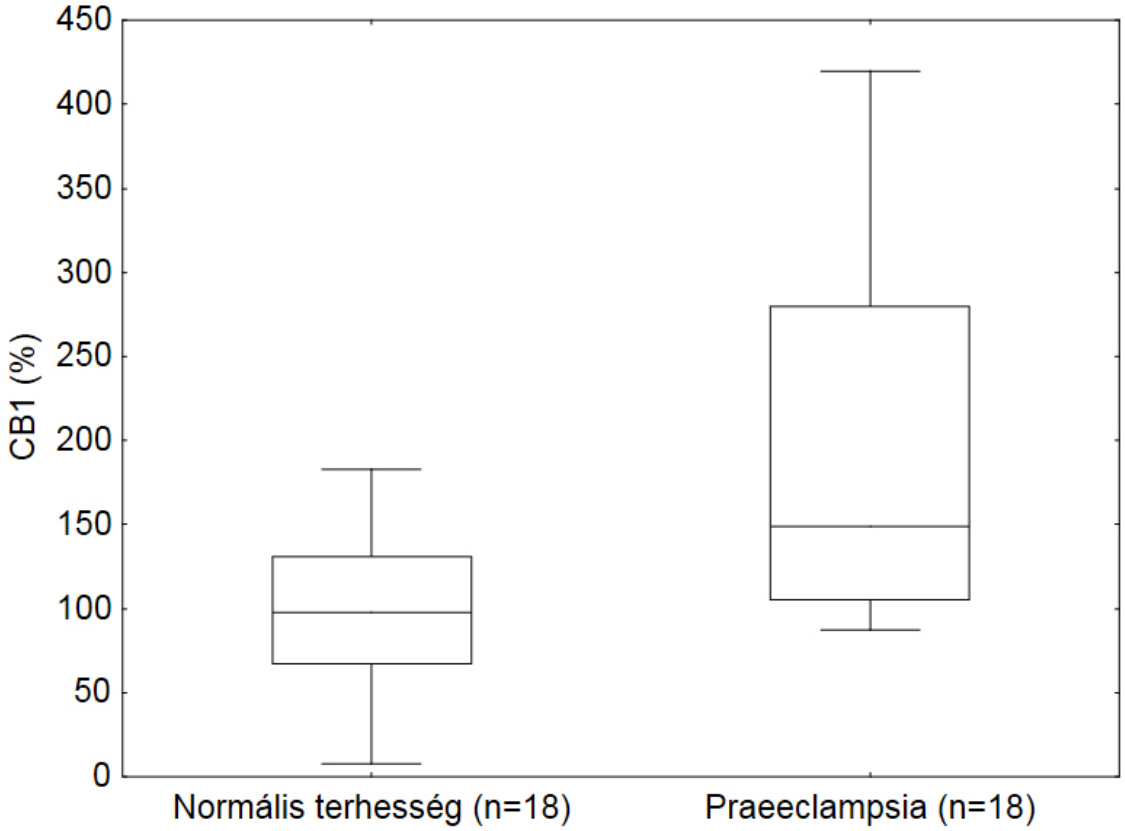
A CB1, CB2 és FAAH expressziók reprezentatív Western blotjait a *10. ábra* mutatja. A denzitometria analízis alapján a CB1 placentaris expressziója szignifikánsabb magasabb volt praeeclampsiásokban a normotenzív, egészséges várandósokhoz képest (149,3 (105,0-279,7) % versus 98,1 (67,3-131,0) %, p=0,008; *11. ábra*). Ugyanakkor nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a két vizsgálati csoport placentaris CB2 (105,5 (80,9-133,2) % versus 65,8 (45,5-128,4) %, p>0,05; *12. ábra*) és FAAH (112,2 (94,7-143,8) % versus 91,2 (63,3-128,4) %, p>0,05; *13. ábra*) expressziói között.

DOI:10.14753/SE.2016.1883



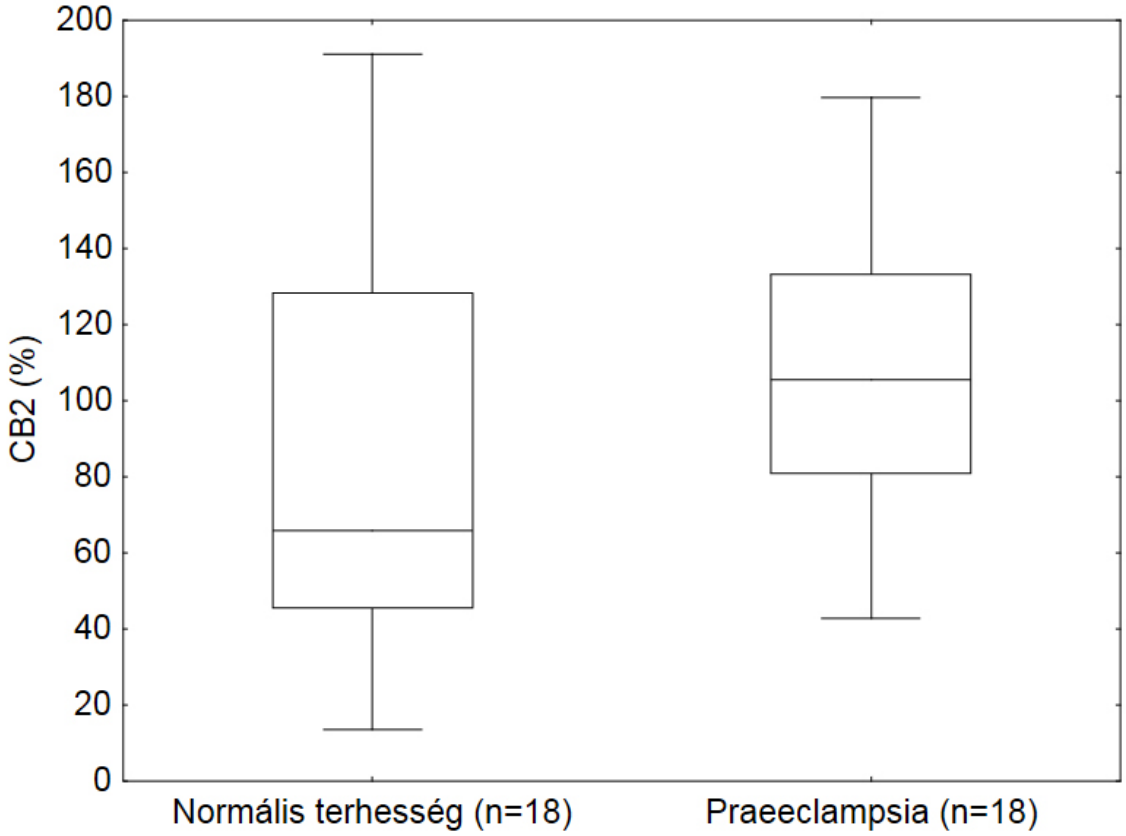
10. ábra. CB1 (A), CB2 (B) és FAAH (C) expressziók reprezentatív Western blotjai normális és praeeclampsiás placentaszövetben.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

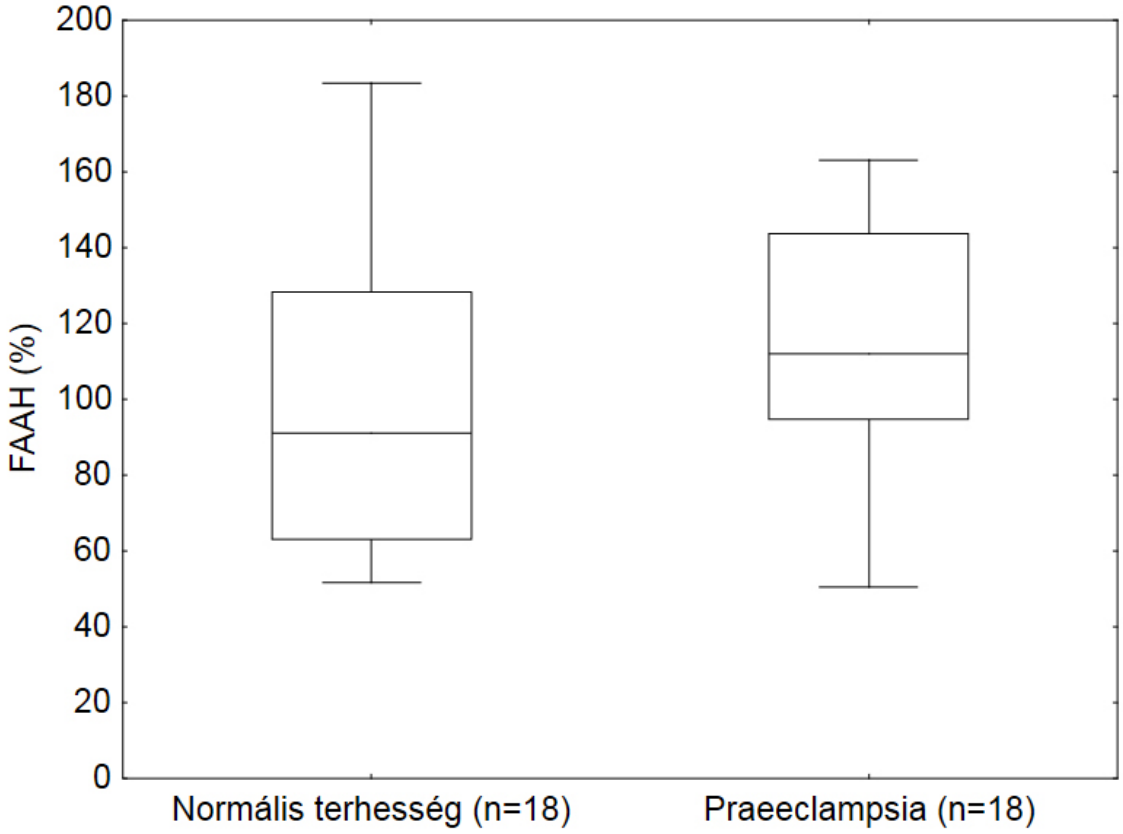


11. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők placentaris cannabinoid receptor 1 (CB1) expressziós szintjei (p=0,008). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)

DOI:10.14753/SE.2016.1883



12. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők placentaris cannabinoid receptor 2 (CB2) expressziós szintjei (p>0,05). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)

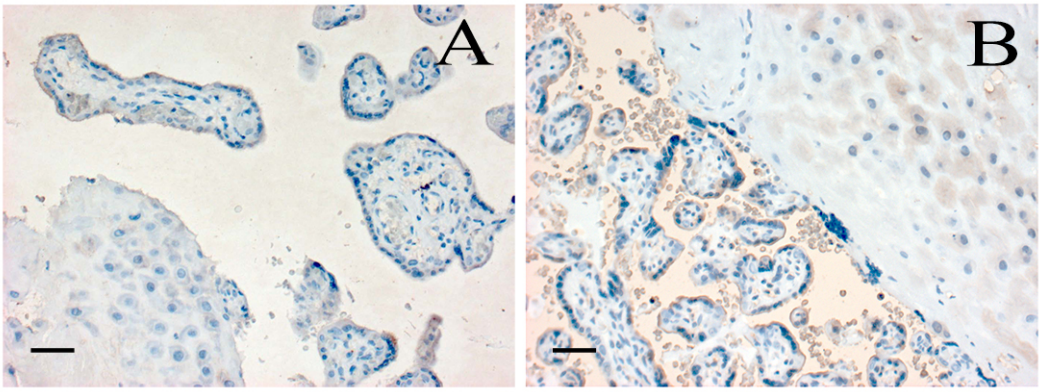


13. ábra. Egészséges és praeeclampsiás várandós nők placentaris zsírsav-amid hidroláz (FAAH) expressziós szintjei (p>0,05). Középső vonal: medián; Box: interkvartilis tartomány (25-75 percentilis); Whisker: tartomány (kilógó értékek kizárva)

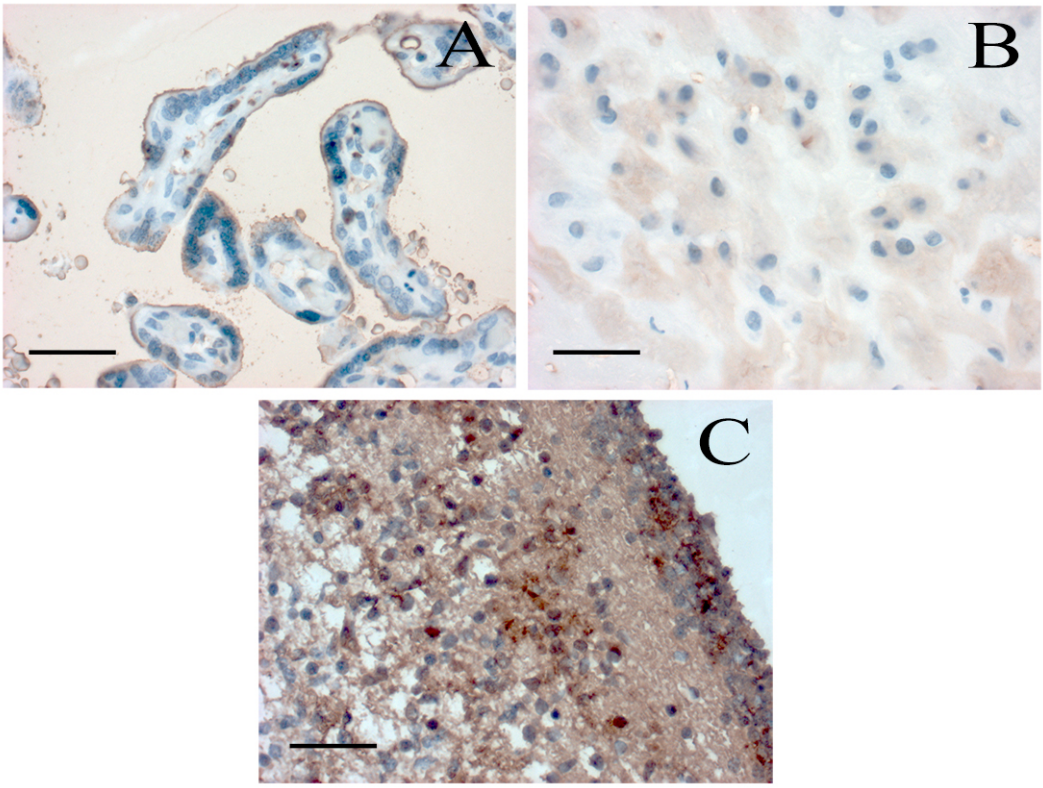
4.2.3. Immunhisztokémia

CB1 immunreaktív festődési mintázatok. Erős CB1 immunreakciót észleltünk a syncytiotrophoblast rétegben, valamint az érfalak endothelsejtjeiben. Kevésbé intenzív, de pozitív festődést mutatott a decidua, a kapilláris simaizomsejtek, a stromális fibroblasztok és az amnion. Az említett szövetekben a CB1 immunpozitivitás mind normális, mind praeeclampsiás szövetekben megfigyelhető volt, a festődés azonban jelentősen erőteljesebb volt a praeeclampsiás mintákban (*14. és 15. ábra*).

DOI:10.14753/SE.2016.1883

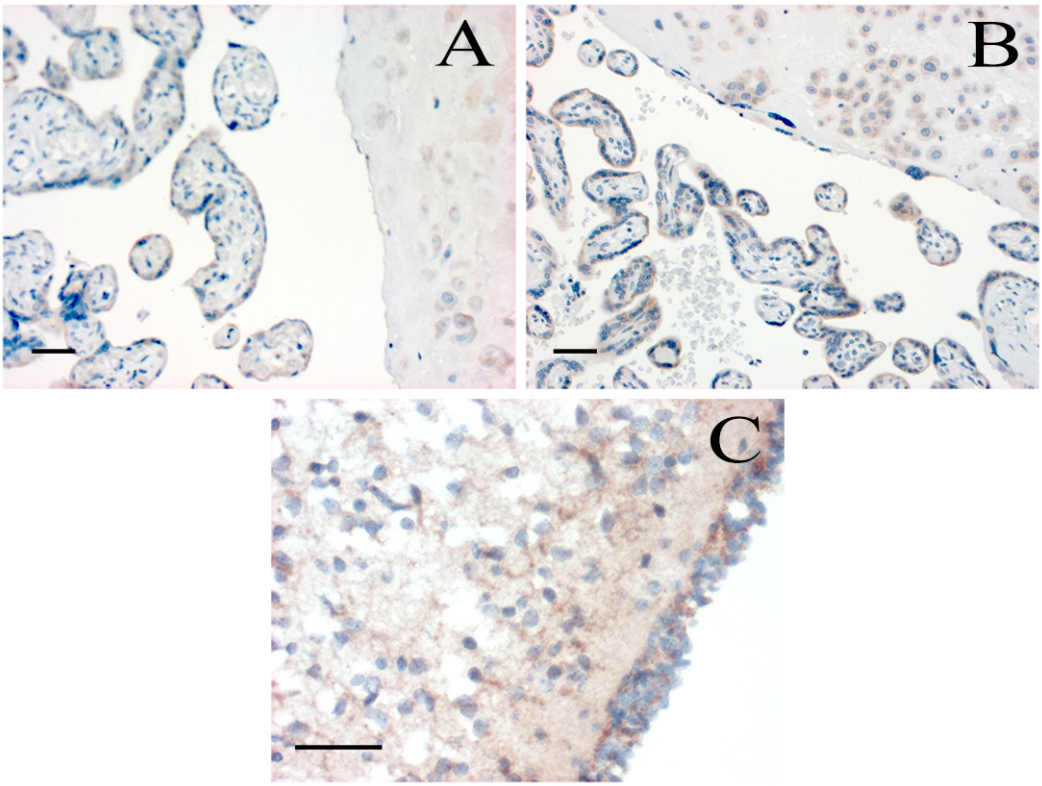


14. ábra. CB1-specifikus festődés normális (A) és praeeclampsiás (B) placentaszövetben
(a képek 200x-os nagyítással készültek). Jelhossz: 100 µm.



15. ábra. Erős CB1 festődés praeeclampsiás placenta villusokban (A) és deciduában (B) 400x-os nagyítás mellett, valamint CB1 festődés pozitív kontroll humán kisagyszövetben (C). Jelhossz: 100 µm.

CB2 immunreaktív festődési mintázatok. CB2 immunreakciót észleltünk mind a normális, mind a praeeclampsiás placentában, azonban a két csoport között nem találtunk eltérést a festődés intenzitását és lokalizációját illetően. Pozitív reakciót mutattak a syncytiotrophoblastok és stromalis fibroblasztok, azonban alacsonyabb intenzitással, mint a CB1 esetében. Az érfalban nem, ugyanakkor a deciduában észleltünk CB2 immunreaktivitást. Ezen felül az amnionban foltszerűen elszórt CB2 immunpozitivitást találtunk. (*16. ábra*)



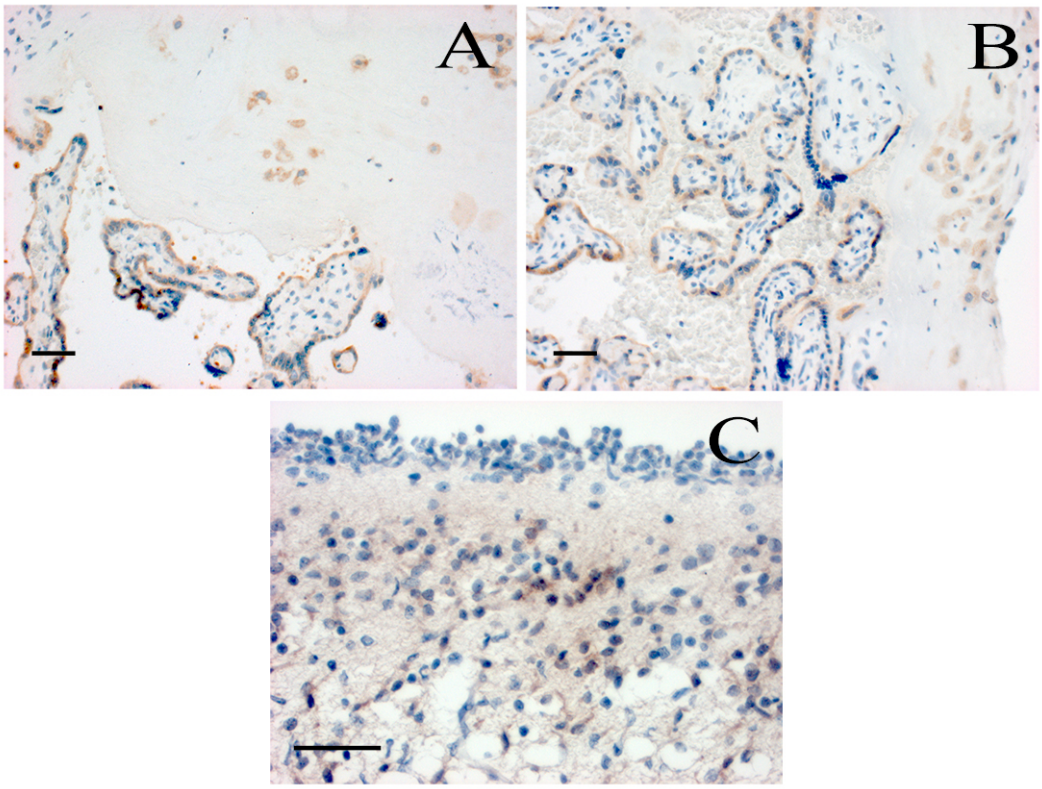
16. ábra. CB2 festődés normális (A) és praeeclampsiás (B) placentaszövetben (200x-os nagyítás), valamint pozitív kontroll humán kisagyszövetben (C) (400x-os nagyítás). Jelhossz: 100 µm.

FAAH immunreaktív festődési mintázatok. A CB2 receptorhoz hasonló festődési mintázatot mutatott az FAAH enzim is, ennek megfelelően pozitív reakciót figyeltünk meg a syncytiotrophoblastokban és stromalis fibroblasztokban (bár a festődés kevésbé volt intenzív a CB1-hez viszonyítva). Nem találtunk FAAH immunreakciót az érfalban, viszont megfigyelhető volt a deciduában, és foltszerű eloszlásban az amnionban. Az

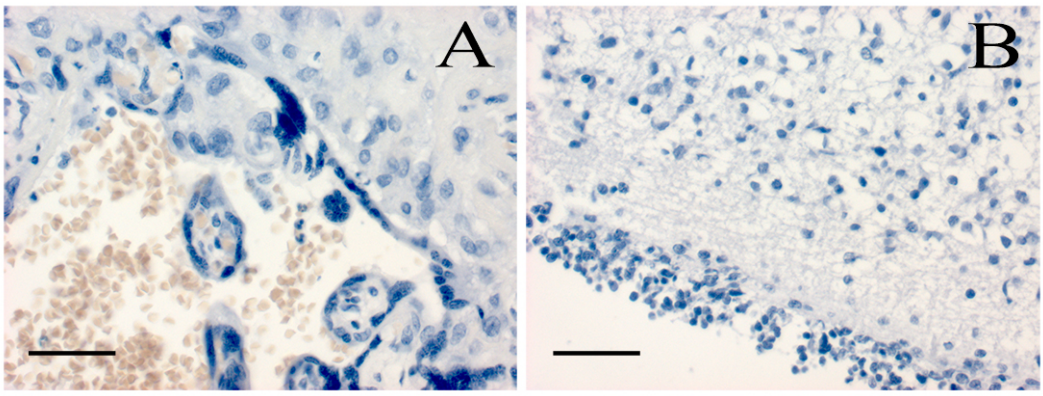
DOI:10.14753/SE.2016.1883

FAAH festődés intenzitása és lokalizációja hasonló volt normális és praaeclampsiás lepényben. (*17. ábra*)

A negatív kontroll festéseket a *18. ábrán* mutatjuk be.



17. ábra. FAAH festődés normális (A) és praeeclampsiás (B) placentaszövetben (200x-os nagyítás), valamint pozitív kontroll humán kisagyszövetben (C) (400x-os nagyítás). Jelhossz: 100 µm.



18. ábra. Humán placenta villusok és decidua (A), valamint humán kisagyszövet (B) negatív kontroll festése, 400x-os nagyításon. Jelhossz: 100 µm.

5. Megbeszélés

5.1. Szérum anandamid szint vizsgálata praeeclampsiában

Vizsgálatunkban egészséges várandós és praeeclampsiás terhes nők keringő szérum anandamid, sFlt-1 és PlGF szintjeit mértük. Ennek során kimutattuk, hogy a szérum anandamid szintek csökkentek praeeclampsiában, ugyanakkor nem mutattak összefüggést az angiogén faktorok értékeivel.

Az egészséges várandós csoportban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a BMI és anandamid értékek között. Ennek megfelelően az anandamid szintek szignifikánsan magasabbak voltak túlsúlyos és obez várandós nőkben. Ezen megfigyelésünk megerősíti azon korábbi kutatásokat, amelyek összefüggést mutattak ki az endocannabinoid rendszer kóros aktivációja és az obezitás között. A rendszer központi idegrendszeri aktivációja növeli a táplálékbevitelt és elősegíti a súlynövekedést. Emellett erős negatív korrelációt mutattak ki az emberi zsírszövet FAAH expressziója és a keringő anandamid szintek között [199, 200]. Egér adipocytákban, *in vitro* a CB1 agonisták lipoprotein-lipáz aktivitást növelő, ezáltal végül a lipogenezist fokozó hatása magyarázhatja az anandamid obezitást serkentő perifériás mechanizmusát [201]. Ugyanakkor nem találtunk az előbbiekhez hasonló összefüggést vizsgálatunk praeeclampsiás csoportjában, sőt, alacsonyabb anandamid szinteket figyeltünk meg a magasabb terhesség előtti BMI értékek ellenére. Ez alapján feltételezhető, hogy a praeeclampsiában mért csökkent anandamid szintekért más folyamatok felelősek.

Az 5.2. alfejezetben bemutatjuk kutatásunk azon eredményét, amely szerint praeeclampsiában erős CB1 expressziót figyeltünk meg többek között a placenta syncytiotrophoblastjaiban. Ezért feltételezzük, hogy a praeeclampsiában tapasztalt alacsony szérum anandamid koncentráció a CB1-et fokozottan expresszáló, ezáltal anandamidot nagyobb mennyiségben megkötő syncytiotrophoblastoknak köszönhető. Megjegyezzük azonban, hogy Abán és mtsai hasonló CB1 fehérje expressziót mértek egészséges és praeeclampsiás lepényi szövetekben [202].

Korábbi tanulmányok kimutatták a leptin FAAH-t stimuláló hatását humán T-lymphocytákban [203] és humán lymphoma sejtekben [204]. Emellett szintén FAAH aktivitást növelő hatással rendelkezik az interleukin-6 (IL-6) humán lymphocytákban [205]. Mind a leptin, mind az IL-6 szintek emelkedettek praeeclampsiában [206, 207].

Ezáltal a leptin vagy IL-6 hatás következtében megnövekedett lymphocyta FAAH expresszió potenciális felelőse lehet a praeeclampsiában csökkent anandamid szinteknek. Ezen felvetést további kutatások erősíthetik meg a jövőben a lymphocyta FAAH expresszió vizsgálatával perifériás vérben, praeeclampsiás és egészséges várandósokban.

A citoszolban anandamid-kötő fehérjeként viselkedhet az albumin és a 70 kDa-os hősokkfehérje (heat shock protein 70, Hsp70) [208]. Munkacsoportunk korábban kimutatta a Hsp70 emelkedett szérumszintjét praeeclampsiában [209-211]. Lehetséges, hogy a Hsp70 chaperon fehérjeként megköti az anandamidot a perifériás keringésben, ezáltal alacsony szérumszintet előidézve, továbbá albuminhoz kötve az anandamid a vesén keresztül is exkrécióra kerülhet a vizelettel történő albuminvesztés során. Mindazonáltal nem találtunk összefüggést a keringő anandamid szintek és a proteinuria súlyossága között praeeclampsiás várandós nőkben.

Korábbi kutatások a keringő angiogén faktorok és antagonistáik központi szerepét állapították meg a praeeclampsia patogenezisében [96]. Jelen vizsgálatunkban a szérum sFlt-1 és PlGF koncentrációkat is meghatároztuk elektrokemilumineszcens immunoassay technikával egészséges várandós és praeeclampsiás terhes nőkben. Az emelkedett sFlt-1 és csökkent PlGF szintek azonban nem álltak összefüggésben a szérum anandamid koncentrációkkal praeeclampsiás nőkben, amely a keringő angiogén faktorok és anandamid szintek egymástól független változására utal praeeclampsiában.

Mind az exogén, mind az endogén cannabinoidok gyulladásgátló hatását leírták. Az anandamid a Th17-mediált gyulladást csillapítja *in vivo* az IL-10 termelés serkentésén keresztül, amely proinflammatorikus útvonalakra ható különböző mikroRNS-eken keresztül IL-17 és IFN-γ csökkenéshez vezet [212]. Emellett az endocannabinoidok a citokinek Th1-ről Th2 irányba történő eltolódását okozzák a sejtaktiváció szuppressziója, valamint a proinflammatorikus citokintermelés gátlása és NF-κB-dependens apoptosis által [213]. Mind az anandamid, mind az exogén Δ^9-THC serkenti a regulátoros T-sejt (Treg) funkciókat CB1 és CB2 receptorokon keresztül, ezáltal a gyulladásos citokinek és kemokinek szignifikáns szuppresszióját okozva [214]. Mindebből adódóan feltételezhető, hogy a csökkent keringő anandamid szintek hozzájárulhatnak a kifejezett anyai szisztémás gyulladásos válaszreakcióhoz, és

növelhetik a perifériás vér Th1/Th2, valamint Th17/Treg sejtek arányát, amelyek a praeeclampsia maternalis szindrómájának jellemzői.

Az endocannabinoid rendszer krónikus aktivációja komplex szív-érrendszeri hatásokkal bír, elsősorban bradycardiát, valamint a vérnyomás és myocardialis kontraktilitás csökkenését eredményezi CB1 receptor-mediált stressz szignalizáción és következményes sejthalálon keresztül [149]. Az utóbbiak hátterében álló reakciók között említhető az autonóm kiáramlás szabályozása preszinaptikus autonóm idegvégződéseken és a központi idegrendszeren keresztül, valamint közvetlen myocardialis hatások is [154]. A vazodilatációs hatások CB1 és TRPV1 receptor-, illetve NO-mediált vagy NO-független útvonalakon keresztül érvényesülhetnek. Ezek alapján lehetséges, hogy a csökkent szérum anandamid szintek szerepet játszanak a praeeclampsiában létrejövő vérnyomásemelkedésben. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns összefüggést az anandamid szintek és vérnyomásértékek között a praeeclampsiás csoportban, valamint az sFlt-1 és PlGF szintek sem korreláltak a vérnyomásértékekkel vagy a betegség súlyosságával, amely a vérnyomás komplexebb szabályozásának voltára utal ezen terhesség-specifikus betegség esetében. Érdekes ugyanakkor, hogy transzgénes patkány praeeclampsiamodellben a koraterhességben angiotensin II által okozott arteria uterina kontrakció csökkenését érték el az anandamid hidrolízis gátlásával, amely a renin-angiotensin és az endocannabinoid rendszer interakciójának szerepére utalhat a vaszkuláris reaktivitás növekedésében a terhességi magasvérnyomás korai szakaszában [215].

Vizsgálatunkban a praeeclampsiás betegekben mért, a betegség súlyosságától, a fellépés időpontjától és az intrauterin növekedési retardáció jelenlététől független, hasonló szérum anandamid szintek a praeeclampsia komplex etiológiájával magyarázhatóak. Számos genetikai, viselkedési és környezeti faktor interakciója szükséges, hogy ezen terhességspecifikus kórkép típusos kialakulását eredményezze. Munkacsoportunk korábban számos genetikai és szolubilis faktorról számolt be, amelyek összefüggésben állnak a praeeclampsia súlyosságával és komplikációival, például a HELLP-szindrómával és a magzati növekedési retardációval [210, 216-218]. Előfordulhat ugyanakkor, hogy a praeeclampsiás csoport relatíve alacsony mintaszáma gátolta meg a hatás kimutatását az alcsoport analízisek során.

Végeredményben megállapíthatjuk, hogy az irodalomban elsőként mutattuk ki az anandamid csökkent szérumszintjét praeeclampsiás várandósokban. A jelenség oka és következménye ugyanakkor továbbra is felderítésre szorul.

5.2. CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálata a placentában

Kutatásunk ezen részében a CB1, CB2 receptorok és az FAAH enzim expresszióját vizsgáltuk egészséges várandósok és praeeclampsiás nők lepénymintáiban. Western blot technikával végzett mérések szerint a CB1 expresszió jelentősen erősebbnek mutatkozott praeeclampsiás lepényben, amely eredményt megerősítette az erős CB1 immunpozitivitás különböző lepényi területeken. Nem találtunk ugyanakkor szignifikáns eltérést a CB2 és FAAH expressziók és immunreaktivitás tekintetében praeeclampsiás és normál lepények között.

Pozitív CB1, CB2 és FAAH immunreakciót észleltünk a syncytiotrophoblastokban, a boholy mesenchymában és a deciduában egészséges és praeeclampsiás lepényekben is. Erős CB1 immunpozitivitást találtunk az erek endothel sejtjeiben, valamint mérsékelt reakciót az érfal simaizomban, ugyanakkor ezen lokalizációkban CB2 vagy FAAH festődés nem volt detektálható. A chorionlemez amnionhámjában kevésbé intenzív CB1 immunreakciót, és foltszerű elrendeződésben pozitív CB2 és FAAH festődést találtunk. Eredményeink összhangban álltak az endocannabinoid rendszer humán placentaris lokalizációját leíró korábbi publikációkkal [219-222].

A CB1 expresszió és immunreaktivitás praeeclampsiás mintákban markánsan magasabb volt a syncytiotrophoblastokban és a boholy mesenchymában a normál terhességekhez képest. Ezen eredmény egybevág korábbi tanulmányokkal, amelyek erős CB1 immunpozitivitásról számoltak be spontán vetélésből nyert lepények trophoblast sejtjeiben, bár praeeclampsiában nem találtunk alacsonyabb FAAH reaktivitást a syncytiotrophoblastokban a spontán vetéléssel szemben [222]. Eredményeink az endocannabinoid rendszer implantációban és lepényfejlődésben betöltött szerepével magyarázhatóak. Terhes patkányokban az endocannabinoid szintek fokozatosan növekednek a terhesség előrehaladtával, míg az FAAH aktivitás állandó szinten maradt a placentáció alatt [223]. Míg az FAAH a magzat és placenta védelméért felelős a magas anandamid szintekkel szemben [123], a magasabb NAPE-PLD aktivitás következtében létrejövő idő előtti emelkedett anandamid szint elégtelen placentációhoz

vezethet a kóros trophoblast differenciáció és invázió következtében [224]. A trophoblast sejtek az anyai decidua inváziójáért, ezáltal a placenta kialakításáért felelnek. A szorosan szabályozott invázió az endocannabinoidok által erősen befolyásolt folyamat, a CB1 mind magas, mind alacsony expressziója elégtelen trophoblast migrációs képességhez vezet [225]. Feltételezésünk szerint a magas CB1 expresszió elégtelen trophoblast invázió következtében kóros placentációhoz, ezáltal praeeclampsia kialakulásához vezethet.

Magas CB1 expressziót és immunpozitivitást figyeltünk meg praeeclampsiás deciduában is. Az irodalom alapján korábban részletezésre került, miszerint a szintetikus cannabinoidok gátolják a humán deciudasejtek differenciálódását és apoptózishoz vezetnek cAMP-dependens útvonalon, CB1 aktiváción keresztül [179]. A cannabinoid hatásnak kitett sejtek kevesebb decidualizáció-specifikus markert expresszáltak (úm. prolaktin, laminin és IGFBP-1), és szignifikáns cAMP-szint csökkenést mutattak, amely DNS fragmentációhoz és morfológiai változásokhoz vezetett a decidualis fibroblasztokban. Vagyis a magas CB1 expresszió megnövekedett apoptosishoz vezet, gátolva a decidua kialakulását. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy a túlzott CB1 expresszió inkább a decidua remodelling folyamatát zavarja meg, ezáltal gátolva a megfelelő placentációt, spontán vetélést vagy praeeclampsiát okozva.

Az immunhisztokémia alapján figyelemre érdemes eredmény volt a magas CB1 immunreakció a boholy kapilláris endothelben és simaizomsejtekben praeeclampsiás placenta mintákban, normál terhességhez viszonyítva. Ez lehet a kóros placentációra adott adaptív válasz is, mivel az endocannabinoidok CB1, TRPV1, valamint NO-mediált és NO-független útvonalakon keresztül vazodilatációt okozhatnak [154], növelve a placenta vérellátását. Az anandamid több különböző módon fejti ki vasorelaxáns hatását endothelsejteken, például az indukálható NO-szintáz aktivitásának és expressziójának növelésével (NO-mediált útvonal) [158]. Az agyi keringésben a CB1 közvetlen vazodilatátor hatással rendelkezik az érfal simaizom sejteken az L-típusú kalcium csatornán keresztüli kalciumbeáramlás gátlása által [159].

A közelmúltban Abán és mtsai meghatározták a CB1 és FAAH expressziót és lokalizációt egészséges és praeeclampsiás lepényekben. Vizsgálatukban hasonló CB1 expressziót mértek normális és praeeclampsiás szövetekben, ugyanakkor jelentősen magasabb NAPE-PLD, és alacsonyabb vagy nem érzékelhető FAAH expressziót

találtak praeeclampisában. Ezen eredmények megerősítik az endocannabinoid rendszer kóros aktiválódásának tényét praeeclampsiában, ugyanakkor a tanulmány nem tér ki a deciduális expresszióra, illetve a CB2 expressziójára és lokalizációjára. Az előbbi kutatás és a saját eredményeink közötti különbséget a praeeclampsiás csoport terhességi korában, a betegség súlyosságában és az alkalmazott antitestekben mutatkozó eltérések magyarázhatják.

Vizsgálatunk korlátozó tényezője a placentaris anandamid szintek és NAPE-PLD expresszió mérésének hiánya. A kutatás eset-kontroll felépítése miatt direkt ok-okozati következtetést sem vonhatunk le az eredményekből. Ugyanakkor a kóros placentáció a terhesség első felében alakul ki, míg a klinikai szindróma csak a második félben jelenik meg, amely kizárja a placenta prospektív vizsgálatának lehetőségét. Felmerül, hogy a megnövekedett CB1 expresszió inkább a praeeclampsia következménye, mint oka, azonban a praeeclampsia rizikófaktorai, illetve kórélettani folyamatai és a placentaris CB1 expressziók közötti összefüggésekre vonatkozó adat nem található az aktuális irodalomban. Kísérletes vizsgálatok szükségesek a megnövekedett CB1 placentáris expresszió oki szerepének tisztázásához praeeclampsiában.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

6. Következtetések

1. Vizsgálatunkban csökkent szérum anandamid szintet mutattunk ki praeeclampsiában, ami az anandamid CB1-et fokozottan expresszáló syntitiotrophoblasthoz történő kötődésének a következménye is lehet. Ismerve az endocannabinoidok gyulladásgátló és vérnyomáscsökkentő hatását, felmerül a csökkent anandamid szint szerepe az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció és vérnyomásemelkedés kialakulásában vagy erősítésében. A szérum anandamid koncentráció azonban nem mutatott összefüggést az sFlt-1 és PlGF szintekkel, ami arra utal, hogy a keringő anandamid szintek változása és az angiogén egyensúlyzavar független folyamatok praeeclampsiában.

2. Tanulmányunkban szignifikánsan emelkedett CB1 fehérje expressziót figyeltünk meg praeeclampsiás placentaszövetben Western blot technikával, amely eredményeket az immunhisztokémiai vizsgálat is megerősített. A CB1 immunpozitivitás jelentősen erősebb volt a syncytiotrophoblastokban, a boholy mesenchymában, a bolyhok capillárisainak endotheljében és simaizomsejtjeiben, valamint a deciduában és az amnionhámban praeeclampsiás mintákban a normál terhességekhez képest. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns eltérést a praeeclampsiás és normál placentaszövetek CB2 és FAAH expressziói és immunreaktivitása között. A megnövekedett CB1 expresszió rendellenes decidualizációhoz és a trophoblast invázió zavarához vezethet, ezáltal szerepet játszhat a praeeclampsia patogenezisében. A praeeclampsiás placentaminták kapilláris endotheljében és az érfal simaizomrétegben megfigyelt magas CB1 immunpozitivitás az endocannabinoidok vazodilatációs hatásának ismeretében lehet a kóros placentációra adott adaptív válasz is, növelve a placenta vérellátását. Bár a praeeclampsia pontos patogenezise máig ismeretlen, az endocannabinoid rendszer szerepet játszhat a betegség kialakulásában.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

7. Összefoglalás

Az endocannabinoid rendszer központi szerepet játszik a női reprodukcióban, ezen belül az implantáció, decidualizáció és placentáció folyamatában, valamint részt vesz a vérnyomás szabályozásában is. Kutatásunk során meghatároztuk a szérum anandamid koncentrációkat és a szolubilis fms-szerű tirozin-kináz (sFlt-1) és biológiailag aktív placentaris növekedés faktor (PlGF) szérumszintjét egészséges várandósokban és praeeclampsiás terhesekben, valamint vizsgáltuk a cannabinoid receptor 1 (CB1), CB2 és zsírsav-amid hidroláz (FAAH) expressziót és lokalizációt egészséges és praeeclampsiás placentákban. Az anandamid szérumszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak praeeclampsiás betegekben mint egészséges várandósokban, ami az anandamid CB1-et fokozottan expresszáló syncytiotrophoblasthoz történő kötődésének a következménye is lehet. Az endocannabinoidok gyulladásgátló és vérnyomáscsökkentő hatása miatt lehetséges, hogy a csökkent szérum anandamid koncentráció hozzájárul az anyai szisztémás gyulladás és vérnyomásemelkedés kialakulásához praeeclampsiában. A szérum anandamid koncentráció azonban nem mutatott összefüggést az sFlt-1 és PlGF szintekkel, ami arra utal, hogy a keringő anandamid szintek változása és az angiogén egyensúlyzavar független folyamatok praeeclampsiában. A Western blot technikával szemi-kvantifikált CB1 expresszió szignifikánsan magasabb értéket mutatott praeeclampsiában, amely eredményeket az immunhisztokémiai vizsgálat is megerősített. A CB1 immunpozitivitás jelentősen erősebb volt a syncytiotrophoblastokban, a boholy mesenchymában, a bolyhok capillárisainak endotheljében és simaizomsejtjeiben, valamint a deciduában és az amnionhámban praeeclampsiás mintákban a normál terhességekhez képest. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns eltérést a praeeclampsiás és normál placentaszövetek CB2 és FAAH expressziói és immunreaktivitása között. A megnövekedett CB1 expresszió rendellenes decidualizációhoz és a trophoblast invázió zavarához vezethet, ezáltal szerepet játszhat a praeeclampsia patogenezisében.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

8. Summary

The endocannabinoid system plays a key role in female reproduction, including implantation, decidualization and placentation, and also takes part in blood pressure regulation. We determined serum levels of anandamide along with those of total soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and biologically active placental growth factor (PlGF) in healthy and preeclamptic pregnant women, and also analyzed cannabinoid receptor 1 (CB1), CB2 and fatty acid amid hydrolase (FAAH) expressions and localization in normal and preeclamptic placenta. Serum levels of anandamide were significantly lower in preeclamptic patients than in healthy pregnant women, which might be a consequence of its binding to syncytiotrophoblasts overexpressing CB1. As endocannabinoids can exert anti-inflammatory effects and lower blood pressure, decreased circulating anandamide levels might contribute to the development of maternal systemic inflammation and hypertension in preeclampsia. Serum anandamide concentrations were not related to serum levels of sFlt-1 and PlGF in women with preeclampsia, suggesting that alterations in circulating levels of angiogenic factors and anandamide are independent processes in preeclampsia. CB1 expression semi-quantified by Western blotting was significantly higher in preeclamptic placenta, and these findings were confirmed by immunohistochemistry. CB1 immunoreactivity was markedly stronger in syncytiotrophoblasts, the mesenchymal core, villous capillary endothelial and smooth muscle cells, as well as in the decidua and amnion in preeclamptic samples compared to normal pregnancies. However, we did not find significant differences between preeclamptic and normal placenta in terms of CB2 and FAAH expressions and immunoreactivity. Increased CB1 expression might cause abnormal decidualization and impair trophoblast invasion, thus being involved in the pathogenesis of preeclampsia.

9. Irodalomjegyzék

[1] Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. (2013) Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. Eur J Obstet Gyn R B, 170: 1-7.

[2] English FA, Kenny LC, McCarthy FP. (2015) Risk factors and effective management of preeclampsia. Integr Blood Press Control, 8: 7-12.

[3] Sibai BM. (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol, 102: 181-192.

[4] Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M, National Institute of Child H, Human Development Network of Maternal-Fetal M-U. (2002) Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. Am J Obstet Gynecol, 186: 422-426.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Ananth CV, Keyes KM, Wapner RJ. (2013) Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. Bmj, 347: f6564.

[8] 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.

[9] Bianco A, Stone J, Lynch L, Lapinski R, Berkowitz G, Berkowitz RL. (1996) Pregnancy outcome at age 40 and older. Obstet Gynecol, 87: 917-922.

[10] Coonrod DV, Hickok DE, Zhu K, Easterling TR, Daling JR. (1995) Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: a population-based cohort study. Obstet Gynecol, 85: 645-650.

[11] Lawoyin TO, Ani F. (1996) Epidemiologic aspects of pre-eclampsia in Saudi Arabia. E Afr Med J, 73: 404-406.

[12] Lee CJ, Hsieh TT, Chiu TH, Chen KC, Lo LM, Hung TH. (2000) Risk factors for pre-eclampsia in an Asian population. Int J Gynaecol Obstet, 70: 327-333.

[13] Campbell DM, MacGillivray I, Carr-Hill R. (1985) Pre-eclampsia in second pregnancy. Brit J Obstet Gynaec, 92: 131-140.

[14] Cincotta RB, Brennecke SP. (1998) Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. Int J Gynaecol Obstet, 60: 23-27.

[15] Makkonen N, Heinonen S, Kirkinen P. (2000) Obstetric prognosis in second pregnancy after preeclampsia in first pregnancy. Hypertens pregnancy, 19: 173-181.

[16] Santema JG, Koppelaar I, Wallenburg HC. (1995) Hypertensive disorders in twin pregnancy. Eur J Obstet Gyn R B, 58: 9-13.

[17] Garner PR, D'Alton ME, Dudley DK, Huard P, Hardie M. (1990) Preeclampsia in diabetic pregnancies. Am J Obstet Gynecol, 163: 505-508.

[18] Ros HS, Cnattingius S, Lipworth L. (1998) Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study. Am J Epidemiol, 147: 1062-1070.

[19] McCowan LM, Buist RG, North RA, Gamble G. (1996) Perinatal morbidity in chronic hypertension. Brit J Obstet Gynaec, 103: 123-129.

[20] Sibai BM. (2002) Chronic hypertension in pregnancy. Obstet Gynecol, 100: 369-377.

[21] Wolfberg AJ, Lee-Parritz A, Peller AJ, Lieberman ES. (2004) Association of rheumatologic disease with preeclampsia. Obstet Gynecol, 103: 1190-1193.

[22] Pattison NS, Chamley LW, McKay EJ, Liggins GC, Butler WS. (1993) Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. Brit J Obstet Gynaec, 100: 909-913.

[23] Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A, Tanaka K. (1995) Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. Obstet Gynecol, 86: 555-559.

[24] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. Lancet, 365: 785-799.

[25] Duckitt K, Harrington D. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. Bmj, 330: 565.

[26] Basso O, Christensen K, Olsen J. (2001) Higher risk of pre-eclampsia after change of partner. An effect of longer interpregnancy intervals? Epidemiology, 12: 624-629.

[27] Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. (2002) The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. New Engl J Med, 346: 33-38.

[28] Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. (2003) Sperm exposure and development of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol, 188: 1241-1243.

[29] Dekker G, Sibai B. (2001) Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. Lancet, 357: 209-215.

[30] O'Brien TE, Ray JG, Chan WS. (2003) Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. Epidemiology, 14: 368-374.

[31] Wolf M, Sandler L, Munoz K, Hsu K, Ecker JL, Thadhani R. (2002) First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. J Clin Endocr Metab, 87: 1563-1568.

[32] Bianco AT, Smilen SW, Davis Y, Lopez S, Lapinski R, Lockwood CJ. (1998) Pregnancy outcome and weight gain recommendations for the morbidly obese woman. Obstet Gynecol, 91: 97-102.

[33] Fields SJ, Vainder M, Livshits G, Merlob P, Sirotta L. (1996) Obesity and the risk of toxaemia of pregnancy. Ann Hum Biol, 23: 353-362.

[34] Thadhani R, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Solomon CG, Curhan GC. (1999) High body mass index and hypercholesterolemia: risk of hypertensive disorders of pregnancy. Obstet Gynecol, 94: 543-550.

[35] Boggess KA, Lieff S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. (2003) Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. Obstet Gynecol, 101: 227-231.

[36] von Dadelszen P, Magee LA. (2002) Could an infectious trigger explain the differential maternal response to the shared placental pathology of preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction? Acta Obstet Gyn Scan, 81: 642-648.

[37] Zhang J, Meikle S, Trumble A. (2003) Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. Hypertens Pregnancy, 22: 203-212.

[38] Duley L. (2003) Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. Brit Med Bull, 67: 161-176.

[39] Haukkamaa L, Salminen M, Laivuori H, Leinonen H, Hiilesmaa V, Kaaja R. (2004) Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia. Am J Cardiol, 93: 805-808.

[40] Ramsay JE, Stewart F, Greer IA, Sattar N. (2003) Microvascular dysfunction: a link between pre-eclampsia and maternal coronary heart disease. Bjog-Int J Obstet Gy, 110: 1029-1031.

[41] 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.

[42] Roberts JM, Gammill H. (2005) Pre-eclampsia and cardiovascular disease in later life. Lancet, 366: 961-962.

[43] Mongraw-Chaffin ML, Cirillo PM, Cohn BA. (2010) Preeclampsia and cardiovascular disease death: prospective evidence from the child health and development studies cohort. Hypertension, 56: 166-171.

[44] Osol G, Bernstein I. (2014) Preeclampsia and maternal cardiovascular disease: consequence or predisposition? J Vasc Res, 51: 290-304.

[45] Sibai BM. (2004) Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol, 103: 981-991.

[46] Chaiworapongsa T, Chaemsaithong P, Korzeniewski SJ, Yeo L, Romero R. (2014) Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. Nat Rev Nephrol, 10: 531-540.

[47] Kuc S, Wortelboer EJ, van Rijn BB, Franx A, Visser GH, Schielen PC. (2011) Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. Obstet Gynecol Surv, 66: 225-239.

[48] Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Meiri H. (2007) First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia. Ultrasound Obstet Gynecol, 29: 128-134.

[49] Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. (2005) Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. Prenatal Diag, 25: 949-953.

[50] Odibo AO, Goetzinger KR, Huster KM, Christiansen JK, Odibo L, Tuuli MG. (2011) Placental volume and vascular flow assessed by 3D power Doppler and adverse pregnancy outcomes. Placenta, 32: 230-234.

[51] Plasencia W, Maiz N, Poon L, Yu C, Nicolaides KH. (2008) Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks and 21 + 0 to 24 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. Ultrasound Obstet Gynecol, 32: 138-146.

[52] Chien PF, Arnott N, Gordon A, Owen P, Khan KS. (2000) How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. Bjog-Int J Obstet Gy, 107: 196-208.

[53] Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. (2013) Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. Fetal Diagn Ther, 33: 8-15.

[54] Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. (2011) Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. Prenatal Diag, 31: 66-74.

[55] Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LC, Nicolaides KH. (2012) A competing risks model in early screening for preeclampsia. Fetal Diagn Ther, 32: 171-178.

[56] Moore Simas TA, Crawford SL, Bathgate S, Yan J, Robidoux L, Moore M, Maynard SE. (2014) Angiogenic biomarkers for prediction of early preeclampsia onset in high-risk women. J Matern Fetal Neonatal Med, 27: 1038-1048.

[57] 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. New Engl J Med, 350: 672-683.

[58] 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.

[59] Pedrosa AC, Matias A. (2011) Screening for pre-eclampsia: a systematic review of tests combining uterine artery Doppler with other markers. J Perinat Med, 39: 619-635.

[60] Walsh SW. (1985) Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. Am J Obstet Gynecol, 152: 335-340.

[61] (1994) CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. Lancet, 343: 619-629.

[62] Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguere Y. (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. Obstet Gynecol, 116: 402-414.

[63] Roberge S, Giguere Y, Villa P, Nicolaides K, Vainio M, Forest JC, von Dadelszen P, Vaiman D, Tapp S, Bujold E. (2012) Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. Am J Perinat, 29: 551-556.

[64] Villa PM, Kajantie E, Raikkonen K, Pesonen AK, Hamalainen E, Vainio M, Taipale P, Laivuori H. (2013) Aspirin in the prevention of pre-eclampsia in high-risk women. Bjog-Int J Obstet Gy, 120: 773-773.

[65] Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS. (2011) Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. Am J Obstet Gynecol, 204.

[66] Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, Godines M, Parry S, Macones G, Strauss JF. (2011) Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. Bmj-Brit Med J, 342.

[67] Levine RJ, Hauth JC, Curet LB, Sibai BM, Catalano PM, Morris CD, DerSimonian R, Esterlitz JR, Raymond EG, Bild DE, Clemens JD, Cutler JA. (1997) Trial of calcium to prevent preeclampsia. New Engl J Med, 337: 69-76.

[68] Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah AN, Duley L. (2010) Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. Cochrane Db Syst Rev.

[69] Costantine MM, Cleary K, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H, Human Development Obstetric--Fetal Pharmacology Research Units N. (2013) Pravastatin for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women. Obstet Gynecol, 121: 349-353.

[70] Edison RJ, Muenke M. (2004) Mechanistic and epidemiologic considerations in the evaluation of adverse birth outcomes following gestational exposure to statins. Am J Med Genet A, 131: 287-298.

[71] Gilbert JS, Verzwyvelt J, Colson D, Arany M, Karumanchi SA, Granger JP. (2010) Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor 121 Infusion Lowers Blood Pressure and Improves Renal Function in Rats With Placental Ischemia-Induced Hypertension. Hypertension, 55: 380-385.

[72] Woods AK, Hoffmann DS, Weydert CJ, Butler SD, Zhou Y, Sharma RV, Davisson RL. (2011) Adenoviral Delivery of VEGF(121) Early in Pregnancy

Prevents Spontaneous Development of Preeclampsia in BPH/5 Mice. Hypertension, 57: 94-U259.

[73] Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, Jank A, Kribs A, Cornely OA, Kreyssig C, Hemphill L, Rigby AC, Khedkar S, Lindner TH, Mallmann P, Stepan H, Karumanchi SA, Benzing T. (2011) Pilot Study of Extracorporeal Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 in Preeclampsia. Circulation, 124: 940-U178.

[74] Koga K, Osuga Y, Tajima T, Hirota Y, Igarashi T, Fujii T, Yano T, Taketani Y. (2010) Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. Fertil Steril, 94: 305-308.

[75] Shembrey MA, Noble AD. (1995) An instructive case of abdominal pregnancy. Aust Nz J Obstet Gyn, 35: 220-221.

[76] Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA. (2007) Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. Am J Perinat, 24: 257-266.

[77] Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. Science, 308: 1592-1594.

[78] Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. Obstet Gynecol annual, 1: 177-191.

[79] Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. (1999) Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. Am J Obstet Gynecol, 181: 718-724.

[80] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. (2010) Pre-eclampsia. Lancet, 376: 631-644.

[81] Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. (2010) Pathogenesis of Preeclampsia. Annu Rev Pathol-Mech, 5: 173-192.

[82] Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A. (1991) Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. Brit J Obstet Gynaec, 98: 648-655.

[83] Maynard SE, Karumanchi SA. (2011) Angiogenic factors and preeclampsia. Semin Nephrol, 31: 33-46.

[84] Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? J Clin Invest, 99: 2139-2151.

[85] Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. (2002) Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. Am J Pathol, 160: 1405-1423.

[86] Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. (1997) Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? J Clin Invest, 99: 2152-2164.

[87] Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. J Clin Invest, 91: 950-960.

[88] Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. (1994) A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. Brit J Obstet Gynaec, 101: 669-674.

[89] Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JWK, Lye SJ, Letarte M. (1997) Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. Endocrinology, 138: 4977-4988.

[90] Farina A, Sekizawa A, De Sanctis P, Purwosunu Y, Okai T, Cha DH, Kang JH, Vicenzi C, Tempesta A, Wibowo N, Valvassori L, Rizzo N. (2008) Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks' gestation from women destined to develop preeclampsia. Prenatal Diag, 28: 956-961.

[91] Burton GJ. (2009) Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. J Anat, 215: 27-35.

[92] Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. (2009) Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. Placenta, 30: S43-S48.

[93] Heazell AE, Moll SJ, Jones CJ, Baker PN, Crocker IP. (2007) Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. Placenta, 28 Suppl A: S33-40.

[94] Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Yagel S, Keshet E. (2008) A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia. Circ Res, 102: 1566-1574.

[95] Ahmad S, Ahmed A. (2004) Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. Circ Res, 95: 884-891.

[96] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li JY, Mondal S, Libermann TA, Morgan LP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfimction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest, 111: 649-658.

[97] Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. (2011) Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. Circulation, 123: 2856-2869.

[98] Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, Lim KH, Wenger JB, Thadhani R, Karumanchi SA. (2012) Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. Circulation, 125: 911-919.

[99] Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, Calda P, Holzgreve W, Galindo A, Engels T, Denk B, Stepan H. (2012) The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. Am J Obstet Gynecol, 206: 58 e51-58.

[100] Powers RW, Roberts JM, Plymire DA, Pucci D, Datwyler SA, Laird DM, Sogin DC, Jeyabalan A, Hubel CA, Gandley RE. (2012) Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia? Hypertension, 60: 239-246.

[101] Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. (2007) Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. Hypertension, 50: 1142-1147.

[102] Lu F, Longo M, Tamayo E, Maner W, Al-Hendy A, Anderson GD, Hankins GD, Saade GR. (2007) The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. Am J Obstet Gynecol, 196: 396 e391-397; discussion 396 e397.

[103] 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.

[104] Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA, Group CS. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. New Engl J Med, 355: 992-1005.

[105] Robinson CJ, Johnson DD. (2007) Soluble endoglin as a second-trimester marker for preeclampsia. Am J Obstet Gynecol, 197: 174 e171-175.

[106] Gu Y, Lewis DF, Wang Y. (2008) Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. J Clin Endocr Metab, 93: 260-266.

[107] 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.

[108] Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. (2007) Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. Am J Kidney Dis, 49: 186-193.

[109] Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compernolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin

DJ, Carmeliet P. (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med, 8: 831-840.

[110] Huppertz B. (2008) Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. Hypertension, 51: 970-975.

[111] Redman CW, Sargent IL. (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. Placenta, 24 Suppl A: S21-27.

[112] Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. (1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. Brit J Obstet Gynaec, 105: 632-640.

[113] 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.

[114] (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.

[115] Vatten LJ, Skjaerven R. (2004) Is pre-eclampsia more than one disease? Bjog-Int J Obstet Gy, 111: 298-302.

[116] Sibai BM, Stella CL. (2009) Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. Am J Obstet Gynecol, 200: 481 e481-487.

[117] Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA, Walters BN, Australasian Society for the Study of Hypertension in P. (2000) The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. Aust Nz J Obstet Gyn, 40: 133-138.

[118] Bulletins--Obstetrics ACoP. (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. Obstet Gynecol, 99: 159-167.

[119] American College of O, Gynecologists, Task Force on Hypertension in P. (2013) Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol, 122: 1122-1131.

[120] Abalos E, Duley L, Steyn DW, Henderson-Smart DJ. (2001) Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. Cochrane Db Syst Rev: CD002252.

[121] Duley L, Carroli G, Belizan J, Gonzalez L, Campodonico L, Bergel E, Taillades P, Ayers S, Wincott L, Gallagher K, Fredrick K, Reynolds J, Adadevoh S, Atallah A, George K, Grant A, Mahomed K, Mehta S, Mmiro F, Moodley J, Neilson J, Sheth S, Walker G, Chalmers I, Collins R, Munjanja S, Redman C, Elbourne D. (1995) Which Anticonvulsant for Women with Eclampsia - Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. Lancet, 345: 1455-1463.

[122] Smith JM, Lowe RF, Fullerton J, Currie SM, Harris L, Felker-Kantor E. (2013) An integrative review of the side effects related to the use of magnesium sulfate for pre-eclampsia and eclampsia management. Bmc Pregnancy Childb, 13.

[123] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Almada M, Costa MA, Teixeira NA. (2013) The Endocannabinoid System in the Postimplantation Period: A Role during Decidualization and Placentation. Int J Endocrinol, 2013: 510540.

[124] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, 346: 561-564.

[125] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, 365: 61-65.

[126] Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, 258: 1946-1949.

[127] Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. Eur J Pharmacol, 353: 23-31.

[128] Habayeb OM, Bell SC, Konje JC. (2002) Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. Life Sci, 70: 1963-1977.

[129] Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N. (2009) Enzymatic formation of anandamide. Vitam Horm, 81: 1-24.

[130] Taylor AH, Amoako AA, Bambang K, Karasu T, Gebeh A, Lam PM, Marzcylo TH, Konje JC. (2010) Endocannabinoids and pregnancy. Clin Chim Acta, 411: 921-930.

[131] Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T. (2011) Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Biofactors, 37: 1-7.

[132] Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. Chem Phys Lipids, 121: 149-158.

[133] McKinney MK, Cravatt BF. (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. Annu Rev Biochem, 74: 411-432.

[134] Kozak KR, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, Jakobsson PJ, Marnett LJ. (2002) Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. J Biol Chem, 277: 44877-44885.

[135] Kozak KR, Crews BC, Ray JL, Tai HH, Morrow JD, Marnett LJ. (2001) Metabolism of prostaglandin glycerol esters and prostaglandin ethanolamides in vitro and in vivo. J Biol Chem, 276: 36993-36998.

[136] van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, van Zadelhoff G, Leeflang BR, Veldink GA, Finazzi-Agro A, Vliegenthart JF, Maccarrone M. (2002) Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. J Med Chem, 45: 3709-3720.

[137] Schicho R, Storr M. (2014) IBD: Patients with IBD find symptom relief in the Cannabis field. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 11: 142-143.

[138] Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. (2005) The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. Pharmacol Biochem Behav, 81: 224-238.

[139] Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. (2010) GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. Curr Med Chem, 17: 1411-1429.

[140] Pertwee RG. (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? Br J Pharmacol, 152: 984-986.

[141] Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. (1995) Expression of central and

peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. Eur J Biochem, 232: 54-61.

[142] Di Marzo V, De Petrocellis L. (2010) Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. Curr Med Chem, 17: 1430-1449.

[143] Pistis M, Melis M. (2010) From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. Curr Med Chem, 17: 1450-1467.

[144] Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. (2012) The endocannabinoid system: an overview. Front Behav Neurosci, 6: 9.

[145] Pertwee RG. (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. Br J Pharmacol, 147 Suppl 1: S163-171.

[146] Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. (2005) Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. J Biol Chem, 280: 12212-12220.

[147] Sarnataro D, Grimaldi C, Pisanti S, Gazzerro P, Laezza C, Zurzolo C, Bifulco M. (2005) Plasma membrane and lysosomal localization of CB1 cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells. FEBS Lett, 579: 6343-6349.

[148] Dainese E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M. (2007) Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. Curr Med Chem, 14: 2702-2715.

[149] Pacher P, Kunos G. (2013) Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. FEBS J, 280: 1918-1943.

[150] Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, 58: 389-462.

[151] Montecucco F, Di Marzo V. (2012) At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. Trends Pharmacol Sci, 33: 331-340.

[152] Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Batkai S, Kunos G. (2008) Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. Hypertension, 52: 601-607.

[153] Steffens S, Pacher P. (2012) Targeting cannabinoid receptor CB(2) in cardiovascular disorders: promises and controversies. Br J Pharmacol, 167: 313-323.

[154] Pacher P, Steffens S. (2009) The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. Semin Immunopathol, 31: 63-77.

[155] Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. (1997) Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. J Pharmacol Exp Ther, 281: 1030-1037.

[156] Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Liu J, Harvey-White J, Brassai A, Jarai Z, Cravatt BF, Kunos G. (2005) Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289: H533-541.

[157] Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature, 400: 452-457.

[158] Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. (2002) Cardiovascular effects of cannabinoids. Pharmacol Ther, 95: 191-202.

[159] Hillard CJ. (2000) Endocannabinoids and vascular function. J Pharmacol Exp Ther, 294: 27-32.

[160] Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeya M, Ogawa H. (2009) Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. Circulation, 119: 28-36.

[161] Horvath B, Mukhopadhyay P, Hasko G, Pacher P. (2012) The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. Am J Pathol, 180: 432-442.

[162] Montecucco F, Burger F, Mach F, Steffens S. (2008) CB2 cannabinoid receptor agonist JWH-015 modulates human monocyte migration through defined intracellular signaling pathways. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 294: H1145-1155.

[163] Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. (2007) CB2-receptor

stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 293: H2210-2218.

[164] Lepicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. (2003) Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. Br J Pharmacol, 139: 805-815.

[165] Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. (2005) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. Mol Pharmacol, 67: 15-19.

[166] El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. (2009) Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. PLoS One, 4: e4579.

[167] El-Talatini MR, Taylor AH, Konje JC. (2009) Fluctuation in anandamide levels from ovulation to early pregnancy in in-vitro fertilization-embryo transfer women, and its hormonal regulation. Hum Reprod, 24: 1989-1998.

[168] Mendelson JH, Mello NK, Ellingboe J, Skupny AS, Lex BW, Griffin M. (1986) Marihuana smoking suppresses luteinizing hormone in women. J Pharmacol Exp Ther, 237: 862-866.

[169] Treinen KA, Sneeden JL, Heindel JJ. (1993) Specific inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation by delta 9-tetrahydrocannabinol in cultured rat granulosa cells. Toxicol Appl Pharmacol, 118: 53-57.

[170] Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE. (2006) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. Fertil Steril, 85: 653-660.

[171] Dalterio S, Bartke A, Burstein S. (1977) Cannabinoids inhibit testosterone secretion by mouse testes in vitro. Science, 196: 1472-1473.

[172] Wenger T, Rettori V, Snyder GD, Dalterio S, McCann SM. (1987) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in adult male rats. Neuroendocrinology, 46: 488-493.

[173] Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. (2005) Characterization of the endocannabinoid

system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. J Cell Sci, 118: 4393-4404.

[174] Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. (2005) Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. J Clin Endocr Metab, 90: 984-991.

[175] Schuel H, Burkman LJ, Lippes J, Crickard K, Mahony MC, Giuffrida A, Picone RP, Makriyannis A. (2002) Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. Mol Reprod Dev, 63: 376-387.

[176] Wang H, Xie H, Guo Y, Zhang H, Takahashi T, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, Cravatt BF, Dey SK. (2006) Fatty acid amide hydrolase deficiency limits early pregnancy events. J Clin Invest, 116: 2122-2131.

[177] Horne AW, Phillips JA, 3rd, Kane N, Lourenco PC, McDonald SE, Williams AR, Simon C, Dey SK, Critchley HO. (2008) CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. PLoS One, 3: e3969.

[178] Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN, Dey SK. (2004) Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. Nat Med, 10: 1074-1080.

[179] Moghadam KK, Kessler CA, Schroeder JK, Buckley AR, Brar AK, Handwerger S. (2005) Cannabinoid receptor I activation markedly inhibits human decidualization. Mol Cell Endocrinol, 229: 65-74.

[180] Gentilini D, Besana A, Vigano P, Dalino P, Vignali M, Melandri M, Busacca M, Di Blasio AM. (2010) Endocannabinoid system regulates migration of endometrial stromal cells via cannabinoid receptor 1 through the activation of PI3K and ERK1/2 pathways. Fertil Steril, 93: 2588-2593.

[181] Taylor AH, Ang C, Bell SC, Konje JC. (2007) The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. Hum Reprod Update, 13: 501-513.

[182] Wang H, Matsumoto H, Guo Y, Paria BC, Roberts RL, Dey SK. (2003) Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide

directs blastocyst activation for implantation. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 14914-14919.

[183] Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK. (1997) Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 4188-4192.

[184] Paria BC, Dey SK. (2000) Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. Chem Phys Lipids, 108: 211-220.

[185] Yang ZM, Paria BC, Dey SK. (1996) Activation of brain-type cannabinoid receptors interferes with preimplantation mouse embryo development. Biol Reprod, 55: 756-761.

[186] Wang H, Xie H, Sun X, Kingsley PJ, Marnett LJ, Cravatt BF, Dey SK. (2007) Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 83: 62-74.

[187] Helliwell RJ, Chamley LW, Blake-Palmer K, Mitchell MD, Wu J, Kearn CS, Glass M. (2004) Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. J Clin Endocr Metab, 89: 5168-5174.

[188] Costa MA, Fonseca BM, Keating E, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. (2014) 2-arachidonoylglycerol effects in cytotrophoblasts: metabolic enzymes expression and apoptosis in BeWo cells. Reproduction, 147: 301-311.

[189] Costa MA, Keating E, Fonseca BM, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. (2015) 2-Arachidonoylglycerol impairs human cytotrophoblast cells syncytialization: influence of endocannabinoid signalling in placental development. Mol Cell Endocrinol, 399: 386-394.

[190] Habayeb OM, Taylor AH, Evans MD, Cooke MS, Taylor DJ, Bell SC, Konje JC. (2004) Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? J Clin Endocr Metab, 89: 5482-5487.

[191] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. (2009) Anandamide-induced cell death: dual effects in primary rat decidual cell cultures. Placenta, 30: 686-692.

[192] Costa MA, Fonseca BM, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. (2015) The endocannabinoid anandamide induces apoptosis in cytotrophoblast cells: involvement of both mitochondrial and death receptor pathways. Placenta, 36: 69-76.

[193] Meccariello R, Battista N, Bradshaw HB, Wang H. (2014) Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. Int J Endocrinol, 2014: 412354.

[194] Wang H, Xie H, Dey SK. (2008) Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. PLoS One, 3: e3320.

[195] Mitchell MD, Sato TA, Wang A, Keelan JA, Ponnampalam AP, Glass M. (2008) Cannabinoids stimulate prostaglandin production by human gestational tissues through a tissue- and CB1-receptor-specific mechanism. Am J Physiol Endocrinol Metab, 294: E352-356.

[196] O'Brien WF. (1995) The role of prostaglandins in labor and delivery. Clin Perinatol, 22: 973-984.

[197] Nallendran V, Lam PM, Marczylo TH, Bankart MJ, Taylor AH, Taylor DJ, Konje JC. (2010) The plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, increase with the induction of labour. Bjog-Int J Obstet Gy, 117: 863-869.

[198] 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. Magyar Nőorv L, 63: 155-163.

[199] Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. (2005) Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. Diabetes, 54: 2838-2843.

[200] Rosenson RS. (2009) Role of the endocannabinoid system in abdominal obesity and the implications for cardiovascular risk. Cardiology, 114: 212-225.

[201] Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. J Clin Invest, 112: 423-431.

[202] Aban C, Leguizamon GF, Cella M, Damiano A, Franchi AM, Farina MG. (2013) Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: effects on nitric oxide synthesis. Placenta, 34: 67-74.

[203] Maccarrone M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. (2003) Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. J Biol Chem, 278: 13318-13324.

[204] Gasperi V, Fezza F, Spagnuolo P, Pasquariello N, Maccarrone M. (2005) Further insights into the regulation of human FAAH by progesterone and leptin implications for endogenous levels of anandamide and apoptosis of immune and neuronal cells. Neurotoxicology, 26: 811-817.

[205] Gasperi V, Ceci R, Tantimonaco M, Talamonti E, Battista N, Parisi A, Florio R, Sabatini S, Rossi A, Maccarrone M. (2014) The fatty acid amide hydrolase in lymphocytes from sedentary and active subjects. Med Sci Sports Exerc, 46: 24-32.

[206] Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karadi I, Prohaszka Z, Rigo 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.

[207] Szarka A, Rigo J, Jr., Lazar L, Beko G, Molvarec A. (2010) Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. BMC Immunol, 11: 59.

[208] Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. (2009) Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. Chem Biol, 16: 624-632.

[209] Molvarec A, Prohaszka Z, Nagy B, Szalay J, Fust G, Karadi I, Rigo 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.

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

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

[211] Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karadi I, Prohaszka Z, Rigo 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.

[212] Jackson AR, Nagarkatti P, Nagarkatti M. (2014) Anandamide attenuates Th-17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity response by triggering IL-10 production and consequent microRNA induction. PLoS One, 9: e93954.

[213] Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. (2009) Endocannabinoids and immune regulation. Pharmacol Res, 60: 85-92.

[214] Hegde VL, Hegde S, Cravatt BF, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. (2008) Attenuation of experimental autoimmune hepatitis by exogenous and endogenous cannabinoids: involvement of regulatory T cells. Mol Pharmacol, 74: 20-33.

[215] Pulgar VM, Yamaleyeva LM, Varagic J, McGee CM, Bader M, Dechend R, Howlett AC, Brosnihan KB. (2014) Increased angiotensin II contraction of the uterine artery at early gestation in a transgenic model of hypertensive pregnancy is reduced by inhibition of endocannabinoid hydrolysis. Hypertension, 64: 619-625.

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

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

[218] Rosta K, Molvarec A, Enzsoly A, Nagy B, Ronai Z, Fekete A, Sasvari-Szekely M, Rigo J, Jr., Ver A. (2009) Association of extracellular superoxide dismutase

(SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction. Eur J Obstet Gyn R B, 142: 134-138.

[219] Habayeb OM, Taylor AH, Bell SC, Taylor DJ, Konje JC. (2008) Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. Endocrinology, 149: 5052-5060.

[220] Park B, Gibbons HM, Mitchell MD, Glass M. (2003) Identification of the CB1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the human placenta. Placenta, 24: 990-995.

[221] Taylor AH, Finney M, Lam PM, Konje JC. (2011) Modulation of the endocannabinoid system in viable and non-viable first trimester pregnancies by pregnancy-related hormones. Reprod Biol Endocrinol, 9: 152.

[222] Trabucco E, Acone G, Marenna A, Pierantoni R, Cacciola G, Chioccarelli T, Mackie K, Fasano S, Colacurci N, Meccariello R, Cobellis G, Cobellis L. (2009) Endocannabinoid system in first trimester placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage. Placenta, 30: 516-522.

[223] Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Lam PM, Marczylo TH, Konje JC, Teixeira NA. (2012) Characterisation of the endocannabinoid system in rat haemochorial placenta. Reprod Toxicol, 34: 347-356.

[224] Sun X, Xie H, Yang J, Wang H, Bradshaw HB, Dey SK. (2010) Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. Proc Natl Acad Sci U S A, 107: 16887-16892.

[225] Xie H, Sun X, Piao Y, Jegga AG, Handwerger S, Ko MS, Dey SK. (2012) Silencing or amplification of endocannabinoid signaling in blastocysts via CB1 compromises trophoblast cell migration. J Biol Chem, 287: 32288-32297.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Fügedi G**, Molnár M, Rigó J Jr, Schönléber J, Kovalszky I, Molvarec A. (2014) Increased placental expression of cannabinoid receptor 1 in preeclampsia: an observational study. BMC Pregnancy Childbirth, 14: 395. (IF: 2,190)
2. Molvarec A, **Fügedi G**, Szabó E, Stenczer B, Walentin S, Rigó J Jr. (2015) Decreased circulating anandamide levels in preeclampsia. Hypertens Res, 38: 413-418. (IF: 2,658)

Az értekezés témájától független közlemények

1. 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: 3,133)
2. Toldi G, Vásárhelyi B, Biró E, **Fügedi G**, Rigó J Jr, Molvarec A. (2013) B7 Costimulation and Intracellular Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expression in Peripheral Blood of Healthy Pregnant and Pre-Eclamptic Women. Am J Reprod Immunol, 69: 264-271. (IF: 2,668)
3. Molvarec A, Gullai N, Stenczer B, **Fügedi G**, Nagy B, Rigó J Jr. (2013) Comparison of placental growth factor and fetal flow Doppler ultrasonography to identify fetal adverse outcomes in women with hypertensive disorders of pregnancy: an observational study. BMC Pregnancy Childbirth, 13: 161. (IF: 2,152)
4. Gullai N, Stenczer B, Molvarec A, **Fügedi G**, Veresh Z, Nagy B, Rigó J Jr. (2013) Evaluation of a rapid and simple placental growth factor test in hypertensive disorders of pregnancy. Hypertens Res, 36: 457-462. (IF: 2,936)

Összesített impakt faktor: 15,737.

DOI:10.14753/SE.2016.1883

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Rigó János professzor úrnak, aki megértésével és támogatásával lehetővé tette munkám megvalósulását, segítette az eredmények elérését.

Hálás köszönettel tartozom Molvarec Attila adjunktus úrnak, témavezetőmnek, aki végig megértő türelemmel, odafigyeléssel és rengeteg támogatással segített munkámban. Példát mutatva a kutatói precizitásban és körültekintésben, gondosan vezetett a tudomány világában, mégis szabad teret engedett a saját utamon.

Köszönöm a kitartó és mindig nyitott szakmai segítséget Kovalszky Ilona professzor asszonynak, Molnár Miklós docens úrnak és Schönléber Júlia doktornőnek, valamint az I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet szövettani laborja munkatársainak; munkám nem jöhetett volna létre a támogatásuk nélkül.

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

Hálás köszönettel tartozom Freisinger Ádámnak, Lőrincz M. Ákosnak az évek során adott útmutatásukért és tanácsaikért, Vad László Ádámnak a biztos háttérért és rengeteg segítségéért.

Szeretettel és hálával köszönöm a vég nélküli támogatást Édesapámnak és Édesanyámnak, hogy elindítottak és végig kísértek ezen az úton is. Köszönöm Füsi Katalinnak, hogy a hosszú évek alatt mellettem volt, bármikor.

Az értekezés tárgyát képező kutatómunkát az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok PD 109094 pályázata és a Magyar Hypertonia Társaság támogatta.