

ÚJ SEBÉSZETI, KÉPALKOTÓ ÉS MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE A PRAECLAMPSIA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEZÉSÉHEZ

Doktori tézisek

Dr. Szalai Gábor

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Than Nándor Gábor, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tamás Péter, PhD, egyetemi docens
Dr. Valent Sándor, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Perner Ferenc, DSc, professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Beke Artúr, PhD, egyetemi docens
Dr. Belics Zorán, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

1.1. A praeclampsia egy 'nagy szülészeti kórkép'

A praeclampsia a 'nagy szülészeti kórképek' egyik legsúlyosabbika. A terhességek 3-5 %-át érinti, és az egyik fő oka az anyai és perinatális megbetegedéseknek és halálozásoknak. Klinikai diagnózisának alapja a korábban normális vérnyomású betegnél a 20. terhességi hét után újonnan jelentkező magasvérnyomás és fehérjevizelés. A klinikai tünetek megjelenésének időpontja alapján beszélünk korai (<34. hét) és késői (≥34. hét) praeclamsziáról. A praeclampsia klinikai tünetei a késői formában enyhébbek, míg korai praeclamsziát súlyosabb tünetek kísérik és gyakran társul már meglévő anyai szisztémás betegséggel. A praeclampsia súlyos esetben generalizált endothel károsodáshoz és többszervi elégtelenséghez vezethet, főleg a májat, a veséket és a központi idegrendszert érintve. A praeclamsziát humán betegségnek tartják, mert más fajban még nem figyelték meg, csak néhány anekdotikus esetet kivéve főemlősökben. Azt egyértelműen tudjuk, hogy a betegség lepényi eredetű, amit az is bizonyít a legjobban, hogy a praeclampsia leghatékonyabb kezelése még mai is a méhlepény világrahozatala.

1.2. Patofiziológia és molekuláris mehanizmusok

Praeclamsziában a méhlepény hisztopatológiai eltérései figyelhetők meg, ami elégtelen trophoblast invázió következménye. Ilyenkor az anyai spirális artériák nem alakulnak át tágult, kis ellenállású uteroplacentáris erekké, és a méhlepény elégtelen vérellátása haemorheológiai változásokat és oxidatív stresszt okoz. A károsodott méhlepényből nagymennyiségű aponekrotikus sejttörmelék, syncytiotrophoblast mikropartikulum, citokinek, és más, még ismeretlen faktorok jutnak az anyai keringésbe. A praeclamsziának ezt a terminális útvonalát a lepényi eredetű anti-angiogén faktorok [pl.: szolubilis fms-like tirozin-kináz-1 (sFlt-1) és endoglin (sEng)] megnövekedett anyai szérumkoncentrációja jellemzi. Mivel az sFlt-1 megköti az angiogenezisben fontos szerepet játszó VEGF-t és PGF-t, ezért csökkenti az angiogén faktorok biológiai hatásait, és anti-angiogén állapot, szisztémás gyulladás, magasvérnyomás és proteinuria kialakulásához vezet.

1.3. sFlt-1 variánsok

Négy sFlt-1 variáns ismert, melyek az Flt-1 transzmembrán receptor alternatív splicing-al létrejött variánsai. Az Flt-1 7 Ig-szerű extracelluláris doménből és intracelluláris tirozin kináz doménből áll. Az első 3 Ig-szerű domén a ligand kötésért, míg a 4-7. Ig-szerű domén

a receptor dimerizációért felelős. Az elsőként felfedezett sFlt-1 variánst (sFlt-1-i13) az *FLT1* gén első 13 exonja kódolja, és a 13. intron poladenylációja miatt az Flt-1 mRNS korai terminációja révén jön létre. Az sFlt-1-i13-at 6 Ig-szerű domén és egy unikális, 31 aminosavból álló C-terminális alkotja. Erős VEGF és PlGF antagonistaként működik, az angiogenesis inhibitora, és védő szerepe van a fokozott VEGF jelátvitellel és vaszkuláris endothel permeabilitással szemben a lepényben. A sFlt-1-e15a variánst az *FLT1* gén 14 exonja valamint egy AluSeq retrotranszpozonban elhelyezkedő exon (15a exon) kódolja. Az sFlt-1-e15a a főemlősökre jellemző, mivel az AluSeq retrotranszpozon a főemlősök genomjában jelent meg az evolúció során. Az sFlt-1-e15a-nak egy unikális, 28 aminosavból álló C-terminálisa van, főleg az emberi méhlepényben expresszálódik, ahol az első trimesztert követően a domináns sFlt-1 variáns. Két további sFlt-1 variáns (hsFlt-1-e15b és hsFlt-1-i14) a 14. exon után képződik alternatív splicing-gal, és 13 illetve 31 aminosavból álló C-terminálisa tartalmaz. Ez a négy sFlt-1 variáns a lepényi *FLT1* transzkriptumok 95%-át adja egészséges terhességben. Trophoblast hypoxia esetén a hsFlt-1-e15a expressziója megnő, és praeclampsia esetén a hsFlt-1-e15a variáns a legnagyobb mennyiségben expresszált variáns a méhlepényben. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a hsFlt-1-e15a-nak fontos funkciói lehetnek normál terhesség alatt, de túlermelődése praeclampiát okozhat.

1.4. Praeclampsia állatmodellek

Az emberben található haemochoriális lepény és mély trophoblast invázió különleges, csak csimpánzoknál és gorilláknál figyeltek meg hasonlót. A humán placentáció anatómiai és élettani egyedülállósága miatt nem lehetséges olyan állatmodell fejlesztése, ami alkalmas lenne a praeclampsia korai fázisának modellezésére. Ezzel szemben számos állatmodell a praeclampsia terminális útvonalát modellezi magas vérnyomású egértörzseket használva, a méh elégtelen perfúzióját, oxidatív vagy nitroztatív stressz okozva, vagy pedig az NO szintáz, metabolikus funkciók, renin-angiotenzin rendszer zavarára építve. Más praeclampsia modellek anti-angiogén faktorok túlermelésével hoznak létre anyai szisztémás gyulladást. Tekintettel, hogy az egérnek is haemochoriális méhlepénye van, a trophoblast invázió sekélyessége ellenére is alkalmas a késői praeclampsia modellezésére.

A legtöbb anti-angiogén praeclampsia állatmodell a mesterségesen csonkított sFlt-1 mutánst [sFlt-1(1-3)] használta, ami egy fajban sem található meg és olyan domének hiányoznak belőle, amelyek fontosak a biológiai hatásához, ezért eltérő praeclampsia fenotípust indukálhat, mint a teljes hosszúságú sFlt-1. Azonban eddig még nem vizsgálták,

hogy vajon a méhlepényben dominánsan expresszáldó humán sFlt-1-e15a overexpressziója az sFlt-1(1-3)-hez hasonló magasvérnyomást és fehérjevizelést képes-e okozni. Az eddigi praeclampsia állatmodelleknek számos technikai hátránya is volt, ami megnehezítette a terhesség alatti és szülés utáni megfigyelést, többek között: 1) a megfelelő képalkotó metodika hiánya a terhesség korai megállapításához az állatok kis méretéből fakadóan; 2) a vizeletgyűjtés és vizelet fehérjevizsgálat nehézségei; 3) a stresszmentes vérnyomásmonitorizálás limitációi; és 4) a szülés utáni megfigyelés hiánya.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A praeclampsia korábbi állatmodelljeinél alkalmazott módszerek limitációi miatt az alábbi célkitűzéseim voltak az új állatmodell megtervezésében:

1. a praeclampsia biológiailag relevánsabb anti-angiogén modelljének fejlesztése, hogy a lepényben praeclampsziában domináns hsFlt-1-e15a *in vivo* kóros hatásait vizsgáljam;
2. a terhesség korai meghatározása magas frekvenciájú ultrahang segítségével;
3. a telemetriás vérnyomásmonitor katéter pozíciójának meghatározása magas frekvenciájú ultrahang segítségével a pontos vérnyomásmérés elősegítése érdekében;
4. az egerek stresszmentes vérnyomás monitorizálása a terhesség alatt és után;
5. a szülés utáni időszak monitorizálása érdekében túlélő császármetszés fejlesztése;
6. magas frekvenciás ultrahang vezérelte cisztocentézis kifejlesztése a terhes egerekben vizeletnyerés és pontos vizeletfehérje meghatározás érdekében;
7. a hsFlt-1-e15a szöveti expressziójának és az általa indukált klinikai tüneteknek a vizsgálata;
8. új hisztopatológiai, immunhisztokémiai, sejt- és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása a hsFlt-1-e15a hatásainak *in vitro* vizsgálatában;
9. a teljes hosszúságú hsFlt-1-e15a és a csonkított msFlt-1(1-3) biológiai hatásainak összehasonlító vizsgálatai az általuk okozott praeclampsziás tünetek tükrében;
10. a teljes hosszúságú hsFlt-1-e15a és a csonkított msFlt-1(1-3) magzatokra és méhlepényre kifejtett hatásainak vizsgálata.

Az 1-8. célkitűzést az *első tanulmányban*, a 9-10. célkitűzést pedig a *második tanulmányban* vizsgáltam.

3. MÓDSZEREK

3.1. *Első tanulmány*

3.1.1. *Etikai engedély*

A vizsgálati protokollt (A#11-03-11) a Wayne State Egyetem "Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)"-je fogadta el. A kísérleti állatok gondozása és kezelése szigorúan követte az National Institutes of Health (NIH) "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" ajánlásait. Az eutanázia az American Veterinary Medical Association "*Guidelines on Euthanasia*" és a Wayne State Egyetem IACUC ajánlásit követte.

3.1.2. *Állatgondozás*

CD-1 terhes egereket a Charles River Laboratories szállította az 5. terhességi napon (TN), amit két napos akklimatizáció követett. Az egereket külön ketrecekben tartottuk, *ad libitum* étel és folyadékfogyasztás mellett. Az állatházban állandó hőmérsékletet ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) és páratartalmat ($50\pm 5\%$) biztosítottunk, napi 12-12 órás világos és sötét ciklussal. Az állatokat naponta vizsgáltuk. A normálistól eltérő viselkedés, aktivitás, étvágytalanság, kiszáradás, fertőzés, gyulladáshoz vezető folyamat, hüvelyi vérzés, vetelés és a fájdalom esetén az egeret az állatorvos tanácsára kizártuk a tanulmányból.

3.1.3. *Terhesség korai megállapítása ultrahanggal*

A terhesség korai megállapítására az egereket a 6. TN-on ($n=12$), később pedig a 7. TN-on ($n=35$) vizsgáltuk ultrahanggal. Az altatás-indukció 4-5% isoflurane (Baxter Healthcare Corp.) és 1-2 L/min oxigén keverékének inhalációjával történt. Az anesthesiát 2% isoflurane és 1-1,5 L/min O_2 keverékével tartottuk fenn. A testhőmérsékletet $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A légzésszámot és pulzust az ultrahang vizsgálat alatt Vevo Imaging Station-nel (Visual Sonics Inc.) monitorizáltuk. Az 55 MHz-es ultrahangfejjel a terhesség jeleit - a 6. TN-on embriózsákot, a 7. TN-on fokozott endometriális reakciót és az embriót - kerestük.

3.1.4. *Telemetriás katéter implantációja*

Csak ultrahanggal igazoltan terhes egerekbe történt telemetriás katéter beültetése. A testhőmérséklet kontrollja a műtét alatt T/Pump meleg vízkeringtető takaróval történt (Gaymar Industries, Inc.). A műtégi területet Betadinnal (Purdue Pharma L.P.) mostuk le, majd a bőrmetszés előtt 2%-os lidocaint (0,5 mg/kg, Vedco Inc.) és 0,5% bupivacaint (1,5mg/kg, Hospira Inc.) adtunk a bőr alá (sc.). A nyakon 1,5 cm-es metszést ejtettünk, majd a nyálmirigyeket szétválasztottuk. A bal oldali artéria carotis 1 cm-es szakaszát a

bifurkációtól a szív irányába izoláltuk. Az artériát a bifurkáció magasságában lekötöttük, majd arteriotomián keresztül a telemetriás katétert (TA11PA-C10 vagy HD-X11, Data Sciences International) az aortaív magasságáig vezettük be. A katétert rögzítettük és a telemetria rendszert a bal lágyék subcutan régiójába preparált üregbe helyeztük. A nyálmirigyeket reponáltuk, majd zártuk a bőrt. A postoperatív fájdalmat sc. adott carprofennel (5 mg/kg/24h, Rymadil, Pfizer Inc.) és a műtéti terület lidocain and bupivacain infiltrációjával csökkentettük. A folyadékpótlás 0,5ml 0,9%-os sóoldat sc. injektálásával történt. A műtét után a vitális jeleket monitorizálva az egereket melegítő takarón tartottuk.

3.1.5. Telemetriás katéter helyzetének ultrahangos meghatározása

A 13. TN-on a katéter pozícióját 55MHz-es ultrahanggal határoztuk meg úgy, hogy a látótérbe a bal artéria carotist, a fel- és leszálló aortát, az aortaívet és a katéter végét hoztuk.

3.1.6. Telemetriás vérnyomás monitorizálás

A vérnyomás monitorizálást a 10. TN-on kezdtük, és a post-partum (PPN) 7. napig folytattuk Dataquest A.R.T. 4.31 adatgyűjtő és analízáló rendszer segítségével (Data Sciences International). A vérnyomást minden 5. percben 10 másodpercig rögzítettük, naponta 8-12 órán keresztül, mind a sötét mind pedig a világos napi ciklusban.

3.1.7. Génbevitel adenovírussal

A Vector BioLabs által CMV cytomegalovírus promoterral szerkesztett adenovírust alkalmaztunk, amivel zöld fluoreszcens fehérjét (Ad-CMV-GFP) és hsFlt-1-e15a-t (Ad-CMV-hsFlt-1-e15a) overexpresszáltunk. Az egereket négy csoportra osztottuk [hsFlt-1-e15a 1x (n=6), hsFlt-1-e15a 2x (n=5), GFP 1x (n=4), és GFP 2x (n=5)]. Minden egeret a 8. TN-on a farokvénán keresztül adenovírussal injektáltunk [1×10^9 plakk-képző egység (PKE) 100 μ l-ben], majd az egerek két alcsoportját (GFP 2x és hsFlt-1-e15a 2x) a 11. TN-on ismételtén 1×10^9 PKE adenovírussal injektáltuk.

3.1.8. Ultrahangvezérelt hólyagpunkció (cystocentesis)

Az ultrahangvezérelt hólyagpunkciót a 7., 13. és 18. TN-on és a 7. PPN-on végeztük, isoflurane anestheziában. A vizeletmintát transcután hólyagpunkcióval, a mikroinjekciós rendszer és az 55 MHz-es ultrahangfej segítségével vettük. A vizelet vér kontaminációját Urine Chemstrip 5 OB (Roche Diagnostics) vizeletcsíkkal vizsgáltuk, majd a vizeletmintákat -80°C-on tároltuk.

3.1.9. Császármetszés

A 18. TN-on végeztük a császármetszéseket. Először 1-1,5 cm-es metszést ejtettünk a has középvonalában, majd a méh egy rövid szakaszát előemeltük, amit fiziológiás sóoldattal nedvesen tartottunk. A magzatok számától függően összesen két vagy három rövid szakaszt emeltünk elő, majd antemesenterialisán a méh falán rövid (3-5mm) hosszanti hysterectomiát végeztünk, míg a méh többi szakaszát a hasüregben tartottuk a kontamináció megelőzése végett. A magzatok és méhlepények világra hozatalát követően a hysterectomiákat zártuk, és a hasüreget fiziológiás sóoldattal öblítettük. A hasfalat zártuk majd a bőrt kapszokkal egyesítettük (Braintree Scientific). A folyadékvesztéséget 0,5ml 0,9%/os sóoldat sc. injekciójával pótoltuk. A postoperatív fájdalmat carprofen sc. és a műtéti metszés közelébe adott lidocain és bupivacain sc. injekcióval csillapítottuk. A műtét utáni szakban az egerek monitorizálása megegyezett a telemetriás katéter beültetését követő időszakhoz.

3.1.10. Szöveti feldolgozás

Császármetszést követően a magzattól elválasztottuk a lepényt és a köldökzsinórt. Minden magzat és méhlepény súlyát megmértünk. A méhnyakhoz legközelebb eső lepényt 24 órára foszfát puffer sóoldattal (PBS, Gibco, Life Technologies Corp.) hígított 4%-os paraformaldehidbe helyeztük (PFA), majd 70%-os etanollal (Thermo Fisher Scientific Inc.) dehidráltuk és paraffinba ágyasztuk szövettani vizsgálat céljából. A második méhlepényt TRIzol reagensben (Life Technologies Corp.) homogenizáltuk és -80°C-on tároltuk.

Eutanizációt követően a szerveket (lép, méh, máj, vese és agy) 24 órás 4%-os PFA tárolást követően 70%-os etanollal dehidráltuk és paraffinba ágyasztuk, vagy TRIzol reagensben homogenizáltuk és -80°C-on tároltuk a génexpresszió analízisig. A méh császármetszést követő szövettani változásit vírussal nem kezelt egereken vizsgáltuk, amelyeket a 38. (n=3), 50. (n=3) vagy 77. (n=3) PPN-on eutanizáltunk.

3.1.11. Teljes RNS izolálás, cDNS készítés, kvantitatív real-time RT-PCR

A szöveteket mintavétel után azonnal TRIzol reagensben homogenizáltuk. Teljes RNS-t RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen) izoláltunk. A cDNS írása SuperScript III First-Strand Synthesis system (Invitrogen) használatával történt. A qRT-PCR-t a Biomark System-en (Fluidigm) végeztük *GFP* (Mr04097229_mr) és human *FLT1* (Hs01052961_m1) TaqMan próbákkal (Life Technologies Corp.).

3.1.12. Szövetteni vizsgálatok

Öt µm vastagságú metszeteket készítettünk paraffinba ágyazott méhlepény, vese és méh blokkokból, és szilanizált tárgylemezre helyeztük őket, majd deparaffinálás után a metszeteket etanollal rehidráltuk. Az általános morfológiai vizsgálatához a szövetek reprezentatív mintáiból készült metszeteket hematoxin-eozinnal (H&E) festettük, a bazál membrán megvastagodás és glomeruláris endotheliosis vizsgálatára a vese reprezentatív mintáiból készült metszeteket periodic acid Schiff (PAS) reagenssel festettük. A hisztológiai vizsgálatokat patológus végezte BX50F fénymikroszkópon (Olympus). Az értékelés során minimum 20 glomerulust vizsgáltunk glomeruláris endotheliosist keresve.

3.1.13. Immunhisztokémia

A méh reprezentatív metszetein CD68 és simaizom aktin (SMA) immunfestést végeztünk, amihez nyúl anti-egér SMA poliklonális antitestet (1:300; Abcam Inc.), Leica Bond Max autostainert (Leica Microsystems) és Bond Polymer Refine Detection Kit-et (Leica Microsystems), illetve nyúl anti-egér CD68 poliklonális antitestet (1:150; Abcam Inc.), Ventana autostainert (Ventana Medical Systems, Inc.) és DAB Map Detection Kit-et (Ventana Medical Systems, Inc.) használtunk.

3.1.14. Aorta gyűrű assay-k

A mellkasi aortákat eltávolítás után DMEM+GlutaMAX alacsony glükóz tartalmú tápoldatba (Life Technologies Corp.) helyeztük. A periaortális kötő- és zsírszövetet eltávolítottuk, majd 1 mm-es aorta gyűrűket készítettünk, amiket 12-lyukú lemezekon 37°C-on Opti-MEM+GlutaMAX szérumban tápoldatban (Life Technologies Corp.) inkubáltunk éjszakán át. Az aorta gyűrűket 50µL Growth Factor Reduced BD Matrigel Matrix-al bevont (BD Biosciences) 96-lyukú sejtenyésztő lemezekre helyeztük. Ezután 50µL Matrigel-lel valamint 1%-os Penicillin–Streptomycinnel (P/S), 2,5% fetális marha szérummal (FBS; Atlanta Biologicals) és 30ng/mL vaszkuláris növekedési faktorról (VEGF-A; ProSpec) kiegészített 100µL Opti-MEM közeggel (Life Technologies Corp.) kezeltük ezeket. Az aorta gyűrűket ezután 37°C-on 6 napig inkubáltuk, a tápoldatot pedig másnaponta cseréltük. Ezt követően az aorta gyűrűket PBS-sel hígított 4%-os PFA-del fixáltuk, és Olympus 1X51 inverz mikroszkóppal készítettünk képeket róluk.

3.1.15. Albumin-kreatinin immunassay-k

A vizelet albumin koncentrációt Albuwell kit-tel (Exocell Inc.), a kreatinin koncentrációt pedig Creatinine Companion assay-vel (Exocell Inc.) vizsgáltuk.

3.1.16. BeWo sejtkultúra adenovírus fertőzése

A BeWo sejteket (American Type Culture Collection) 10% FBS-sel és 1% P/S-sel (Life Technologies Corp.) kiegészített F12-es tápoldatban tenyésztettük. A sejteket vagy 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre vagy pedig 35 mm-es sejttenyésztő edényekbe helyeztük, majd Ad-CMV-GFP-vel vagy Ad-CMV-hsFlt-1-e15a-val fertőztük meg. Tizenhat óra múlva a sejtkultúrák felülúszóját eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, majd pedig Western blothoz vagy konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz használtuk őket.

3.1.17. Fehérje izoláció és Western blot

A BeWo sejtekből az összfehérjét RIPA lízis pufferrel (Sigma-Aldrich Co.) nyertük ki, ami Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail-t tartalmazott (Roche). A fehérje koncentrációt Quick Start Bradford Protein Assay-vel (Bio-Rad) határoztuk meg. Az összfehérjéből 20 μ g-ot elektroforézissel 4-12% SDS-PAGE (Life Technologies Corp.) gélen futtattunk, majd elektrotranszferrel nitrocellulóz membránra blottoltuk (Bio-Rad). A membránokat kecske poliklonális anti-humán Flt-1 poliklonális atitesttel (AF321, 1:2000, R&D Systems, Inc.) inkubáltuk 16 órán át 4°C-on, majd peroxidáz konjugált anti-kecske IgG-vel (1:5000, Vector Lab.) szobahőmérsékleten egy órán át inkubáltuk. A protein csíkokat Chemi Glow Western Blotting Detection Reagenssel (Protein Simple) hívtuk elő, majd Fujifilm LAS-4000 Image Reader-rel (GE Healthcare) szkenneltük be.

3.1.18. Konfokális mikroszkópia

Az adenovirussal fertőzött BeWo sejteket ProLong Gold reagenssel és 4',6-diamidino-2-fenilindol-lal (DAPI; Invitrogen) jelöltük, majd Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.1.19. Adat- és statisztikai elemzések

Vérnyomás: Minden egér minden TN-on mért szisztolés és diasztolés vérnyomásából artériás középnyomást (MAP) számoltunk, majd ezeket átlagoltuk. A 10. TN-on mért átlag MAP értékeket kivontuk az adott nap MAP értékéből, hogy megkapjuk a Δ MAP-t. A MAP és Δ MAP értékeket a császármetszés előtti és utáni időszakban is a „Linear Mixed Effects” (LME) modell-el illesztettük. Ezek a modellek leíró (kezelés: GFP vagy hsFlt-1-e15a vagy

dózis: 1x or 2x) és folyamatos (idő: TN vagy PPN) értékeket foglaltak magukban, és megengedték a kezelés és idő interakcióját is. Így tesztelni tudtuk, hogy a MAP vagy Δ MAP meredeksége különbözött-e a kezelések között. A postpartum időszak vizsgálatánál egyenesre fixált hatást kvadratikusra engedték. Miután az egereknek napi 12 órás cirkadián életritmusuk van, ezért a vérnyomást a sötét és világos időszakokban külön is elemeztük.

Vizelet albumin/kreatinin hányados: Az albumin/kreatinin hányados csoportok közötti összehasonlító vizsgálataihoz a Student-féle t-tesztet használtuk.

Génexpresszió: A relatív génexpressziókat a cél-gének (*FLT1*, *GFP*) és a referencia gén (*Gapdh*) átlag Ct értékeiből számoltuk, kivonva a cél-gén átlag Ct értékét a referencia gén átlag Ct értékéből azonos mintán belül. A Student-féle t-tesztet használtuk a szöveti génexpressziók összehasonlításához a csoportok között. A dózisok génexpresszióra kifejtett hatásának vizsgálatokor a gént expresszáló minták százalékos arányát számoltuk, és a statisztikai számításokhoz a Student-féle t-tesztet használtuk.

Aorta gyűrű assay: A Definiens Developer XD2-hez (Definiens) egy képértékelő programot írtunk. Az aorta gyűrű falából újonnan képződő mikroerek elkülönítéséhez a képrétegek kontraszt fokozásával végeztük az elemzést. Szegmentáció és osztályozás következett, hogy kizárjuk az aorta gyűrűt a területmérésből, és az így megmaradt összesített területet vettük mikroér kinövésnek. Az aorta gyűrűn mért adatokat minden képen átlagoltuk, majd az összes aorta gyűrű adatait tovább átlagoltuk egy állaton belül, végül pedig a Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze a csoportokat.

Magzati túlélés, magzati- és lepényi súly: A magzati túlélést minden egér esetében feljegyeztük, majd a csoportok közötti összehasonlításokat a nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel végeztük. A magzati- és lepényi súlyokat és a lepényi/magzati súly hányadosokat ANOVA teszttel és LME modellel vizsgáltuk.

3.2. Második tanulmány

3.2.1. Etikai engedély

Az egérkísérleteket az A#11-03-11 protokoll engedélyezte. A humán szövetek gyűjtését és vizsgálatait az *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development (NIH) és a Wayne State Egyetem Institutional Review Board-jai engedélyezték. Minden nő írásos beleegyező nyilatkozatot adott a klinikai adatok és szövetek gyűjtését megelőzően. A minták kódolva lettek, és az adatokat anonim tároltuk.

3.2.2. Állatgondozás

CD-1 terhes egerek (n=48) az 5. TN-on érkeztek. Az állatok tartása, megfigyelése és gondozása, valamint a kizáró tényezők megegyeztek az első tanulmányban leírtakkal.

3.2.3. Terhesség korai megállapítása magas-frekvenciás ultrahanggal

Az ultrahangvizsgálat a 7. TN-on az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történt.

3.2.4. Telemetriás vérnyomásmonitor katéter implantációja

A telemetriás katéter beültetése az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történt.

3.2.5. Telemetriás katéter pozíciójának magas frekvenciájú ultrahangos meghatározása

A katéter pozíció meghatározása az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történt.

3.2.6. Telemetriás vérnyomás monitorizálás

A vérnyomás monitorizálás az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történt.

3.2.7. Génbevitel adenovírussal

Háromféle virális vektort használtunk, amiket replikáció gátolt adenovírusból és eltérő szöveti tropizmusú "RGD fiber-mutant" adenovírusból, illetve két eltérő szövetspecifitású promoterből állítottunk össze. A teljes hosszúságú hsFlt-1-e15a-t, a csonkított msFlt-1(1-3)-t vagy a GFP-t expresszáló adenovírus és "RGD fiber-mutant" adenovírus vektorok létrehozását és titrálását a Vector BioLabs végezte el. A hsFlt-1-e15a-t overexpresszáltuk: 1) vad típusú adenovírussal és cytomegalovírus promoterral (Ad-CMV-hsFlt-1-e15a; n=6), 2) "RGD fiber-mutant" adenovírussal és cytomegalovírus promoterral (Ad-RGD-CMV-hsFlt-1-e15a; n=6), vagy 3) "RGD fiber-mutant" adenovírussal és human *CYP19A1* promoterral (Ad-RGD-CYP-hsFlt-1-e15a; n=5). A msFlt-1(1-3)-at expresszáltuk "RGD fiber-mutant" adenovírussal és cytomegalovírus promoterral [Ad-RGD-CMV-msFlt-1(1-3); n=6]. A GFP-t expresszáltuk 1) "RGD fiber-mutant" adenovírussal és cytomegalovírus promoterral (Ad-RGD-CMV-GFP; n=12), vagy 2) "RGD fiber-mutant" adenovírussal és human *CYP19A1* promoterral (Ad-RGD-CYP-GFP; n=4). Az egereket a farokvénán keresztül az adenovírus vektorral a 8. TN-on injektáltuk [$2,5 \times 10^9$ PKE 100 μ l-ben], majd pedig a 11. TN-on ismételt adenovírus injekció történt [$2,5 \times 10^9$ PKE 100 μ l-ben] vagy pedig fiziológiás sóoldatot kaptak. Az egerek egy csoportja (n=9) a 8. és 11. TN-on 100 μ l fiziológiás sóoldatot kapott azért, hogy az endogén transzmembrán Flt-1 és sFlt-1-i13 gén expresszió vizsgálatait végezhessük el.

3.2.8. Császármetszés

A császármetszések az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történtek.

3.2.9. Szöveti feldolgozás

A szövetek feldolgozása az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történt.

3.2.10. Teljes RNS izolálás, cDNS készítés, kvantitatív real-time RT-PCR

A szöveteket TRIzol-ban QIAshredder-rel homogenizáltuk és a teljes RNS-t RNeasy Mini Kit-tel izoláltuk. Humán primer trophoblast sejt kultúrából teljes RNS-t TRIzol-lal és RNeasy kit-tel izoláltunk. Ötszáz ng teljes RNS reverz transzkripciója a SuperScript III First-Strand Synthesis system-mel történt. TaqMan assay-eket használtunk a humán *FLT1* (Hs01052961_m1), mouse *Flt1* (Mm01210866_m1: exon boundary 1-2; Mm00438980_m1: exon boundary 15-16), *GFP* (Mr04097229_mr), humán *CYP19A1* (Hs00903411_m1), humán és egér kontroll gének [*RPLP0* (Hs99999902_m1); *Gapdh* (Mm99999915_g1)] expressziójának qRT-PCR-os meghatározásához Biomark System-en.

3.2.11. Szövettani vizsgálatok

Négy µm vastagságú metszeteket készítettünk paraffinba ágyazott vese blokkokból, és szilanizált tárgylemezekre helyeztük őket, majd deparaffinálás után a metszeteket etanollal rehidráltuk. Az általános morfológiai vizsgálatokhoz H&E-vel festett metszeteket használtunk. A glomeruláris kapilláris hurkok bazálmembrán megvastagodását PAS festés és Jones retikuláris bazálmembrán festés (Dako North America Inc) után értékeltük. A vese glomeruláris károsodásának vizsgálatát két független patológus végezte el, a klinikai tünetek ismerete nélkül. Minden vesében 10 glomerulust vizsgáltak a glomeruláris endotheliosis jeleit keresve. A glomeruláris károsodást az alábbiak szerint pontozták: 0 = 10 megvizsgált glomerulusban nem volt eltérés; 1+ = 10 glomerulusból 1-től 5-ig volt szegmentális vagy diffúz eltérés; 2+ = 6 vagy több glomerulus mutatott szegmentális vagy diffúz endotheliosist. A metszetek kiértékelése Olympus BX50F fénymikroszkópon történt.

3.2.12. Immunhisztokémia

A lepényi immunfestést egér anti-CD31 monoklonális antitesttel (1:50; Spring Bioscience) és Bond Polymer Refine Detection Kit-tel Leica Bond Max autostaineren végeztük el.

3.2.13. Aorta gyűrű assay-k

Az aorta gyűrű assay-k az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történtek.

3.2.14. Vizeletgyűjtés és albumin-kreatinin immunoassay-k

A vizeletgyűjtés és az albumin-kreatinin immunoassay-k az első tanulmányban leírtakkal megegyezően történtek.

3.2.15. Elsődleges emberi trophoblast sejt izolációja és tenyésztése

Méhlepényeket gyűjtöttünk terminusban szülő egészséges nőktől (n=4). A méhlepényeket darabolás és mosás után Trypsint (0,25%; Life Technologies Corp.) és DNáz I-t (60U/ml; Sigma-Aldrich Corp.) tartalmazó oldatban emésztettük 37°C-on 90 percen át. A kapott sejtszuspenziót 100µm pórusméretű nylon szűrőn át szűrtük (BD Biosciences), a vörösvértesteket NH₄Cl pufferben (Stemcell Technologies) lizáltuk, majd mosás után a sejteket 20-50%-os Percoll grádiensre helyeztük és 20 percig 1200g-n centrifugáltuk. A trophoblastot tartalmazó sejtgyűrűket leszívtuk, majd a nem trophoblast sejtek kiszűrésére negatív szelekciós módszert alkalmaztunk, amihez anti-CD14 (20µg/ml) és anti-CD9 (20µg/ml) egér monoklonális antitesteket (R&D Systems) és MACS anti-egér IgG-t (Miltenyi Biotec) használtunk. Az izolált elsődleges trophoblast sejteket kollagénnel bevont 12-lyukú sejtenyésztő lemezre tettük, és Iscove's modified Dulbecco's (Invitrogen) tápoldatban tartottuk 7 napon át, ami 10% borjúsérumot, 5% humán sérumot és 1% P/S oldatot is tartalmazott. A sejtekből minden nap teljes RNS-t izoláltunk.

3.2.16. Konfokális mikroszkópia

Öt µm vastagságú metszeteket készítettünk fagyasztott méhlepény blokkokból és szilanizált lemezre helyeztük őket. A metszeteket -20°C-os acetonnal fixáltuk 10 percig, majd háromszor jéghideg PBS-sel öblítettük le. ProLong Gold reagenssel és DAPI-val történt jelölés után Leica TCS SP5 konfokális mikroszkópot használtunk az értékelésekhez. Fixációt követően az aorta gyűrűket is ProLong Gold reagenssel és DAPI-val jelöltük, és a Leica TCS SP5 konfokális mikroszkóppal értékeltük.

3.2.17. Adat- és statisztikai elemzések

Génexpresszió: A relatív génexpressziókat a cél-gének (humán *FLT1*, egér *Flt1* vagy *GFP*) és a referencia gén (*Gapdh*) átlag Ct értékeiből számoltuk, kivonva a cél-gén átlag Ct értékét a referencia gén átlag Ct értékéből azonos mintán belül. A génexpressziós értékeket az array-k között kalibrációs minták segítségével adjusztáltuk. A Student-féle t-tesztet használtuk a szöveti génexpressziók összehasonlításához a különböző csoportok között. Az egér transzmembrán Flt-1 mRNS expressziót az Mm00438980_m1 TaqMan assay által

generált adatokból számoltuk, ami csak a teljes hosszúságú Flt-1 mRNS-t detektálta. Az msFlt-1-i13 mRNS expressziós adatait úgy kaptuk, hogy az Mm01210866_m1 TaqMan assay adataiból, ami a teljes hosszúságú és az alternatív splicingos Flt-1 mRNS-t is érzékelt, kivontuk a teljes hosszúságú Flt-1 mRNS adatait. A lineáris modelt használtuk transzgennek és vektornak az endogén msFlt-1-i13 expresszióra kifejtett hatásának vizsgálatakor.

Vérnyomás: Minden időpontra artériás középnyomást (MAP) számoltunk, majd ezeket átlagoltuk. A 11. TN-on mért átlag MAP értékeket kivontuk az adott nap MAP értékéből, hogy megkapjuk a Δ MAP-t. A MAP és Δ MAP értékeket a császármetszés előtti és utáni időszakban külön LME modell-el illesztettük. A modellekben a fixált jellemzők a kezelés, a terhességi napok polynomiális jellemzője és ezek interakciója volt. A random komponens a vérnyomás változása és a terhességi napok kvadratikus jellemzője voltak. Valószínűségi teszttel vizsgáltuk a csoportok közötti vérnyomásváltozás profilok különbözőségét. Az adott napokon a csoportok közötti vérnyomáskülönbségeket t-teszttel vizsgáltuk.

Glomeruláris változás, vizelet albumin/kreatinin hányados: A glomeruláris károsodás értékeket logisztikus regressziós modellel értékeltük. Az albumin/kreatinin hányados csoportok közötti összehasonlító vizsgálataihoz a Student-féle t-tesztet használtuk.

Aorta gyűrű assay: A Definiens Developer XD2-hez (Definiens) egy 3D képértékelő programot írtunk. Az aorta gyűrű falából újonnan képződő mikroerek elkülönítéséhez a képrétegek kontraszt fokozásával végeztük az elemzést. Szegmentáció és osztályozás következett a DAPI csatornán, hogy kizárjuk az aorta gyűrűt a területmérésből, és az így megmaradt összesített területet vettük mikroér kinövésnek. Az aorta gyűrűn mért adatokat minden képen átlagoltuk, majd az összes aorta gyűrű adatait tovább átlagoltuk egy állaton belül, végül pedig a Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze a csoportokat.

Magzati túlélés, magzati- és lepényi súly: Az összes magzat, az élő magzatok, a magzati túlélés, az anya súlyok, a magzati- és lepényi súlyok, valamint a lepényi/magzati súly hányadosok csoportok közötti különbségét t-teszttel hasonlítottuk össze.

Microarray és qRT-PCR: A microarray génexpressziós profilokat a SymAtlas/BioGPS adatbázisból töltöttük le, és a 40 felnőtt és magzati szövet génexpressziós adatait az R programmal rajzoltuk meg. Az elsődleges humán trophoblast sejtek *CYP19A1* expressziós adatait a referencia génhez (*RPLP0*) normalizáltuk a $\Delta C_{t(gene)} = C_{t(RPLP0)} - C_{t(gene)}$ képlet szerint, és a trophoblast differenciáció során az idő függvényében mutattuk be.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Első tanulmány

4.1.1. A terhesség meghatározása magas frekvenciás ultrahanggal

A 6. TN-on csak 1.9-2.7mm-es gesztációs zsák volt látható. Mivel a 7. TN-on már endometriális reakció és az embrió is látható volt, ezért ezt választottuk a továbbiakban a terhesség meghatározásához. A nem terhes egerekben ezen ultrahang jelek közül egyik sem volt látható. A 35 vizsgált egerből 32-nél diagnosztizáltunk terhességet a 7. TN-on. A három nem terhesnek diagnosztizált egerből csak egy bizonyult a későbbiekben terhesnek.

4.1.2. Telemetriás eszközök beültetése és vizsgálata

A telemetriás katétert a terhesség ultrahangos megállapítása után ültettük be. A műtéti idő 20-35 perc között változott. A TA11PA-C10 eszköz beültetése rövidebb időt igényelt, mint a HD-X11-é. A 13. TN-on az ultrahang megerősítette, hogy az összes katéter az aortaívben helyezkedett el. A telemetriás rendszer beültetése 79%-ban (30/38) komplikációmentes volt: 86%-ban (18/21) a TA11PA-C10 eszköz és 71%-ban (12/17) a HD-X11 beültetésénél.

4.1.3. Túlélő császármetszés

Új túlélő császármetszést fejlesztettünk ki, amely során az egér méhének csak egy rövid szegmentjét emeltük elő egy időben. Összeségében kettő vagy három rövid hysterectomiát végeztünk mindkét oldalon az összes magzat és méhlepény világrahozatalához. A minimál invazív aszeptikus műtéti technika, a megfelelő fájdalomcsillapítás és folyadékpótlás 100%-os (30/30) nyolcnapos túlélést tett lehetővé. A 8. PPN-o a H&E festést és SMA-immunfestést követő hisztopatológiai vizsgálatok granulációs szövetet mutattak ki a méhfalban. A 77. PPN-ra az összes vizsgált esetben az endometrium és a belső myometrium réteg teljes, a külső myometrium réteg részleges gyógygyógyulást mutatott a hysterectomia területén. A submucosában fonál-granuloma volt megfigyelhető.

4.1.4. Humán lepényi sFlt-1-e15a és GFP overexpressziója adenovirussal

A humán sFlt-1-e15a és GFP mRNS expresszió a hat anyai szövet között a májban volt a legmagasabb. A méhlepény hsFlt-1-e15a és GFP expressziója közvetlenül nem volt összehasonlítható az anyai szövetek expressziójával a mintavétel eltérő időpontja miatt. A GFP expresszióra a vírus dózisének (1×10^9 PKE vs. 2×10^9 PKE) nem volt hatása, mivel nem láttunk különbséget a GFP-t expresszáló szövetek arányában a két kontrollcsoportban.

Másfelől a vírus dózisének hatása volt a hsFlt-1-e15a expresszióra, ami az anyai szövetekben alacsonyabb volt, mint a GFP expresszió. Az egér szövetekben az átlagos hsFlt-1-e15a expresszió 46,7%-os volt a hsFlt-1-e15a 1x csoportban (1×10^9 PKE), és 72,2%-os a hsFlt-1-e15a 2x (2×10^9 PKE) csoportban ($p=9,7 \times 10^{-3}$). A vesében a hsFlt-1-e15a expresszió 6,3-szeresen volt magasabb a hsFlt-1-e15a 2x csoportban, mint a hsFlt-1-e15a 1x csoportban ($p=5,3 \times 10^{-2}$). A hsFlt-1-e15a 1x csoportban a hsFlt-1-e15a-t expresszáló méhlepény, agy és méh szövetek aránya alacsony volt.

BeWo sejteket fertőztünk meg Ad-CMV-GFP-vel és Ad-CMV-hsFlt-1-e15a-val, hogy *in vitro* erősítsük meg a lepényi trophoblast sejtekben a hsFlt-1-e15a és GFP fehérjék expresszióját. Western blot kimutatta, hogy a nem fertőzött BeWo sejtekben a 185kDa-os Flt-1 transzmembrán receptor valamint a 145kDa-os és 110kDa-os sFlt-1 variánsok expresszálódtak. Az Ad-CMV-GFP fertőzött BeWo sejtek hasonlóan expresszálták ezeket a fehérjéket. Az Ad-CMV-hsFlt-1-e15a-val fertőzött BeWo sejtek a 145kDa-os és a 110kDa-os sFlt-1 variánsokat overexpresszálták. Az Ad-CMV-GFP-vel fertőzött BeWo sejtek citoplazmájában konfokális mikroszkóppal a GFP-t ki lehetett mutatni, ami a trophoblast sejtek virális transzfekciójának hatékonyságát erősítette meg.

4.1.5. Vérnyomás monitorizálás telemetriás rendszerrel

Kontroll egerekben a terhesség során nem volt szignifikáns vérnyomásemelkedés (Δ MAP slope=0,513Hgmm/nap; $p=0,187$). HsFlt-1-e15a kezelt egerekben kontrollokhöz képest vérnyomásemelkedést észleltünk a terhességi idő előrehaladtával (Δ MAP meredekség=2,05 Hgmm/nap; $p=8,09 \times 10^{-8}$). A hsFlt-1-e15a-val kezelt csoportban a Δ MAP meredekség magasabb volt a kontroll csoporthoz képest (1,53Hgmm/nap; $p=0,0043$), mintegy a késői praeclampsziát utánozva. Szüléskor a Δ MAP 13,2Hgmm-rel volt magasabb a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben, mint kontroll egerekben ($p=0,00107$). A császármetszést követően a kontroll és a hsFlt-1-e15a kezelt egerekben a Δ MAP hasonló kvadratikus mintázatot mutatott, ami közös vérnyomáscsökkenés mintázatot feltételez. Azonban a császármetszést követően a Δ MAP a kontroll egerekben az alapérték alá csökkent, míg a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben ez az alapérték fölött maradt. A 7. PPN-on a kontroll egerekben a Δ MAP 1,96Hgmm-rel volt az alapérték alatt ($p=0,560$), míg a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben ez 6,88Hgmm-rel volt az alapérték felett ($p=0,0346$). A terhesség során és a császármetszést követően a vírus dózisnak (1×10^9 vs. 2×10^9 PKE) egyik csoportban sem volt hatása a vérnyomás változására.

A császármetszés előtt a napi cirkadián ritmus során a Δ MAP 2,67Hgmm-rel volt magasabb az éjszakai ciklusban, mint nappal ($p=2,5 \times 10^{-3}$). A császármetszés után a Δ MAP 4,37Hgmm-rel volt magasabb az éjszakai ciklusban, mint nappal ($p=2,7 \times 10^{-6}$).

A Δ MAP értékek mellett a MAP értékekkel is elvégeztük az előbbi elemzéseket. Kontroll egerekben a császármetszés előtt nem volt változás a vérnyomásban a (MAP meredekség=0,426Hgmm/nap; $p=0,174$). A hsFlt-1-e15a kezelt egerekben a terhesség során a vérnyomás emelkedett (MAP meredekség=2,02Hgmm/nap; $p=1,13 \times 10^{-10}$). A MAP meredekség a hsFlt-1-e15a kezelt egerekben magasabb volt, mint kontroll egerekben (1,59 Hgmm/nap; $p=2,6 \times 10^{-4}$). Hasonlóan az előzőkhöz, a terhesség során és azt követően is a vírus dózisa (1x10⁹ vs. 2x10⁹ PKE) nem volt hatása a vérnyomásra.

4.1.6. Endothel- és vesefunkciók értékelése

Az aorta gyűrűk mikroér kinövése a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben 46%-kal volt kisebb kontrollokhoz képest ($p=0,012$).

A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerek veséjében fokális glomeruláris károsodás volt látható, mint például duzzadt kapilláris endothel sejtek és a glomeruláris kapillárisok elzáródása. Szignifikáns eltérés a kontroll egerek veséjében nem volt látható.

Kontroll egerek vizeletében az albumin/kreatinin hányados nem változott, ezzel szemben a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerek vizeletében az albumin/kreatinin hányados a 18. TN-ra emelkedett és postpartum csökkent. A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerek vizeletében a vizelet albumin/kreatinin hányados a 18. TN-on ötször magasabb volt (109,3±51,7µg/mg), mint kontroll egerek vizeletében (19,3±5,6µg/mg; $p=4,4 \times 10^{-2}$). A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerek vizeletében az albumin/kreatinin hányados a 8. PPN-on marginálisan magasabb volt (36,6±9,0µg/mg), mint kontroll egerek vizeletében (18,0±4,9µg/mg; $p=0,06$).

4.1.7. Magzati túlélés, lepényi- és magzati súlyok értékelése

A magzati túlélést nem befolyásolta a hsFlt-1-e15a kezelés, mivel nem volt eltérés ($p=0,38$) a csoportok között (GFP 1x: 100%; hsFlt-1-e15a 1x: 100%; GFP 2x: 96,43%; hsFlt-1-e15a 2x: 100%). A hsFlt-1-e15a kezelés nem volt hatással a magzatok és a méhlepények súlyára, és nem befolyásolta a méhlepény/magzati súly hányadost sem.

4.1.8. A korai praeclampsia tüneteit mutató egér vizsgálata

Egy egér a hsFlt-1-e15a 2x csoportban eltérő biológiai reakciót mutatott annak ellenére, hogy a kezelés ugyanaz volt, mint a többi egernél a csoporton belül. Ennél az "EM35"-ös

egérnél jelentősen magasabb és korábban jelentkező (15. TN) vérnyomás eltérést figyeltünk meg, mint a többi hsFlt-1-e15a-val kezelt egérnél. Átmeneti vérnyomás normalizálódást követően ismételt kiugrást észleltünk a vérnyomásban az 1. PPN-on. Az “EM35”-ös egérnél a vizelet albumin/kreatinin hányados a 18. TN-on magasabb volt, mint más hsFlt-1-e15a-val kezelt egérnél. Az “EM35”-ös egérnél a hsFlt-1-e15a expresszió a májban alacsonyabb volt, mint más hsFlt-1-e15a-val kezelt egérnél. Az “EM35”-ös egérnél a szövettani vizsgálat multiplex cisztikus biliáris hiperpláziát, trombózist és infarktust mutatott ki a máj parenchymában. Az “EM35”-ös egérnél az aorta gyűrű mikroér kinövés a legalacsonyabb volt a többi hsFlt-1-e15a-val kezelt egérhez képest. Az “EM35”-ös egérnél az átlagos magzati súly ($0,749 \pm 0,029$ g) és lepényi súly ($0,080 \pm 0,006$ g) alulmaradt a többi hsFlt-1-e15a-val kezelt egérhez képest (magzati súly: $1,06 \pm 0,023$ g, $p=2,017 \times 10^{-15}$, lepényi súly: $0,111 \pm 0,004$ g, $p=2,05 \times 10^{-6}$). A hisztopatológiai vizsgálat számos trombust igazolt a decíduális erekben az “EM35”-ös egérnél.

4.2. Második tanulmány

4.2.1. Transzgén hordozó rendszerek fejlesztése

Különböző vírus vektorokat fejlesztettünk ki, hogy a teljes hosszúságú hsFlt-1-e15a és a csonkított msFlt-1(1-3) transzgénnek hatását összehasonlítsuk. A replikáció gátolt adenovírustól eltérő szöveti tropizmussal bíró “RGD fiber-mutant” adenovírust használtuk, hogy a változó szöveti expresszióknak a hsFlt-1-e15a biológiai jellemzőire gyakorolt hatását vizsgáljuk. Miután az 501bp placenta-specifikus humán *CYP19A1* promoter képes placenta specifikus génextpressziót irányítani, ezért az 501bp *CYP19A1* promotert használtuk a CMV promoter mellett az adenovírus vektorokban.

4.2.2. MsFlt-1 egyedi génextpressziója a méhlepényben

A kezelés nélküli egerekben hat szövetet megvizsgálva az endogén transzmembrán mFlt-1 mRNA expresszió a méhlepényben volt a legmagasabb; továbbá a msFlt-1 mRNA kizárólagosan a méhlepényben expresszáldott. Az msFlt-1(1-3) kezelt egerekben a msFlt-1 mRNA főleg a májban expresszáldott. Az msFlt-1(1-3) kezelt egerekben a lepényi msFlt-1-i13 mRNA expresszió nem növekedett azokkal az egerekkel szemben, akik fiziológiás sóoldatot kaptak. Ez azt sugalta, hogy az endogén lepényi msFlt-1-i13 mRNA expresszió magasabb, mint a transzgén által expresszált msFlt-1(1-3) mRNA.

4.2.3. Különféle vírus transzgének expressziós mintázata

A promoter és vírus szerkezetétől függően változott a hsFlt-1-e15a és a GFP mRNS expresszió. Az "RGD fiber-mutant" adenovírus az adenovírushoz képest fokozta a hsFlt-1-e15a mRNS expresszióját a vesében és a májban, míg a CYP promoter a májban csökkentette a hsFlt-1-e15a mRNS expressziót a CMV promoterral szemben. A CYP promoter csökkentette a GFP mRNS expressziót a májban (49,8-szor, $p=0,005$), a vesében (9,3-szor, $p=0,02$) és a lépben (13,5-ször, $p=0,01$), így a legmagasabb GFP mRNS expresszió a méhlepényben volt. Az "RGD fiber-mutant" adenovírus használatkor a GFP expresszió főleg a méhlepény labirintus zónájára korlátozódott, függetlenül attól, hogy milyen promotert használtunk. Az endogén msFlt-1-i13 expresszióra egyik adenovírus vektornak és promoterne sem volt hatása.

4.2.4. A vérnyomás telemetriás monitorizálása

A császármetszés előtt a msFlt-1(1-3)-mal kezelt egerek és GFP-vel kezelt egerek között vérnyomás különbséget láttunk ($p=3,7 \times 10^{-5}$). A Δ MAP a 15. TN-on a msFlt-1(1-3)-mal kezelt egerekben 11,1 Hgmm-rel volt magasabb ($p=0,0008$) mint a kontroll egerekben, és ez a különbség a 18. TN-ra nőtt (Δ MAP: 12,8Hgmm, $p=0,005$). Egy msFlt-1(1-3)-mal kezelt egernél nagyon magas Δ MAP-t mértünk és 175/135Hgmm-es vérnyomást a 18. TN-on. Ennél az egernél a 7. PPN-ig folyamatosan emelkedő vérnyomásértéket mértünk 182/146-os csúcserővel, ami praeclampsia után kialakuló krónikus hypertóniát utánozott.

A császármetszés előtt a hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben (az összes alcsoportot összevonva) a vérnyomás emelkedett a GFP kontrollokhoz képest ($p=4,3 \times 10^{-4}$). A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben a Δ MAP a 15. TN-on 8,4Hgmm-rel ($p=0,0005$), a 18. TN-on pedig 7,8Hgmm-rel volt magasabb ($p=0,009$) kontrollokhoz képest. A három alcsoportot tekintve a Δ MAP a 15. TN-on az Ad-CMV-hsFlt-1-e15a-val és az Ad-RGD-CMV-hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben volt a legmagasabb a kontrollokhoz képest (Ad-CMV-hsFlt-1-e15a: 11,3Hgmm, $p=0,0007$; Ad-RGD-CMV-hsFlt-1-e15a: 8,3Hgmm, $p=0,009$), és hasonló volt a megfigyelés a 18. TN-on is (Ad-CMV-hsFlt-1-e15a: 7,4Hgmm, $p=0,09$; Ad-RGD-CMV-hsFlt-1-e15a: 9,3Hgmm, $p=0,04$). A kontrollokhoz képest a vérnyomás 5Hgmm-rel (15. TN) és 6,6Hgmm-rel (18. TN) volt magasabb az Ad-RGD-CYP-hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben, a különbségek mégsem voltak szignifikánsak (0,14 és 0,16).

4.2.5. *sFlt-1* kezelt egerek vesefunkció és morfológiai eltérései

A GFP kezelt egerek veséjében vékony falú, szélesen nyitott kapilláris hurkok voltak láthatók, mesangiális megvastagodás és hypercellularitás nélkül. Ezt a szövettani eredményt Jones bazálmembrán festéssel is megerősítettük. A hsFlt-1-e15a-val vagy msFlt-1(1-3)-mal kezelt egerekben duzzadt kapilláris endotélsejteket, a glomeruláris kapillárisok elzáródását és fokális mesangiális megvastagodást találtunk. Elszórtan scleroticus glomerulusok voltak láthatóak. A kapillárisok megvastagodását és a mesangiális réteg fokális kiszélesedését PAS és Jones bazálmembrán festéssel erősítettük meg.

Az msFlt-1(1-3)-mal kezelt csoportban a folyamatos vérnyomás emelkedést mutató egernél dramatikus szövettani eltérést találtunk a vesében, az összes vizsgált glomerulus nagyfokú károsodásával. Ezek megnagyobbodottak voltak és a mesangiális réteg jelentősfokú kiszélesedést és megvastagodást mutatott, illetve a glomeruláris kapilláris erek okkluziója és megvastagodása volt látható. A Jones festés a glomeruláris kapillárisok bazálmembránjának kifejezett megvastagodását és megkettőződését mutatta.

A glomeruláris károsodást jelző pontértékek az összes sFlt-1 kezelt csoportban magasabbak volt, mint kontrolloknál. A msFlt-1(1-3)-mal kezelt egerekben a glomeruláris károsodás odds ratio-ja (OR) 2,4 volt ($p=0,01$), míg hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben az OR 3,1 volt ($p=2,8 \times 10^{-5}$). A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerek között az Ad-CMV-hsFlt-1-e15a csoportban volt a legmagasabb a glomeruláris károsodást jelző OR (3,9, $p=4,8 \times 10^{-5}$).

A hsFlt-1-e15a-val kezelt egerekben a vizelet albumin/kreatinin hányados magasabb volt, mint kontrollokban (18. TN: 1,9-szer, $p=0,04$; 8. PPN: 1,7-szer, $p=0,03$). A msFlt-1(1-3)-mal kezelt egerekben kifejezetten magas volt az albumin/kreatinin hányados postpartum (17-szer, $p=4 \times 10^{-5}$). Az msFlt-1(1-3)-mal kezelt, folyamatos vérnyomás emelkedést mutató egernél extrém magas albumin/kreatinin hányadost találtunk (18. TN: 3070 μ g/mg és 8. PPN: 15401 μ g/mg). Az alcsoportok analízise azt mutatta, hogy Ad-CMV-hsFlt-1-e15a kezelés az albumin/kreatinin hányadost a 8. PPN-on emelte (3-szor, $p=0,003$); Ad-RGD-CMV-hsFlt-1-e15a kezelés az albumin/kreatinin hányadost a 18. TN-on emelte (2,4-szer, $p=0,04$); míg az Ad-RGD-CYP-hsFlt-1-e15a kezelés az albumin/kreatinin hányadost a 18. TN-on emelte szignifikancia határára (2,4-szer, $p=0,056$) és szignifikánsan növelte a 8. PPN-on (1,8-szer, $p=0,04$). Összegezve, az mFlt-1(1-3) kezelésnek a vesefunkcióra erősebb hatása volt, mint a hsFlt-1-e15a kezelésnek, és a hsFlt-1-e15a "RGD fiber-mutant" adnovírus használatakor a proteinuria korábban jelentkezett, mint adenovírus esetében.

4.2.6. A *hsFlt-1-e15a* és *msFlt-1* okozta aorta endothel diszfunkció

Az aorta gyűrű mikroér kinövés a *hsFlt-1-e15a* kezeléskor 77%-kal volt kisebb a kontrollhoz képest ($p=0,007$), míg *msFlt-1(1-3)* kezelés esetén a mikroér kinövés 66%-kal csökkent kontrollokhoz képest ($p=0,02$). Az *msFlt-1(1-3)*-mal kezelt, folyamatos vérnyomás emelkedést mutató egérnél a mikroér kinövés csak 53%-os volt a többi *msFlt-1(1-3)* kezelt egérhez képest, ami jelentős endothel diszfunkciót jelez.

4.2.7. Humán *sFlt-1-e15a* növelte, *msFlt-1(1-3)* nem befolyásolta az egér alom nagyságát

A *hsFlt-1-e15a* vagy *msFlt-1(1-3)* kezelés nem volt hatással a magzati túlélésre, a magzati súlyra, a lepényi súlyra és a lepényi/magzati súly hányadosára. Az alom nagysága a kontroll csoportban és a *msFlt-1(1-3)*-mal kezelt egerekben is összhangban volt a tenyésztő cég által közölt átlagos alom nagysággal ($n=11,5$). A magzatok száma ($13,8\pm 0,4$, $p=0,046$) és az élő magzatok száma ($13,6\pm 0,45$, $p=0,05$) magasabb volt a *hsFlt-1-e15a*-val kezelt egerekben, mint kontrollokban. A *hsFlt-1-e15a*-val kezelt egereknél az élő magzatok össz születési súlya ($14,2\pm 0,56$ g, $p=0,04$) és az anyaállatok szülés előtti összsúlya ($56,3\pm 1,1$ g, $p=0,04$) magasabb volt, mint a kontrollokban. Ezen mutatókban az *msFlt-1(1-3)* kezelt egerek nem mutattak különbséget. Az Ad-RGD-CYP-*hsFlt-1-e15a* kezelt csoportban az élő magzatok összsúlya magasabb volt, mint kontrollokban ($15\pm 0,48$ g, $p=0,043$). Az Ad-RGD-CYP-*hsFlt-1-e15a* kezelt csoportban a magzatok száma ($14,3\pm 0,42$, $p=0,047$) és az élő magzatok száma ($14,1\pm 0,46$, $p=0,039$) magasabb volt, mint kontrolloknál.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A legfőbb eredmények és fejlesztések a két tanulmányunkban a következők voltak:

1. Biológiaiailag releváns anti-angiogén praeclampsia egér modellt sikerült kifejleszteni;
2. Magas frekvenciájú ultrahanggal 97%-ban jeleztük a terhességet a 7. terhességi napon;
3. Magas frekvenciájú ultrahang minden telemetria katéter helyzetét meg tudta határozni;
4. A telemetria stresszmentes vérnyomásmérést tett lehetővé a terhesség alatt és post partum;
5. Az újonnan kidolgozott császármetszés túlélési mutatója 100%-os volt;
6. Ultrahangvezérelt cystocentézist fejlesztettünk ki a vizelet fehérjevizsgálata érdekében;
7. Az adenovírusal bejutatott hsFlt-1-e15a transzgen főleg a májban expresszáldott;
8. A hsFlt-1-e15a kezelés vérnyomás emelkedést okozott a 18. terhességi napon;
9. A hsFlt-1-e15a kezelés albuminuriát okozott a 18. terhességi napon;
10. A hsFlt-1-e15a kezelés veseglomerulus elváltozásokat okozott;
11. A hsFlt-1-e15a kezelt egerekben az aorta gyűrű mikroér kinövés gátlódott;
12. A hsFlt-1-e15a nem volt hatással a méhlepények és a magzatok súlyára;
13. Egy hsFlt-1-e15a kezelt egérben a korai praeclampsia súlyos tüneteit észleltük, melyhez intrauterin növekedési retardáció és többszervi elégtelenség társult;
14. A teljes hosszúságú humán sFlt-1-e15a és a csonkított egér sFlt-1(1-3) *in vivo* biológiai hatásai közvetlenül összehasonlíthatóvá váltak kísérleteinkben;
15. A teljes hosszúságú egér transzmembrán mFlt-1 főleg a méhlepényben, míg a szolubilis egér sFlt-1-i13 csak a méhlepényben expresszáldott;
16. A „fiber-mutant” adenovírus és placenta-specifikus promoter használata esetén mind a hsFlt-1-e15a, mind a kontroll transzgen expressziója növekedett a méhlepényben;
17. A hsFlt-1-e15a és az msFlt-1(1-3) is vérnyomásemelkedést, glomeruláris károsodást, fehérjevizelést és endothel diszfunkciót, azaz a praeclampsia tüneteit okozta az egerekben;
18. Egy msFlt-1(1-3) kezelt egérben folyamatos magasvérnyomást, súlyos albuminuriát és glomeruláris károsodást észleltünk, ami fokozott érzékenységet sejtet az sFlt-1 iránt;
19. A hsFlt-1-e15a növelte az egéralom méretét, míg az msFlt-1(1-3)-nek nem volt ilyen hatása, ami kiemeli a teljes hosszúságú sFlt-1 fontos hatását a terhesség korai szakaszában;
20. A megfigyeléseink rámutatnak a teljes hosszúságú és csonkított sFlt-1 variánsok biológiai hatásainak különbségére, valamint a teljes hosszúságú sFlt-1 különböző hatásaira a terhesség előrehaladtával. Eredményeinknek fontos hatása lehet a praeclampsia klinikai kezelésében is a későbbiekben.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. *Disszertációhoz kapcsolódó közlemények*

1. **Szalai G**, Romero R, Chaiworapongsa T, Xu Y, Wang B, Ahn H, Xu Z, Chiang PJ, Sundell B, Wang R, Jiang Y, Plazyo O, Olive M, Tarca AL, Dong Z, Qureshi F, Papp Z, Hassan SS, Hernandez-Andrade E, Than NG. Full-length human placental sFlt-1-e15a isoform induces distinct maternal phenotypes of preeclampsia in mice. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0119547. **IF: 3,234**
2. **Szalai G**, Xu Y, Romero R, Chaiworapongsa T, Xu Z, Chiang PJ, Ahn H, Sundell B, Plazyo O, Jiang Y, Olive M, Wang B, Jacques SM, Qureshi F, Tarca AL, Erez O, Dong Z, Papp Z, Hassan SS, Hernandez-Andrade E, Than NG. In vivo experiments reveal the good, the bad and the ugly faces of sFlt-1 in pregnancy. *PLoS One*, 2014, 9(11):e110867. **IF: 3,234, Hivatkozások: 5**

6.2. *Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények*

1. Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G, Leavitt R, Chung TH, El-Azzamy H, LaJeunesse C, Wang B, Balogh A, **Szalai G**, Land S, Dong Z, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Krispin M, Kim CJ, Tarca AL, Papp Z, Bohn H. Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta*, 2014, 35, 855-865. **IF: 2,710, Hivatkozások: 6**
2. Krishnamurthy U, **Szalai G**, Neelavalli J, Shen Y, Chaiworapongsa T, Hernandez-Andrade E, Than NG, Xu Z, Yeo L, Haacke M, Romero R. Quantitative T2 changes and susceptibility-weighted magnetic resonance imaging in murine pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2014, 78, 33-40. **IF: 1,696, Hivatkozások: 2**
3. Hernandez-Andrade E, Ahn H, **Szalai G**, Korzeniewski SJ, Wang B, King M, Chaiworapongsa T, Than NG, Romero R. Evaluation of utero-placental and fetal hemodynamic parameters throughout gestation in pregnant mice using high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 2014, 40, 351-60. **IF: 2,214, Hivatkozások: 2**

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni *Papp Zoltán Professzor Úrnak*, hogy támogatta kutatásaimat a Semmelweis Egyetem Doktori Programjában és a kollaborációs kutatásokat az NIH Perinatológiai Kutató Központjában. Nagyon hálás vagyok felbecsülhetetlen tanácsaiért és kritikus visszajelzéseimért kutatómunkám és téziseim megírása során.

Hálával tartozom *Roberto Romero Professzor Úrnak* mindennemű támogatásáért és az egyedülálló lehetőségért, amit az NIH-ban biztosított. Ez a kivételes alkalom lehetővé tette kutatói képességeim és tudásom továbbfejlesztését, és támogatta törekvéseimet új *in vitro* és *in vivo* metodikák valamint az új praeclampsia állatmodell kifejlesztésben.

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Than Nándor Gábornak* szakmai támogatását, tanácsait, bátorítását, és témavezetését a kollaborációs kutatások során. Köszönöm az oktatást és a konzultációkat minden kérdésben, ami felmerült a kísérletek tervezésétől a cikkek és a disszertáció megírásáig. Ez nagy hatással volt tudományos fejlődésemetre.

Köszönöm *Vereczkei András Professzor Úr* és *Szántó Zalán Adjunktus Úr* támogatását, ami lehetővé tette szakmai és tudományos fejlődésemet a sebészet, szülészet, valamint a képpalkotó- és molekuláris biológiai technikák határterületein.

Köszönöm *Sonia S. Hassan, Tinnakorn Chaiworapongsa* és *Offer Erez* professzoroknak a klinikai kollaborációt; *Yi Xu, Zhong Dong* és *Ted Price* doktoroknak a támogatást az *in vitro* munkák során; *Edgar Hernandez-Andrade, Hyunyoung Ahn, Bing Wang* és *Mary King* doktoroknak az ultrahangos és sebészeti kollaborációt; *Adi L. Tarca, Zhonghui Xu* és *Gaurav Bhatti* doktoroknak a statisztikai analíziseket; *Faisal Qureshi* és *Suzanne M. Jacques* doktoroknak a szövettani vizsgálatokat; *Rona Wang, Birgitta Sundell, Olesya Plazyo, Yang Jiang, Mary Olive, Lorrie McLuckie, Hong Meng, Stella Dewar, Jianhua Du, Po Jen Chiang* asszisztenseknek a segítséget az *in vitro* és *in vivo* munkákban; *Dr. Lisa J. Brossia-Root, Laura Lee McIntyre* és *Angela Stoyanovitch* egekkel kapcsolatos technikai segítségét, a *Data Science International Inc.* és a *Visual Sonics Inc.* munkatársainak a képzést a mikrosebészeti műtétekben és a magas frekvenciájú ultrahang használatában; *Valerie Richardsonnak* és *Pat Schoffnak* a képi munkákat; *Russ Pricenak* a technikai segítséget; *Sara Tiptonnak* és *Maureen McGertynek* a cikkek nyelvi lektorálását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek és fiaimnak megértő türelmükért és tudományos törekvéseim támogatásáért. Tiszta szívvel köszönöm szüleimnek és testvéremnek a szerető gondoskodást, ami elkísért a tanulmányaim során is.