

Molekuláris változások a szignáltranszdukciós útvonalakban praeeclampsziában és HELLP szindrómában

Doktori értekezés

Dr. Csörgőné Szabó Szilvia

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Baghy Kornélia, PhD, tudományos munkatárs
Dr. Marton Tamás, PhD, consultant perinatal pathologist

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rozgonyi Ferenc, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Sándor, PhD, egyetemi docens
Dr. Kiss András, PhD, egyetemi docens

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	6
1.1. A praeclampsia és HELLP szindróma	6
<i>1.1.1. A praeclampsia diagnosztikus kritériumai</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2. A HELLP (Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets) szindróma diagnosztikus kritériumai</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3. A praeclampsia és HELLP szindróma klinikuma</i>	<i>7</i>
1.2. A méhlepény kóroki szerepe a praeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában	9
<i>1.2.1. A méhlepény fejlődési zavara koraterhességben</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2. Endoplazmatikus retikulum stressz és ischaemiás stressz szerepe a korai praeclampsia kialakulásában</i>	<i>10</i>
<i>1.2.4. A placentáris génexpresszió megváltozása praeclampsziában és HELLP szindrómában</i>	<i>11</i>
<i>1.2.6. A VEGF egyes génpolimorfizmusainak feltételezett szerepe praeclampsziában</i>	<i>14</i>
<i>1.2.7. A syncytiotrophoblast lehetséges kóroki szerepe a megváltozott placentáris jelátviteli útvonalakban praeclampsziában és HELLP szindrómában</i>	<i>15</i>
2. CÉLKITŰZÉSEK	18
3. MÓDSZEREK	19
3.1. A syndecan-1 vizsgálatai	19
<i>3.1.1 Beteganyag, klinikai minták és definíciók</i>	<i>19</i>
<i>3.1.2. A méhlepények szövettani vizsgálatai</i>	<i>22</i>
<i>3.1.3. Placenta TMA (tissue microarray) készítés</i>	<i>22</i>
<i>3.1.4. TMA-k immunhisztokémiai vizsgálatai</i>	<i>22</i>
<i>3.1.5. BeWo sejtkultúrák</i>	<i>24</i>
<i>3.1.6. RNS izolálás, cDNS készítés, kvantitatív real-time reverz transzkripció PCR (qRT-PCR)</i>	<i>25</i>
<i>3.1.7. Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia</i>	<i>25</i>
<i>3.1.8. Syndecan-1 immunoassay a vérmintákból és BeWo sejtkultúrából</i>	<i>25</i>
<i>3.1.9. Statisztikai elemzések</i>	<i>26</i>

3.2. A kináz-útvonalak vizsgálatai.....	27
3.2.1. <i>Beteganyag, klinikai minták és definíciók</i>	27
3.2.2. <i>A méhlepények szövettani vizsgálatai</i>	27
3.2.3. <i>Placenta TMA készítés</i>	27
3.2.4. <i>TMA-k immunhisztokémiai vizsgálatai.....</i>	27
3.2.5. <i>Elsődleges trophoblast kultúrák.....</i>	29
3.2.6. <i>BeWo sejtkultúrák</i>	29
3.2.7. <i>RNS izolálás, cDNS készítés, (qRT-PCR).....</i>	30
3.2.8. <i>Fehérje izoláció és foszfo-kináz assay</i>	31
3.2.9. <i>Statisztikai módszerek</i>	31
4. EREDMÉNYEK	33
4.1. A syndecan-1 vizsgálatainak eredményei	33
4.1.1. <i>Demográfiai és klinikai adatok</i>	33
4.1.2. <i>Syndecan-1 expresszió és villosus trophoblast differenciáció</i>	33
4.1.3. <i>Placentáris syndecan-1 mRNS expresszió praeclampsziában</i>	35
4.1.4. <i>A syndecan-1 immunfestődése a méhlepényben praeclampsziában és HELLP szindrómában</i>	35
4.1.5. <i>A syndecan-1 koncentrációja az anyai szérumban praeclampsziában</i>	39
4.1.6. <i>Az ischaemia és az aktin citoskeleton károsodásának hatása a syndecan-1 felszabadulására BeWo sejtekben</i>	40
4.2. Kináz útvonalak vizsgálatainak eredményei	43
4.2.1. <i>Demográfiai és klinikai adatok</i>	43
4.2.2. <i>Génexpresszió változások korai praeclampsziás és HELLP szindrómás betegek méhlepényében</i>	43
4.2.3. <i>A villosus trophoblast jelátviteli útvonalainak megváltozása praeclampsziában és HELLP szindrómában</i>	44
4.2.4. <i>Trophoblast differenciáció hatása egyes angiogén és anti-angiogén gének méhlepényi expressziójára</i>	47
4.2.5. <i>Génexpressziós mintázatok a hypoxiás és ischaemiás trophoblast sejtekben</i>	49
4.2.6. <i>Génexpresszió és kináz aktivitás változások BeWo sejtekben, különböző stressz kondíciók hatására</i>	51

4.2.7. A p38 kináz útvonal hatása BeWo sejtek génexpresszió változásaira hypoxiában és ischaemiában.....	51
5. MEGBESZÉLÉS	54
5.1. Syndecan-1 vizsgálatai.....	54
5.1.1. A syndecan-1 expresszió növekedése villosus trophoblast differenciáció során.....	54
5.1.2. A placentáris syndecan-1 immunfestődés változásai praeclampszában és HELLP szindrómában	55
5.1.3. Csökkent szérum syndecan-1 koncentráció praeclampsziás terheseknél	56
5.1.4. Az ischaemia és a sérült aktin citoskeleton hatása a syncytiotrophoblast syndecan-1 transzportjára.....	57
5.2. Villosus trophoblast kináz útvonalainak vizsgálatai	59
5.2.1. A hypoxia és az ischaemia génexpresszió változásokat indukál a BeWo sejtekben, hasonlóan a korai praeclampsziás méhlepényekhez	59
5.2.2. A trophoblast jelátviteli útvonalainak szerepe praeclampszában és HELLP szindrómában	60
5.2.3. A hypoxia, ischaemia és pro-inflammatorikus stimulus hatása a BeWo sejtek jelátviteli útvonalaira	61
5.2.4. Konklúziók és jövőbeni tervek	62
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	64
7. ÖSSZEFOGLALÁS	66
8. SUMMARY	67
9. IRODALOMJEGYZÉK	68
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	92
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP:	alfa-fötoprotein
Akt-1:	protein kináz B
ALT:	alanin-aminotranszferáz
AST:	aszpartát-aminotranszferáz
BMI:	testtömeg index (kg/m ²)
CGB:	chorionic gonadotropin béta
CRH:	kortikotropin releasing hormon
DAB:	diamino-benzidin
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC:	diffúz intravaszkuláris koaguláció
DMSO:	dimetil-szulfoxid
ECM:	extracelluláris mátrix
EDTA:	etiléndiamin-tetraecetsav
ERK1/2:	extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
FGF:	fibroblaszt növekedési faktor
FLT1:	fms-like tirozin-kináz-1
GAG:	glükózaminoglikán
GCM1:	glial cell missing-1
H ₂ O ₂ :	hidrogén peroxid
HELLP:	(hemolízis, emelkedett májenzim értékek, alacsony trombocitaszám)
HGF:	hepatocita növekedési faktor
HIF-1 α :	hypoxia-indukált faktor-1 alfa
IL-1 β :	interleukin-1 béta
IQR:	interkvartilis tartomány
IUGR:	intrauterin növekedési retardáció
IVH:	intraventrikuláris vérzés
JNK:	c-Jun N-terminális kináz
LEP:	leptin
LDH:	laktát-dehidrogenáz
LMVM:	könnyű mikrovillus membrán

MAPK:	mitogén aktivált protein kináz
MMP:	mátrix metalloproteináz
MVM:	mikrovillus membrán
NF κ B:	nuclear factor kappa béta
NO:	nitrogén-monoxid
p38:	mitogén aktivált protein kináz 14
PBS:	foszfát puffer
PE:	praeclampsia
PGF:	placentáris növekedési faktor
PGI ₂ :	prosztaciklin
PI3K:	foszfatidil-inozitol-3-kináz
RDS:	respiratorikus distress szindróma
RFLP:	restrikciós fragment hossz polimorfizmus
ROCK2:	rho-asszociált protein-kináz 2
ROS:	reaktív oxigén szabadgyökök
RT-PCR:	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SDC1:	syndecan-1
SGA:	terhességi korhoz képest kis súlyú
sEng:	szolubilis endoglin
sFlt1:	szolubilis fms-like tirozin-kináz-1
TBST:	Tris-pufferelt só-tween
TGF β :	tumor növekedési faktor béta
TMA:	tissue microarray
TNF α :	tumor nekrosis faktor alfa
VEGF:	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
VEGFR1:	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 1

1. BEVEZETÉS

1.1. A praeclampsia és HELLP szindróma

1.1.1. A praeclampsia diagnosztikus kritériumai

A praeclampsia a nagy szülészeti kórképek egyike, a terhességek 3-5 %-ában jelentkezik, és egyik fő oka az anyai, születéskori és újszülöttkori megbetegedéseknek és halálozásoknak világszerte [1-3]. A praeclampsia diagnosztikus kritériumai magukban foglalják a terhesség 20. hete után újonnan jelentkező magas vérnyomást (szisztolés vérnyomás ≥ 140 Hgmm vagy a diasztolés vérnyomás ≥ 90 Hgmm, legalább két alkalommal, minimum 4-6 órán belül, maximum hét nappal később mérve), és a proteinuriát (≥ 300 mg/24h) [1, 2].

Rárakódásos praeclampsziáról beszélünk, ha a magas vérnyomás már a terhesség kezdete előtt fennállt. Ilyenkor a praeclampsia diagnosztikai kritériuma a hirtelen emelkedő vérnyomás, az újonnan megjelent vagy gyorsan emelkedő proteinuria, esetleg thrombocitopénia és emelkedett májenzim értékek [4]. Súlyos fokú a praeclampsia, ha a proteinuria mellett a vérnyomás $\geq 160/110$ Hgmm, vagy ha a magas vérnyomás mellett a proteinuria ≥ 5 g/24h, illetve ha a terhesnél egyéb tünetek jelentkeznek, mint látászavar, fejfájás, epigastriális fájdalom, dyspnoé, alacsony trombocitaszám ($<100\ 000$ /ml), májenzim értékek emelkedése [1, 5]. Súlyos praeclampsziában szenvedő terheseknél többszervi elégtelenség is felléphet máj, vese és idegrendszeri érintettséggel [1, 2, 5].

1.1.2. A HELLP (Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets) szindróma diagnosztikus kritériumai

A HELLP szindrómát a praeclampsia egy súlyos formájának gondolták [6], de felmerült az is, hogy egy teljesen elkülönült betegségről van szó, mivel a betegek ötödénél nincs magas vérnyomás és fehérjeürítés, ami a praeclampsia diagnosztikus kritériuma [2, 7-10]. HELLP szindrómáról beszélünk, ha: 1) hemolízis van, ami microangiopathiás hemolitikus anémiához vezet. Ilyenkor a perifériás vérkenetben fragmentált vörösvérsejteket (schistocytákat), Burr-sejteket vagy polikromatikus vörösvérsejteket látunk. Jellemző az anémia, hemoglobinaemia, hemoglobinuria, alacsony a haptoglobin, emelkedett a bilirubin és a laktát-dehidrogenáz (LDH) szint. 2)

Emelkedettek a májenzim értékek, az aszpartát-aminotranszferáz (AST) és az alanin-aminotranszferáz (ALT), ami a máj károsodására utal. Ezt gyakran epigastriális fájdalom kíséri. 3) Thrombocitopénia jelentkezik, ami a Mississippi beosztás szerint három súlyossági fokra osztható: (1) $\leq 50\,000/\text{ml}$, (2) $\leq 100\,000/\text{ml}$, (3) $\leq 150\,000/\text{ml}$. [8-11]. A betegek több mint felénél megjelenik az ödéma, sokaknál hányinger, hányás, fejfájás és látászavar jelentkezhet.

1.1.3. A praeclampsia és HELLP szindróma klinikuma

A klinikai tünetek megjelenésének ideje alapján a praeclampsia különböző alcsoportokra osztható. Beszélhetünk „preterm” ($<37.$ terhességi hét) és „term” ($\geq 37.$ terhességi hét) praeclampsziáról, valamint egy másik beosztás alapján korai (early-onset, $<34.$ terhességi hét) és késői (late-onset, $\geq 34.$ terhességi hét) praeclampsziáról [1, 2, 4, 12]. A késői típus gyakoribb, inkább primiparáknál jelentkezik, kevésbé súlyos, túlnyomórészt anyai következményei vannak. A korai típus ritkább, inkább a többedszer szülőknél jelentkezik, súlyosabb lefolyású, és gyakran társul az életet veszélyeztető HELLP szindrómával valamint intrauterin magzati retardációval (IUGR) [1, 2, 4, 12, 13].

A praeclampsia számos kockázati tényezőjéről tudunk. Praeclampsziára hajlamosít például a fiatal vagy idős anyai életkor, első terhesség, terhesség új partnerrel, praeclampsia első fokú rokonnál, fertőzés az anyánál, diabetes, autoimmun betegségek, emelkedett BMI terhesség előtt, valamint a trombofilia [9-11, 14-16]. Bizonyos DNS variánsok jelenléte a 2p13, 2p25, 9p13, és 10q22 kromoszómális régiókban összefüggést mutat a praeclampsia kialakulásával [17-19], számos tanulmány említi az ezen locusokon található gének megváltozott működését. Ilyen például a *STOX1* gén a 10q22 locuson, ami a trophoblast invázióban játszik szerepet [19], vagy a 2p25 locusához tartozó *ROCK2* gén, ami vazokonstriktációban és indirekt módon a vérnyomás szabályozásban játszik szerepet [18]. A praeclampsia ismétlődési kockázata a különböző tanulmányokban tág határok között változik [20]. A következő terhességben nem csak a praeclampsziás előzmény fontos, hanem egyéb tényezők is számítanak, például a két terhesség között eltelt idő [21], vagy hogy az előző praeclampsziás terhesség ikerterhesség volt-e [22]. A terhesség alatti dohányzás viszont csökkenti a praeclampsia kockázatát [23].

A praeclampsia lefolyása sok mindentől függ, például attól, hogy milyen az anya általános egészségi állapota, milyen terhességi korban jelentkeztek a betegség tünetei, azok mennyire súlyosak, és mely terhességi korban születik meg az újszülött. Az anyai halálozások 10-15%-áért a praeclampsia és HELLP szindróma, illetve ezek következményei, a máj és veseelégtelenség, májruptura, agyödéma, stroke, korai lepényleválás, diffúz intarvaszkuláris coagulopathia (DIC), vagy a tüdőödéma felelősek [1, 3, 9, 10]. A magzati és újszülöttkori halálozások kockázata főleg HELLP szindrómánál magas, illetve azoknál a terheseknél, ahol nagyon korán, a 32. hét előtt történik a szülés. Ezen esetekben a magzati mortalitás leggyakoribb okai a koraszülés, placenta leválás és a súlyos IUGR. A legsúlyosabb anyai morbiditási okok közé tartozik az eclampsia, trombózis, infarktus, ödéma, akut veseelégtelenség, májelégtelenség, és DIC. A koraszülés és az elégtelen lepényi működés következményeként az újszülötteknél asphyxia, trombocitopénia, intraventriculáris hemorrhagia (IVH), vagy respiratorikus distressz szindróma (RDS) alakulhat ki [1, 3, 9, 10].

Sajnos a betegség megjelenését követően jelenleg még csak tüneti kezelés lehetséges, antihipertenzív szereket, antikonvulzív gyógyszereket, esetleg fehérjepótlást alkalmazhatunk. A végleges megoldás még ma is csak a terhesség befejezése, mert a legtöbb esetben a praeclampsia a méhlepény megszületését követően megszűnik [1, 2]. Természetesen a szülés időpontjának megválasztása nehéz feladat, mérlegelni kell az anyai és magzati érdekeket, és a lehető legoptimálisabb időpontot kell kiválasztani.

A praeclampsia megelőzése a cél. A nemzetközi kutatások arra irányulnak, hogy megjelöljék azokat a biomarkereket, amelyekkel már korán kiszűrhetővé válnának a magas kockázatú terhesek, illetve kidolgozzanak olyan terápiás lehetőséget, amelyekkel biztosítható, hogy a terhesség minél tovább kiviselhető legyen anélkül, hogy az anya vagy a magzat egészségét veszélyeztetné. A praeclampsia előrejelzésére eddig kidolgozott tesztek többségének azonban specifitása és szenzitivitása még nem megfelelő, emiatt nem is nagyon terjedtek el a klinikai gyakorlatban [1]. Különböző prevenciós terápiákat is leírtak már kutatók, legismertebb a kalcium és az alacsony dózisu aszpirin preventív hatása [24, 25], de ezek hatékonysága megkérdőjelezhető. A diagnosztikus és terápiás irányultságú kutatásokat megnehezíti, hogy a praeclampsia kizárólag az embernél fordul elő, ezért az állatkísérletes modellek értéke limitált.

A kórkép valószínűleg multifaktoriális eredetű, egyesek immunológiai, mások genetikai okokat feltételeznek a háttérben, de valószínűsíthető, hogy a méhlepénynek kulcsfontosságú szerepe van a betegség kialakulásában. Egyrészt a praeclampsia általában megszűnik a méhlepény világrahozatala után, másrészt a lepény megváltozott működéséből következően fontos szerepe van az anti-angiogén faktorok termelésében, melyek a praeclampsia patomechanizmusának központi útvonalát indítják be [26-29].

Mi a praeclampsia és HELLP szindróma kutatásaiban ezért a méhlepény vizsgálataira koncentráltunk. Korábbi kutatásaink folytatásaként egyrészt olyan jelátviteli molekulákat vizsgáltunk, amelyek fontos szerepet játszanak a méhlepény működésében, sejtproliferációban, migrációban, apoptózisban. Vizsgáltuk olyan gének expressziós mintázatát is, melyek szerepet játszhatnak a méhlepény kóros működésében praeclampsiaiban. Emellett különböző jelátviteli utak aktiválódását is tanulmányoztuk a méhlepényben, majd arra is kíváncsiak voltunk, hogy ezen jelátviteli útvonalak megváltozását milyen stressz állapotok idézhetik elő, és hogy ezek hogyan befolyásolják a placentában a génexpressziót.

1.2. A méhlepény kóroki szerepe a praeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában

1.2.1. A méhlepény fejlődési zavara koraterhességben

A méhlepény biztosítja az anya és a magzat közti kapcsolatot, feladata a gázcsere biztosítása, a magzat táplálása, a káros anyagcseretermékek eltávolítása, valamint számos terhességi hormont is termel [30]. A méhlepény megfelelő vérellátásának kialakulása érdekében az anyai spirális artériák az első és második trimeszter során tág uteroplacentáris erekké alakulnak, amiért az extravillosus cytotrophoblast sejtek felelősek. Ezek a sejtek invazív tulajdonságuknak köszönhetően a méhlepényből az anyai deciduába és a méh izomzat felső harmadába vándorolnak, és itt áttörik az anyai spirális artériák falát, ami szerepet játszik a simaizom (tunica media) fiziológiás eltűnésében terhesség során. Ezáltal a spirális artériák nagymértékben kitágulnak, ellenállásuk pedig lecsökken, és az anyai vér csökkent ellenállással szemben, folyamatosan áramolhat az intervillosus ürbe [31, 32]. A praeclampsia mellett érdekes módon az ismeretlen eredetű IUGR-ban is ez a trophoblast inváziós folyamat károsodik, és emiatt a méhlepény vérellátása nem megfelelő [33-35], ami fluktuáló véráramláshoz,

placentáris stresszállapothoz, a méhlepény struktúrális és funkcionális károsodásához vezet [36, 37].

1.2.2. Endoplazmatikus retikulum stressz és ischaemiás stressz szerepe a korai praeclampsia kialakulásában

A trophoblast inváziós zavar praeclampsiaiban jóval súlyosabb, mint az ismeretlen etiológiájú IUGR-ben, és praeclampsiaiban belül pedig jóval kifejezettebb a korai formákban, különösen az IUGR-rel kapcsolt altípusban [2, 32, 37, 38]. Hosszú ideig úgy gondolták, hogy a trophoblast invázió zavara a méhlepény hypoxiás károsodásához és következményesen praeclampsiahoz vezet [39]. A hypoxia önmagában azonban inkább az ismeretlen eredetű IUGR oka lehet, ahol a spirális artériák csak kisebb mértékben károsodnak. Itt az alacsonyabb méhlepényi oxigén koncentráció miatt enyhe endoplazmatikus retikulum stressz jelentkezik, ami csökkent fehérjetermeléshez és sejtproliferáció gátláshoz vezet a placentában. Emellett IUGR esetén az angiogenezis és a glükokortikoid-anyagcsere folyamatai is felborulnak, az apoptózis fokozódik, és ezeknek a hatásoknak az eredménye lesz a kis súlyú méhlepény, és a jellegzetes fenotípusú magzat [40, 41]. Praeclampsiaiban, leginkább a korai formákban, azonban a spirális artériák súlyosan károsodnak, a méh vérellátása nem egyenletes, ezért súlyos endoplazmatikus retikulum stressz és nagyfokú apoptózis lép fel. Emellett ischaemiás károsodás és oxidatív stressz alakul ki. Ennek következtében a villosus syncytiotrophoblastból anti-angiogén molekulák és aponekrotikus sejttörmelékek szabadulnak fel, amik az anya szervezetében szisztémás gyulladást és endothel károsodást okoznak [36, 37, 40, 42].

1.2.3. Méhlepényi szövettani elváltozások korai és késői praeclampsiaiban, valamint HELLP szindrómában

A fentiekkel kapcsolatosan a praeclampsias betegek méhlepényének hisztopatológiai vizsgálatakor számos súlyos elváltozás figyelhető meg. A deciduában például érkárosodások, akut atherosclerosis alakul ki, hialin-szerű lerakódások és habos sejtek találhatóak az arteriolák falában [43, 44]. A korai praeclampsias terheseknél a placenta morfológiai eltérései sokkal erőteljesebbek, mint késői praeclampsia esetén [38, 45], és nagy hasonlóságot mutatnak a HELLP szindrómás betegek méhlepényeinek

morfológiájával [46]. A mi munkacsoportunk is erre az eredményre jutott egy korábbi tanulmányban, amelyben a kontroll csoportokhoz képest sokkal több volt a lézió, a syncytiális csomó és a boholy éretlenség a korai praeclampsias illetve HELLP szindrómás betegek méhlepényeiben [47]. Ez alapján is feltételezhető volt, hogy a korai praeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában hasonló tényezők játszanak szerepet, míg a késői típusú praeclampsia kialakulásában eltérő okokat kell keresnünk.

1.2.4. A placentáris génexpresszió megváltozása praeclampsias és HELLP szindrómában

Munkacsoportunk ezen korábbi tanulmányában [47] arra a következtetésre jutott, hogy a korai praeclampsia és HELLP szindróma hasonló biológiai folyamatok eredménye lehet, mert a placentáris génexpresszió hasonlóan változik a két betegcsoportban. A vizsgálatban mélyfagyasztott méhlepény mintákból microarray módszerrel 350 gén eltérő expresszivitását mutattuk ki praeclampsias placentákban a kontrollokhoz képest [47]. Tanulmányunkban a HELLP szindrómás betegek méhlepényeiben 554 génnek változott meg az expresszivitása a kontroll csoport méhlepényeiéhez képest. Ezek közül 224 gén hasonló eltérést mutatott HELLP szindrómás és korai praeclampsias méhlepényekben egyaránt, a HELLP szindróma 20 legjobban alul vagy felül expresszált génje közül 16 szintén hasonló módon változott meg korai praeclampsiasban. Ezek közül jelentős számú gént már más kutatók is kapcsolatba hoztak a praeclampsiasal [48-51]. Érdekes módon, a gén ontológiai elemzések eredményeként 69 olyan biológiai folyamatot detektáltunk a HELLP szindrómás betegek placentáiban, ami a praeclampsias lepényekben leírt folyamatokhoz hasonlóan változtak meg [47]. Az általunk publikált microarray adatokkal összhangban egy nemrég publikált microarray-meta-analízis arra jutott, 30 tanulmány adatait összefoglalva, hogy az angiogenesis folyamatához kapcsolható *ENG*, *FLT1*, *LEP*, *PGF* és *VEGF* gének expressziója megváltozik praeclampsias betegek méhlepényeiben [51]. Ezen angiogenesisben szerepet játszó gének közül az *FLT1*, *LEP* és *PGF* géneket választottuk jelen tanulmányunk tárgyául.

1.2.5. Az angiogén és anti-angiogén faktorok egyensúlyának felborulása, anyai szisztémás gyulladás és endothel diszfunkció praeeclampszában és HELLP szindrómában

Normális működés esetén a placenta angiogenezist serkentő faktorokat juttat a keringésbe, melyek közül a két legfontosabb a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) és a placentáris növekedési faktor (PGF).

A VEGF az érfejlődésben központi szerepet játszó faktor, melynek számos funkciója ismert, befolyásolja a sejtek proliferációját, migrációját és ez által az angiogenezist [52]. A VEGF expresszió fokozódásáért leginkább a hypoxia felelős, melynek hatására a hypoxia-indukált faktor-1 α (HIF-1 α) a VEGF gén promóter régiójához kapcsolódva beindítja a VEGF transzkripció folyamatot [53].

A VEGF-nek számos izoformája ismert a különböző szövetekben, a 206-os izoforma legnagyobb részt a placentában termelődik [54]. A VEGF szerepet játszik a placentáris angiogenezisben, a vaszkuláris remodellingben, a trophoblast invázióban és differenciációban is. Erősen kötődik a VEGFR1 (Flt-1) receptorhoz az endothelsejt felszínén, melyhez a PGF is kötődni képes, és ezáltal különböző jelátviteli útvonalakat, például a MAPK útvonalakat is aktiválja [55].

A PGF a VEGF-hez hasonló fehérje, melyet a méhlepény termel [56, 57]. Kiderült, hogy a terhesség során a 32. terhességi hétig emelkedik a PGF koncentráció az anyai szérumban, majd ezt követően csökken a szintje a szülésig [58]. Praeclampszában viszont alacsonyabb már koraterhességben is [59-61]. Az alacsony PGF szint IUGR-t is jelezhet, már akkor is, mikor még Doppler-ultrahanggal ez esetleg nem detektálható [62]. A 22-34. terhességi hét közötti alacsony PGF szérum szint esetén pedig nagy a kockázata a magzat állapota miatti indukált koraszülésnek [63].

A károsodott méhlepény fokozottan termel és juttat a keringésbe számos anti-angiogén faktort, például a szolubilis fms-like tirozin-kináz-1-et (sFlt-1) [64-66], ami a VEGFR1 receptor szolubilis formája. Biomarkerként tartják számon, sok tanulmány összefüggést talált a praeeclampsia és a sFlt-1 szérum szintje között [67-69]. A sFlt-1 a syncytiotrophoblastból szabadul fel, és a szérumban keringő angiogén hatású VEGF-et és PGF-et megköti, semlegesíti [70, 71]. Ez a mechanizmus a praeeclampsziások és HELLP szindrómások vérében talált alacsony VEGF és PGF koncentráció egyik oka. Már mintegy 4-5 héttel a praeeclampsia klinikai tüneteinek megjelenése előtt emelkedik

az anyai vér sFlt-1 koncentrációja, és végig magasabban is marad az egészséges terhesek sFlt-1 szérumszintjéhez képest [61]. A magas sFlt-1 az endothel sejteket destabilizálja, főleg a fenesztrált endotheliumot érinti az vesében, májban, és agyban, azokban a szervekben, amelyek praeeclampsiaiban is érintettek [61, 72].

Egy másik anti-angiogén faktor, a szolubilis endoglin (sEng), ami a TGF β 1 receptor csomópont formája, placentáris expressziója és anyai szérumszintje szintén emelkedik praeeclampsiaiban [1, 27, 29, 47, 48, 50, 73-82]. A TGF β 1-et köti, nem engedi kapcsolódni a receptorához, ami a NO emelkedéséhez, vazodilatációhoz vezetne. A szervezetben szisztémás endotheliális diszfunkció, vesekárosodás, kardiovaszkuláris károsodás következik be, ami a magas vérnyomást és a proteinuriát is okozhatja [3, 26, 28, 72].

Ugyan nem kifejezetten anti-angiogénikus faktor, de az érfejlődésre hatással van a leptin is, melynek placentáris expressziója és anyai szérumszintjei ugyancsak emelkednek praeeclampsiaiban és HELLP szindrómában [37, 47, 50, 83-88]. A leptin számos szövetben megtalálható, nem terheseknél a legnagyobb mennyiségben a zsírszövet termeli [89], terheseknél azonban a leptin 95%-a a méhlepényből származik [90]. Fontos, adaptációt elősegítő szerepe van a terhességben [91], fokozza a humán choriogonadotropin hormon (hCG) termelését, mobilizálja az anya zsírraktárakat [92], hatással van a gyulladásos folyamatokra és az angiogenezisre, aktiválni tudja PI3K és MAPK jelátviteli útvonalakat [93]. A leptin receptor polimorfizmusa és a súlyos praeeclampsia között is találtak összefüggést [94]. Ez összefügg lehet azzal, hogy a praeeclampsia kockázati tényezői között szerepelnek metabolikus problémák is, mint az elhízás, inzulinrezisztencia és dislipidaemia [43, 44].

Ezen molekulákon kívül a praeeclampsiaiban károsodott méhlepény fokozottan termel és juttat a keringésbe kortikotrop-releasing hormont (CRH) [95-97], az aponekrózis következtében syncytiotrophoblast törmeléket és mikropartikulumokat [42, 98, 99], pro-inflammatorikus citokineket, immunfehérjéket (pl.: tumor nekrosis faktor alfát (TNF α), interleukin-1 bétát (IL-1 β), galectin-1 stb.) [42, 100-104], és más, ez idáig nem azonosított faktorokat. Ezek összességében végül az anya szervezetében egy anti-angiogén állapotot és fokozott szisztémás gyulladásos reakciót indítanak el, amik a magas vérnyomás és a fehérjeürítés kialakulásához vezetnek [1-3, 37, 40, 42, 61, 64, 66, 82, 103, 105-121].

1.2.6. A VEGF egyes génpolimorfizmusainak feltételezett szerepe praeeclampsia

Mivel a fentiek alapján a megváltozott VEGF jelátviteli útvonalnak a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában szerepe lehet, egy korábbi tanulmányunkban összehasonlítottuk praeeclampsias és kontroll terhesek VEGF $G^{+405}C$ és a VEGF $C^{-2578}A$ génjének polimorfizmusait [122]. A VEGF génnek számos polimorfizmusa ismert ugyanis, és néhány ezek közül, mint például a VEGF $G^{+405}C$ és a VEGF $C^{-2578}A$ bizonyítottan befolyásolja a fehérje termelődését [123, 124]. Humán vérmintából izolált mononukleáris sejtekben például azt találták, hogy a VEGF $^{+405}$ GG allélt hordozók termelték a legtöbb VEGF-t, a VEGF $^{+405}$ GC allélt hordozók közepes mennyiséget, míg a VEGF $^{+405}$ CC allélt hordozók a legkevesebb VEGF-t termelték [124]. A VEGF $^{-2578}$ CC allélt hordozók több VEGF-et termeltek, mint a VEGF $^{-2578}$ AA allélokat hordozók [123].

A mi tanulmányunk arra kereste a választ, befolyásolják-e ezen gének polimorfizmusai a praeeclampsia kialakulását, és van-e szerepük ezeknek az polimorfizmusoknak a betegség kórlefolyásában. A kutatásba 87 nullipara praeeclampsias terhes került be, kontrollként 96 kompikációktól mentes nullipara terhest vizsgáltunk. A terhesek véréből nyert DNS izolálása után a VEGF gén $G^{+405}C$ és $C^{-2578}A$ polimorfizmusának meghatározását PCR-RFLP technikával végeztük el. A logisztikus regressziós analízis szignifikáns összefüggést mutatott a praeeclampsia kialakulása és a VEGF $G^{+405}C$ allél hordozása között, ugyanakkor a VEGF $^{+405}$ G allél hordozása protektív hatásának bizonyult a praeeclampsia kialakulásával szemben.

A VEGF $C^{-2578}A$ polimorfizmusnál nem találtunk szignifikáns eltérést a genotípusok megoszlása között, viszont az A allélt hordozó praeeclampsias terheseknél a hipertonia 1,64 héttel, a proteinuria pedig 1,89 héttel korábban jelentkezett, mint a többi praeeclampsias terhes esetében. A VEGF $^{+405}$ GG és a VEGF $^{-2578}$ CC homozigóták esetében a hipertonia 2,77 héttel, a proteinuria pedig 1,78 héttel később kezdődött, mint az egyéb allélkombinációt hordozó betegek esetében.

Ezen adatok tükrében elmondhatjuk, hogy az emelkedett VEGF produkcióval járó allél hordozása csökkenti a praeeclampsia kockázatát [125], az alacsonyabb VEGF termelődéssel járó polimorfizmus hordozása viszont növelheti a praeeclampsia súlyosságát. Mivel a VEGF *in vivo* vazodilatációt [126] és hypotenziót okozott [127],

valószínűleg a nitrogén-oxid (NO) [128] és a PGI₂ [129] indukálásán keresztül, ezért lehetséges, hogy az alacsony VEGF koncentráció esetén ezen hatás csökkenése miatt előbb jelent meg a magas vérnyomás. A proteinuria pedig azért jelentkezhetett korábban, mert a VEGF a vese glomeruláris filtrációjának megőrzésében is szerepet játszik, és *in vivo* kísérletek kimutatták, hogy a podocyta által termelt VEGF gátlása a glomerulusok károsodását okozta, ami proteinuriához vezetett [130].

1.2.7. A syncytiotrophoblast lehetséges kóroki szerepe a megváltozott placentáris jelátviteli útvonalakban praeeclampsiaiban és HELLP szindrómában

Érdekes, hogy a fentiekben említett, a méhlepény által praeeclampsiaiban túltermelt faktorok jelentős része a méhlepény felszínén egybefüggő syncytium réteget alkotó syncytiotrophoblast termeli [98, 131]. A syncytiumot alkotó soksejtmagvú syncytiotrophoblast a villosus cytotrophoblastokból aszimmetrikus sejtosztódással keletkezik, amelyek differenciálódás közben beolvadnak a syncytium rétegbe [132]. A fentiek alapján felmerült, hogy esetleg a villosus cytotrophoblastok nem megfelelő differenciációja is szerepet játszhat a praeeclampsia kialakulásában [133]. A villosus cytotrophoblastok differenciációja elsődlegesen cAMP-mediált szabályozás eredménye [73, 131, 134]. A cAMP-mediált jelátvitel szabályozza a méhlepényben a leptin [3, 84, 135, 136], a hCG [84, 102, 135] és CRH [95, 137, 138] termelését is, amik praeeclampsiaiban a syncytiotrophoblastban éppen hogy erősen expresszálódnak [84, 135, 139, 140]. Ezen eredmények alapján kétséges, hogy a villosus trophoblast differenciáció károsodna praeeclampsiaiban. A legújabb eredmények inkább arra mutatnak, hogy nem a differenciáció, hanem a trophoblast fúzió változik meg korai, súlyos praeeclampsia esetén [141-143]. Tanulmányunkban ezért a humán glial cell missing-1 (*GCM1*) gént is vizsgáltuk, ami a villosus trophoblast sejtek fúzióját, a syncytiotrophoblast kialakulását elősegítő syncytin és egyéb trophoblast-specifikus fehérjék (pl. Placenta Protein 13, PP13) termelődését szabályozza a villosus trophoblastban [144, 145]. Ismeretes, hogy a *GCM1*, syncytin és a PP13 expressziója is alacsony praeeclampsiaiban és HELLP szindrómában [115, 141, 145, 146].

A syncytiotrophoblast rétegnek számos funkciója van. A kórokozók, anyai sejtek számára gátat képez, ugyanakkor tápanyagok, gázok és salakanyagok számára hatékony transzportot biztosít [147]. Nagy mennyiségben termel glikoproteineket és hormonokat,

mint például a hCG-t és a humán placentáris laktogént (hPL). Számos receptor található a felszínén, mely növekedési faktorokat köt és ezáltal különböző jelátviteli útvonalakat aktiválni képes. Ezen placentáris jelátviteli útvonalak megváltozásáról praeclampszában még viszonylag kevés tanulmány tesz említést. Mi azért vizsgáltuk a MAPK és az Akt jelátviteli útvonalakat a villosus trophoblastban, mert ezek a praeclampszában érintett sejtproliferációban és apoptózisban játszanak szerepet.

Azon molekulák közül, melyek a placentáris jelátviteli útvonalakat befolyásolhatják, a syndecan-1 került a látókörünkbe, mert erős expresszivitást mutat az emberi méhlepény syncytiotrophoblast rétegében [148-151]. Élettani funkciója és esetleges szerepe a kóros placentáció kialakulásában még nem ismert, de annak alapján, hogy magas az expressziója a méhlepényben, és az anyai és a magzati felszínek közti határfelületen található, valószínűleg fontos szerepe van az egészséges terhesség fenntartásában [148]. Ezzel összefügghet, hogy a syndecan-1 részt vesz az érfejlődésben, mivel számos növekedési faktort kötni képes (fibroblaszt növekedési faktor 2 (FGF), hepatocita növekedési faktor (HGF), transzformáló növekedési faktor béta (TGF β), (VEGF, stb.), ezeket aktiválja, és serkenti az angiogenezist [152, 153].

Számos cikk szól a syndecan-1 gyulladásban betöltött szerepéről is. Egyrészt képes megkötni az endothel sejtek felszínén a kemokineket, ezzel meghatározza a kemokin grádienszt, így elősegíti a leukocyták migrációját [154]. A mátrix metalloproteinázok (MMP) által mediált „shedding” mechanizmus révén pedig levágódhat a membrán felszínéről, magával viheti, vagy a keringésbe kerülve megkötheti az ott lévő kemokineket, gyulladásos faktorokat, ezáltal segítheti a gyulladás lezárását [155]. Két korábbi tanulmány ismertette, hogy praeclampszában csökken a syncytiotrophoblastban a syndecan-1 expressziója [149, 150], míg egy másik tanulmányban a syndecan expresszió növekedéséről számolnak be ebben a kórképben [151]. HELLP szindrómában eddig még nem vizsgálták ezt a proteoglikánt.

Tanulmányokban, ahol a vizsgálat a trophoblast és a méhlepény hypoxiás vagy ischaemiás károsodására [36, 42, 156] vagy a placentáris gének diszregulációjára [84, 135, 136, 157-160] fókuszál, bizonyos jelátviteli útvonalak szerepét korábban már kimutatták a praeclampsia patogenezisében. A HIF-1 α például válaszul az alacsony parciális oxigén nyomásra aktiválódik praeclampszában [156, 161], és a sFlt-1 és a sEng expresszió emelkedését okozza a méhlepényben [156, 161]. A méhlepény

ischaemiás károsodása pedig oxidatív stresszt és reaktív oxigén gyökök aktiválódását okozza, amik a p38 α , JNK, és ERK1/2 útvonalakat aktiválják [36, 42]. Hatásukra a méhlepényből gyulladásos mediátorok, aponekrotikus törmelékek, anti-angiogén anyagok és más mediátorok szabadulnak fel [36, 42]. Mivel élettani terhességben ezeknek az útvonalaknak a szerepét az angiogenezisben, sejt differenciációban számos tanulmány bizonyítja [42, 80, 162-164], ez alapján feltételezhető volt, hogy ezen kináz-útvonalaknak a megváltozott működése kiemelt szerepet játszhat a praeclampsia és a HELLP szindróma kialakulásában. A villosus trophoblastban azonban még nem írták le ezen jelátviteli útvonalak megváltozását.

A fentiek alapján feltételeztük, hogy egy bonyolult interakció zajlik praeclampszában a különböző stresszállapotok, trophoblastikus kináz jelátviteli útvonalak megváltozása, a placentáris génexpressziós mintázat valamint funkcionális változások között. Tanulmányunkban ezért az angiogenezisben és villosus trophoblast fúziójában szerepet játszó *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* géneket választottuk ki az expressziós vizsgálatokhoz. Célunk volt még, hogy egy fontos jelátviteli molekula, a syndecan-1 expressziójának változásait feltérképezzük a praeclampsia különböző csoportjaiban és HELLP szindrómában. Másrésztől kíváncsiak voltunk, hogy az Akt-1 és MAPK jelátviteli útvonalak ismert tagjainak, a foszforilált Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kinázok villosus trophoblastikus expressziója és aktivitása változik-e praeclampszában és HELLP szindrómában, valamint a különböző alkalmazott stressz kondíciók hatással vannak-e ezen kinázok működésére a trophoblastban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A syndecan-1 expresszió változásainak összehasonlító vizsgálata praeeclampsiás és HELLP szindrómás betegektől valamint várandós kontrolloktól származó méhlepényekben;
2. A vészérum syndecan-1 koncentrációjának összehasonlító vizsgálatai egészséges terhesekben és praeeclampsiás betegekből;
3. Az ischaemia és az aktin citoszkeleton károsodás syndecan-1 expresszióra és felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata BeWo sejtes modellen;
4. A foszforilált Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kinázok expressziós és aktivitásbeli változásainak vizsgálata praeeclampsiás és HELLP szindrómás betegektől valamint várandós kontrolloktól származó méhlepényekben;
5. A praeeclampsia kialakulásával társult *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expresszióját szabályzó cAMP jelátviteli útvonalak vizsgálata BeWo sejtmoldellen;
6. Az *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expressziójának és az Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kinázok aktivitásának vizsgálata BeWo sejtmoldellen, hypoxiás, ischaemiás és gyulladásoos stressz kondíciókban;
7. Az Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kináz inhibitorok hatásának vizsgálata BeWo sejtek gén expressziós mintázatára hypoxiás, ischaemiás és gyulladásoos stressz kondíciókban.

3. MÓDSZEREK

3.1. A syndecan-1 vizsgálatai

3.1.1 Beteganyag, klinikai minták és definíciók

Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásetikai Bizottsága és a Wayne State Egyetem (Detroit, Michigan, USA) Human Investigation Committee-ja engedélyezte a kollaborációs kutatásokat. A méhlepényi vizsgálatokhoz a mintákat a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük. A terhességek korát a 8-12. héten történt ultrahangvizsgálat alapján állapították meg. Az ikerterhesek, és azok a terhesek, akik magzatainál fejlődési rendellenességet vagy kromoszóma aberrációt találtak, nem kerültek be a kutatásba. A vizsgálatba bevont várandós nőket a következő betegcsoportokba osztottuk: 1) korai praeclampsia (n=7); 2) korai praeclampsia HELLP szindrómával (n=8); 3) korai kontroll (n=5); 4) késői praeclampsia (n=8); 5) késői kontroll (n=9) **(1. táblázat)**.

A praeclampsia diagnosztikai kritériuma volt a 20. terhességi hét után újonnan megjelent magas vérnyomás (szisztolés vérnyomás ≥ 140 Hgmm vagy a diasztolés vérnyomás ≥ 90 Hgmm, legalább két alkalommal, minimum 4-6 órán belül, maximum 7 nappal később mérve), és proteinuria. A fehérjevizelés kritériumai: ≥ 300 mg fehérje volt a 24 órás vizeletgyűjtés eredménye, vagy két véletlenszerűen kiválasztott vizeletben $\geq 1+$ fehérje volt az indikátor csík teszt eredménye (a mérés minimum 4 órán belül, maximum 7 nap különbséggel történt), vagy egyszeri alkalommal $\geq 2+$ fehérje volt az indikátor csík teszt eredménye. A korai praeclampsias csoportba kerültek azok, akiknél a praeclampsia klinikai tünetei a 20. és a 35. terhességi hét között jelentkeztek, a késői praeclampsias csoportba kerültek azok, akiknél a tünetek a 35. terhességi hét után jelentkeztek [4].

HELLP szindrómát állapítottunk meg, ha 20. terhességi hét után jelentkezett hemolízis (sLDH > 600 IU/l; bilirubin $> 1,2$ mg/dl; schistocyták voltak a vörösvértest kenetben), trombocytopenia (thrombocyt $< 100\,000/\text{mm}^3$), és emelkedtek a májenzim-értékek (sALT és/vagy sAST > 70 IU/l) [8-11].

1. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok

Csoportok	korai kontrollok	Korai praeeclampsia		Késői kontrollok	Késői praeeclampsia
		HELLP szindróma nélkül	HELLP szindrómával		
Esetszám ^a	5	7	8	9	8
Anyai életkor (év) ^b	31,6 (31,1-34,3)	34,0 (27,6-35,0)	29,4 (26,1-30,2)	30,8 (30,1-34,2)	31,3 (25,2-34,8)
Terhességi kor a szülésnél (hét) ^b	31,7 (31,0-34,0)	32,6 (31,2-34,4)	29,4 (28,0-32,6)	38,9 (38,7-39,7)	37,4 (36,8-38,1) [#]
Primiparitás ^c	60	71	50	11	50
Szisztolés vérnyomás (Hgmm) ^b	120 (120-133)	160 (155-160)*	165 (145-170)*	130 (125-135)	156 (150-170) ^{# #}
Diastolés vérnyomás (Hgmm) ^b	80 (70-80)	100 (100-100)*	100 (95-110)*	80 (78-85)	95 (90-100) ^{# #}
Proteinuria ^c	0	100**	100**	0	100 ^{# #}
Anyai BMI (kg/m ²) ^b	23,4 (20,1-24,6)	24,4 (23,4-25,2)	24,7 (21,3-26,9)	26,7 (23,1-28,0)	22,0 (19,2-23,2)
Újszülött születési súlya (g) ^b	1990 (910-2210)	1100 (1010-1280)	965 (840-1545)	3470 (3400-4030)	2955 (2555-3175) ^{# #}
Császármetszés ^c	100	100	100	100	100

Minden várandós nő kaukázusi rasszba tartozott.

**p<0.01; *p<0.05 a terhességi korrall illesztett korai kontrollokhoz viszonyítva

##p<0.01; #p<0.05 a terhességi korrall illesztett késői kontrollokhoz viszonyítva

^aAz értékek számként vannak kifejezve

^bAz értékek mediánja és az interkvartilis tartomány (IQR) van kifejezve

^cAz értékek százalékban vannak feltüntetve

Minden vizsgálatba bevont várandósnál a terhességet császármetszéssel fejezték be. A késői kontroll csoportoknál nem volt egészségügyi probléma vagy szülészeti komplikáció, a császármetszés korábbi császármetszés vagy fekvési rendellenesség miatt történt, és a terhességi kornak megfelelő súlyú újszülött jött a világra [165]. A korai kontroll csoportba azon várandósok kerültek, akiknél a szülés fájástevékenység vagy idő előtti burokrepedés következtében indult meg, a terhesség császármetszéssel került lezárásra a terhesség 35. hete előtt, és utólag nem volt megtalálható semmilyen klinikai vagy patológiai oka a koraszülésnek. A részletes betegtájékoztatót követően minden résztvevő beleegyező nyilatkozatot írt alá. A betegek adatait a vizsgálatok során végig anonim módon kezeltük.

Az anyai vérminták (n=81) a Perinatology Research Branch (NICHD, NIH, DHHS, Detroit, Michigan, USA) Biológiai Mintabankjából lettek kiválasztva. A betegeket a következő csoportokba osztottuk: 1) praeclampsia (n=49) és 2) kontrollok (n=32) (2. táblázat). A praeclampsias csoporton belül a kevés HELLP szindrómás beteget nem soroltuk külön alcsoportba. A párosított mintákat úgy választottuk ki, hogy a kontroll csoportban és a beteg csoportban lévő várandósok terhességi kora között maximum két hét különbség legyen. A vérminták a szülés előtti héten lettek levéve, 1300g-n centrifugálták 10 percig 4°C fokon, és a vizsgálatig -70°C-on tárolták.

2. táblázat. Az anyai szérum vizsgálatban részt vett csoport demográfiai és klinikai tulajdonságai

Csoportok	Kontroll	Praeclampsia
Esetszám ^a	32	49
Anyai életkor (év) ^b	25,5 (20-31)	23 (19,5-28,5)
Afro-amerikai rassz ^c	84	94
Terhességi kor a szüléskor (hetek) ^b	36,8 (29,9-38,8)	34,6 (30,1-37,7)
Primiparitás ^c	25	51*
Szisztolés vérnyomás (Hgmm) ^b	118 (114-128)	176 (166-190)**
Diasztolés vérnyomás (Hgmm) ^b	67 (62-73)	106 (101-112)**
Proteinuria ^c	12,5	100**
HELLP szindróma ^c	0	20**
Anyai BMI (kg/m ²) ^b	26,4 (21,7-32,8)	26,8 (23-32,6)
Újszülött születési súlya (g) ^b	3073 (1258-3268)	1825 (1070-2635)**
SGA újszülött ^c	0	47**
Császármetszés ^c	50	59

**p<0.01; *p<0.05; ^aAz értékek számként vannak kifejezve; ^baz értékek mediánja és az interkvartilis tartomány (IQR) van kifejezve; ^caz értékek százalékban vannak feltüntetve.

3.1.2. A méhlepények szövettani vizsgálatai

Ahogy korábbi publikációinkban részletesen leírtuk, a méhlepények közvetlenül a császármetszés után kerültek feldolgozásra. A microarray vizsgálatokhoz a méhlepényekből centrális cotyledók lettek kivágva, és a korábban leírt módszerrel lett elvégezve a microarray analízis [47]. A méhlepények standard hisztopathológiai protokoll szerint lettek megvizsgálva, a morfológiai és makroszkópos elváltozások pedig egy adatbázisban rögzítve lettek [47, 115, 166]. A patológiai feldolgozásokhoz a minták 10%-os formalinban lettek fixálva. A hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz minden placentából öt reprezentatív szöveti blokk lett paraffinba ágyazva: két-két centrális és perifériás blokk a magzati oldalról, valamint egy blokk az anyai oldalról. A mikroszkópos vizsgálatokhoz 4µm vastagságú metszeteket készítettünk a blokkokból, és SuperFrost/Plus lemezekre (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Németország) helyeztük őket. Deparaffinálás után a metszeteket rehidráltuk, hematoxin-eozin festékekkel megfestettük, és 10 véletlenszerűen kiválasztott mezőben mikroszkóppal értékeltük. A makroszkópikus és mikroszkópikus léziókat a publikált kritériumok alapján definiáltuk [167, 168].

3.1.3. Placenta TMA (tissue microarray) készítés

Két miliméter átmérőjű core-okat vágunk ki minden szöveti blokkból, és azokat recipiens blokkokba helyeztük. Ezt követően a recipiens blokkokból 5µm vastagságú metszeteket készítettünk és SuperFrost/Plus lemezekre helyeztük. A 37 méhlepényi mintából összesen három TMA lemez készült. Minden lemezre egy májból származó core-t is elhelyeztünk, amely pozicionálás mellett immunfestési kontrolként is szolgált.

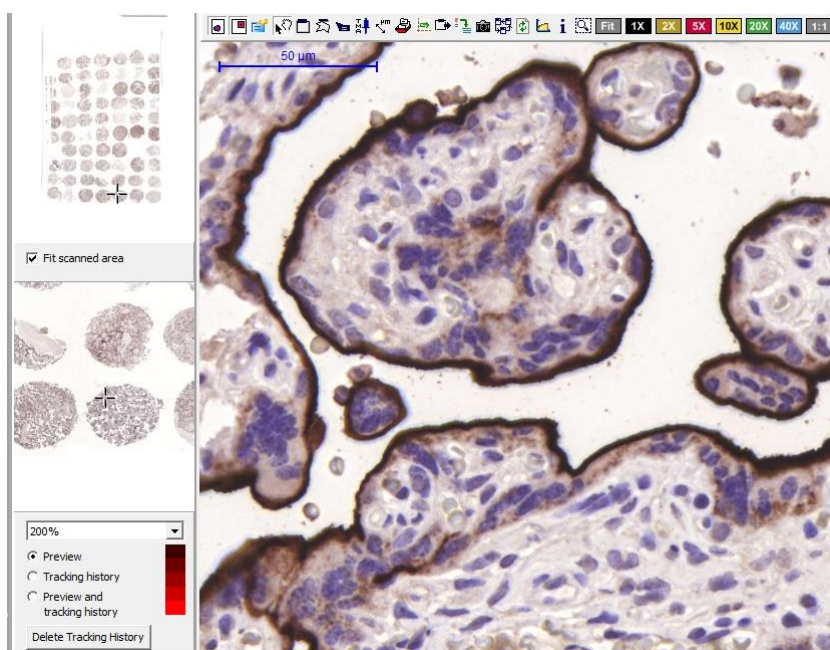
3.1.4. TMA-k immunhisztokémiai vizsgálatai

A TMA lemezeket deparaffináltuk és rehidratáltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 10%-os H₂O₂ kezeléssel gátoltuk, majd az antigén feltárására a TMA lemezeket 10mM Tris és 1mM EDTA (pH=9,0) keverékében 45 percig 100°C-on inkubáltuk. A mosást követően a nem specifikus antitest-kötődést a NovoLink Polymer Detection System pufferével szobahőn 10 percig gátoltuk (Novocastra Laboratories, Newcastle, Egyesült Királyság). Az immunfestést egér monoklonális anti-syndecan-1 antitesttel (MI15 klón; DakoCytomation, Glostrup, Dánia; 1:50; éjszakán át; +4 °C-on) végeztük. A

másodlagos antitesttel történő inkubálás és mosás után (30 perc) kromogénként DAB-ot alkalmaztunk 1:50 hígításban (DAB, Novocastra Laboratories; 1:50), majd háttérfestésre hematoxylint használtunk.

Az immunfestett TMA lemezeket nagyfelbontású szkennerral szkenneltük be (Mirax Scan, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Németország). A syncytiotrophoblast syndecan-1 immunfestődésének értékelését a Panoramic Viewer v1.15 MembraneQuant program (3DHitech Ltd., Budapest) segítségével végeztük, amely program alkalmas arra, hogy digitalizált metszeteken szín, méret és intenzitás alapján megtalálja a sejtmembránokat, és a beállított színskála skála alapján megméri az immunfestés intenzitásuk erősségét (**1. ábra**).

1. ábra. A metszetek digitalizálása és értékelése a Panoramic Viewer 1.15 program segítségével.



Az értékeléshez használt Panoramic Viewer 1.15 program számítógépes felülete. Bal oldalon fent látható egy beszkenelt TMA lemez, ami 70 darab core-t tartalmaz. Bal oldalon lent 2x-es nagyításban látszik néhány core, jobb oldalon pedig 40x-es nagyításban egy core-hoz tartozó chorionbolyhok látszanak. Syndecan-1 immunfestés, kromogén: DAB, háttér: hematoxin.

A felismerési paraméterek beállítása után a MembraneQuant program a 20µm és 150µm átmérőjű chorionbolyhok 85-90%-át megtalálta. A program az immunfestések intenzitásának erősségét minden chorionbolyh esetében egy 0-tól 3-ig

terjedő skálán (0, +1, +2, +3) értékelte. A kapott számadatokat core-onként átlagoltuk, és a kapott pontszámot (immunscore) használtuk reprezentatív adatként az adott core-ra.

A következő lépésben három vizsgáló két különböző módon is értékelte az eredményeket a klinikai adatok ismerete nélkül. Először Axioskop 2 plus light mikroszkóppal, majd pedig szabad szemmel értékelték a metszeteket (Carl Zeiss MicroImaging GmbH), ezt követően pedig a beszkenelt metszeteket számítógépes felületen keresztül is pontozták. A vizsgálók core-onként minimum 25 db, 20-150µm átmérőjű chorionboholy immunreaktivitását pontozták egy négyfokozatú intenzitásskála alapján (0, +1, +2, +3). Az az immunreakció kapott +3 minősítést, ahol intenzív festődést tapasztaltunk, 0-s minősítést pedig akkor adtunk, ha nem volt immunreakció. Az eredményeket core-onként átlagoltuk, a kapott core átlagértékeket először placentánként majd pedig betegcsoportonként átlagoltuk.

3.1.5. *BeWo sejtkultúrák*

A BeWo trophoblast-szerű sejteket (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) F12 tápoldatban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartottuk, amely 10% borjúsérumot és 1% penicillin/streptomycin oldatot is tartalmazott. A sejteket 6-lyukú sejtenyésztő lemezekre (5×10^5 sejt/lyuk) vagy Nunc Lab-Tek II kamrás tárgylemezekre (3×10^5 sejt/lemez) helyeztük (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), majd pedig a következő vizsgálatokat végeztük:

- 1) A trophoblast differenciáció syndecan-1 expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatához a BeWo sejteket cAMP analóg Forskolinnal (25µM, St. Louis, MO, USA) a kontroll sejteket pedig dimetil-szulfoxiddal (DMSO) (Sigma-Aldrich) kezeltük három napig.
- 2) A sérült aktin citoszkeleton syndecan-1 expresszióra és felszabadulásra gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 72 óráig 25µM Forskolinnal kezeltük, a 60-72-ik órában pedig a minták feléhez 25µM Latrunculint adtunk, ami gátolja a citoszkeleton működését [169].
- 3) Az ischaemiás stressz syndecan-1 expresszióra és felszabadulásra gyakorolt hatását a következőképpen vizsgáltuk: BeWo sejteket 25µM Forskolinnal kezeltünk három napig, majd a minták felét 20%-os parciális oxigén nyomáson, a másik felét pedig változó

parciális oxigén nyomáson tartottuk (6 óráig 20%-on majd 6 óráig 1%-on; 4 ciklusban) OxyCycler C42-ben (Biospherix Ltd., Lacona, NY, USA) a 48-72-ik órában.

3.1.6. RNS izolálás, cDNS készítés, kvantitatív real-time reverz transzkripció PCR (qRT-PCR)

A 6-lyukú sejttenyésztő lemezekben lévő sejtekből teljes RNS-t izoláltunk az RNeasy Mini Kit és RNase Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével. Az RNS koncentráció a NanoDrop1000 spektrofotométerrel lett megmérve. A teljes RNS (500ng) reverz transzkripciója a SuperScript® III First-Strand Synthesis system (Invitrogen) használatával történt. TaqMan próbát (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) használtunk az *SDC1* (Hs00896423_m1) és *RPLP0* (riboszómális foszfo-protein P0, endogén kontroll; 4326314E) génexpresszió meghatározásához ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) segítségével.

3.1.7. Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia

A 6-lyukú sejttenyésztő edényekben lévő sejteket 4% paraformaldehiddel (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) fixáltuk, ezt követően fehérje blokkolót (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) használtunk, majd pedig egér monoklonális anti-humán syndecan-1 antitesttel (MI15 klón; 5µg/ml; Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA) inkubáltunk egy éjszakán át 4°C-on. Másnap a sejteket többször is átmostuk, ezt követően pedig PBS-ben 1:1,000-hez hígított, Alexa Fluor 488 kapcsolt kecske anti-egér IgG-vel (Invitrogen) inkubáltuk, melyhez 10% normál kecske szérumot is adtunk (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA). A sejtek ProLong Gold reagenssel és 4',6-diamidino-2-fenilindol-lal (DAPI; Invitrogen) lettek kezelve, majd Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóppal lettek értékelve (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, USA).

3.1.8. Syndecan-1 immunoassay a vérmintákból és BeWo sejtkultúrából

A 6-lyukú lemezekben lévő sejtkultúrák felülszóját minden nap begyűjtöttük és immunoassay vizsgálatnak vetettük alá. Hasonlóképpen mint az anyai szérumból, a sejtkultúrák felülszójából is ELISA-val mértük a syndecan-1 koncentrációját. Ehhez a

vizsgálathoz a humán syndecan-1 ELISA Kit-et (Cell Sciences, Canton, MA, USA) használtuk a gyártó instrukciói alapján. Az assay detekciós érzékenysége <2,56 ng/ml volt, az intra-assay variációs koefficiens 7,6%, az inter-assay variációs koefficiens 6,8% volt.

3.1.9. Statisztikai elemzések

A demográfiai és klinikai adatokat az SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statisztikai szoftverrel elemeztük. A betegcsoportok közötti összehasonlításokat megoszlások tekintetében a Chi-négyzet próbával és Fischer-tesztel elemeztük. A Kruskal-Wallis és Mann-Whitney tesztek a nem normális eloszlású folytonos változókhoz, a t-tesztet pedig a normál eloszlású folytonos változókhoz használtuk. Az anyai szérum syndecan-1 koncentráció és a klinikai/demográfiai adatok korrelációjának meghatározásához Pearson-féle korrelációs együttható számítást használtuk, az elemzéseket az R statisztikai program segítségével (www.r-project.org) végeztük. Lineáris modell használatával elemeztük az anyai szérum syndecan-1 koncentrációban a különbségeket a különböző vizsgálati csoportokban, miután az eredményeket adjusztáltuk a terhességi korrall és a születési súllyal. A szignifikancia szintet 5%-ra állítottuk be.

3.2. A kináz-útvonalak vizsgálatai

3.2.1. *Beteganyag, klinikai minták és definíciók*

A beteganyag, klinikai minták és definíciók megegyeztek a syndecan-1 vizsgálatánál leírtakkal a 3.1.1. bekezdés szerint.

3.2.2. *A méhlepények szövettani vizsgálatai*

A szövettani vizsgálat megegyezett a syndecan-1 vizsgálatánál leírtakkal a 3.1.2. bekezdés szerint.

3.2.3. *Placenta TMA készítés*

A TMA készítés megegyezett a syndecan-1 vizsgálatánál leírtakkal a 3.1.3. bekezdés szerint.

3.2.4. *TMA-k immunhisztokémiai vizsgálatai*

A TMA lemezekből 5µm vastagságú metszeteket készítettünk és SuperFrost/Plus lemezekre helyeztünk. A TMA lemezeket ezt követően deparaffináltuk és rehidratáltuk. Az endogén peroxidázt 20 percig 10%-os H₂O₂-vel gátoltuk, majd az antigén feltárására a lemezeket 10mM Tris és 1mM EDTA (pH=9,0) keverékében 100°C-on 45 percig inkubáltuk. A mosást követően a nem specifikus antitest-kötődést a NovoLink™ Polymer Detection System pufferével szobahőn 10 percig gátoltuk (Novocastra). A lemezeket a **3. táblázatban** bemutatott antitestekkel, a megadott kísérletes paraméterekkel inkubáltuk (**3. táblázat**).

3. táblázat. Az immunfestéshez használt ellenanyagok.

Elsődleges antitest	Forgalmazó	Típusa	Hígítás	Inkubálási idő
Foszfo-Akt-1	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Nyúl monoklonális (C31E5E)	1:800	éjszakán át 4°C-on
Foszfo-JNK	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Nyúl poliklonális	1:25	éjszakán át 4°C-on
Foszfo-Erk1/2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Nyúl monoklonális (D13.14.4E)	1:200	éjszakán át 4°C-on
Foszfo-p38	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Nyúl monoklonális (12F8)	1:100	éjszakán át 4°C-on

ERK 1/2: Extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2

JNK: c-Jun N-terminális kináz

p38: Mitogén aktivált protein kináz 14

Akt-1: Protein kináz B

A TMA lemezeket éjszakán át a megadott antitesttel 4°C-on inkubáltuk. Másnap tris-pufferelt sóval (TBST) történő mosást követően a lemezeket Novolink postprimary blokkoló anyaggal 30 percig kezeltük. Ezután peroxidáz-konjugált polimerhez kapcsolt anti-nyúl/anti-egér IgG másodlagos ellenanyagokkal 30 percig, nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezeket. Öblítés után kromogénként DAB-ot alkalmaztunk 1:20-as hígításban. Az előhívást mikroszkóp alatt végeztük. Sejtmagfestésre hematoxilint használtunk, majd alkohol-aceton-xilol sorban víztelenítettünk, végül hagyományos módon kanadabalzsammal és fedőlemezzel fedtük le a lemezeket.

A metszeteket ezek után digitálisan szkenneltük (Pannoramic Scan, 3DHistech Kft.), a továbbiakban pedig már a digitalizált tárgylemezeket a Pannoramic Viewer 1.15 digitális mikroszkópos program használatával értékeltük. Az értékelést két független vizsgáló végezte a mintákhoz tartozó klinikai adatok ismerete nélkül. A vizsgálók core-onként minimum 25 db, 20-150µm átmérőjű chorionbolyhot értékelték, meghatározva azok immunreaktivitását egy négyfokozatú intenzitásskála alapján (0, +1, +2, +3). Az a reakció kapott +3 minősítést, ahol intenzív festődést tapasztaltunk, 0-s minősítést

adtunk, ha nem volt immunreakció. Az eredményeket core-onként átlagoltuk. A kapott értékeket méhlepényenként majd betegcsoportonként átlagoltuk.

3.2.5. *Elsődleges trophoblast kultúrák*

Elsődleges cytotrophoblast sejteket terminusban szülő egészséges nőktől származó méhlepényekből izoláltunk a Kliman és munkatársai által leírt módszer [170] alkalmazásával (n=4). Minden méhlepényből körülbelül 100g mennyiségű boholszövetet vágunk ki, melyet darabolás és mosás után 90 percig 37°C-on emésztettünk 0,25% tripszint (Invitrogen) és 60U/ml DNA-z I-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó oldatban. Ezt követően a szétvált sejteket 100µm pórusméretű nylon szűrőn átszűrtük (BD Biosciences, San Jose, CA). A vörösvérsejteket ammónium-klorid pufferben lizáltuk (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Kanada), mosás után pedig 0-50%-os Percoll grádienses centrifugálást végeztünk 20 percig 1200g-n. Negatív szelekciós módszert alkalmaztunk a nem trophoblast sejtek kiszűrésére, melynek során anti-CD14 (20µg/ml) és anti-CD9 (20µg/ml) egér monoklonális antitestekkel (R&D CA, USA), majd pedig MACS anti-egér IgG antitestekkel (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) inkubáltuk azokat. Az izolált elsődleges trophoblast sejteket kollagénnel bevont 12-lyukú sejtenyésztő lemezre tettük, és 7 napig tartottuk Iscove's modified Dulbecco's (Invitrogen) tápoldatban, ami 10% borjúsérumot, 5% humán sérumot és 1% penicillin/streptomycin oldatot is tartalmazott. A génexpressziós vizsgálatokhoz a totál RNS-t minden nap izoláltuk. Minden vizsgálatot háromszor végeztünk.

3.2.6. *BeWo sejtkultúrák*

A BeWo sejteket 6-lyukú sejtenyésztő lemezre tettük (5×10^5 sejt/lyuk), és F12 medium tápoldatban (Invitrogen) tartottuk, ami 10% borjúsérumot és 1% penicillin/streptomycin oldatot is tartalmazott. A differenciációs vizsgálatokhoz a BeWo sejteket vagy cAMP analóg Forskolinnal (25µM), vagy kontrollként DMSO-val (Sigma-Aldrich) kezeltük 96 óráig, majd a génexpressziós vizsgálatokhoz totál RNS-t izoláltunk. A kináz-útvonalak vizsgálatához a BeWo sejteket 25µM Forskolinnal kezeltük 36 órán át, majd a következő 24 órára négy csoportra osztottuk a sejteket, és négy különböző kezelésnek tettük ki őket: 1) ennél a kezelésnél az oxigén parciális nyomása normális (20% O₂), a továbbiakban normoxiás kezelésnek nevezzük, 2)

hypoxiás kezelés (2% O₂), 3) ischaemiás kezelés (1% és 20% O₂ kezelés felváltva 6 óránként Oxycycler C42 használatával), illetve 4) 10 ng/ml IL1 β kezelés normoxiás körülmények mellett. Különböző kináz-inhibitorokat is alkalmaztunk, melyeknek koncentrációi a **4. táblázatban** láthatók. A kezelések után a BeWo sejteket lizáltuk, majd pedig totál RNS-t vagy totál fehérjét izoláltunk. Minden vizsgálatot háromszor végeztünk.

4. táblázat. Kináz-inhibitorok

Kináz	Inhibitor	Forgalmazó	Alkalmazott koncentráció
ERK1/2	U0126	Abcam, Cambridge, MA, USA	10 μ M
JNK	SP600125	Abcam, Cambridge, MA, USA	25 μ M
p38 α	SB203580	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	10 μ M
Akt-1	Triciribine	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	20 μ M

ERK1/2: Extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2

JNK: c-Jun N-terminális kináz

p38: Mitogén aktivált protein kináz 14

Akt-1: Protein kináz B

3.2.7. RNS izolálás, cDNS készítés, (qRT-PCR)

A BeWo sejtekből és az elsődleges trophoblast sejtekből Qiagen RNeasy kit (Qiagen) használatával teljes RNS-t izoláltunk a gyártó instrukció szerint. Az RNS mennyiségi analizisét NanoDrop1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) spektrofotométerrel végeztük. A minőségi elemzést a normális 28S/18S riboszómális RNS csíkok kimutatásával Agilent Bioanalyzer 2100 segítségével végeztük. A teljes RNS (500ng) reverz transzkripciója a SuperScript III First-Strand Synthesis system (Invitrogen) és oligo(dT) primerek felhasználásával (Invitrogen) történt. Az **5. táblázatban** feltüntetett Taqman próbákat használtuk a génexpressziós profil elkészítéséhez, melyeket a Biomark qRT-PCR system (Fluidigm) segítségével futtattunk a gyártó instrukciói alapján.

5. Táblázat. A génexpressziós profil elkészítéséhez használt TaqMan próbák

Gén	A fehérje neve	Próba ID
<i>FLT1</i>	fms-related tirozin-kináz-1	Hs01052961_m1
<i>GCM1</i>	glial cells missing homolog 1 (Drosophila)	Hs00961601_m1
<i>LEP</i>	Leptin	Hs00174877_m1
<i>PGF</i>	placentáris növekedési faktor	Hs00182176_m1
<i>RPLP0</i>	riboszómális foszfo-protein P0 (belső kontroll)	Hs99999902_m1

3.2.8. Fehérje izoláció és foszfo-kináz assay

A BeWo sejteket 120 μ L lízis pufferrel (50mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl; 1% NP40; 5mM EDTA) homogenizáltuk, majd pedig egy órán át jégen inkubáltuk. A homogenizátumot 15 percig 10.000 rpm-en centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk, és abban BCA assay (Thermo Scientific) segítségével megmértük a teljes fehérjetartalmat. A Proteome Profiler 96 Human Phospho-RTK Array 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nem kompetitív szendvics immunoassay-t használtuk, hogy 96 lyukú lemezen minden mintájában egyszerre tudjuk detektálni a pAkt-1, pERK 1/2, pJNK és a pp38 kinázokat a gyártó ajánlása szerint. Három óra inkubáció után a kemilumineszcenciás jeleket Fujifilm LAS-4000 Cooled CCD Camera Gel Documentation System (Fujifilm North America Corp., Valhalla, NY, USA) használatával értékeltük.

3.2.9. Statisztikai módszerek

A demográfiai és klinikai adatokat az SPSS 12.0 (SPSS Inc.) statisztikai szoftverrel elemeztük. A betegcsoportok közötti összehasonlításokat megoszlások tekintetében a Chi-négyzet próbával és Fischer-teszttel elemeztük. A Kruskal-Wallis és Mann-Whitney tesztek a nem normális eloszlású folytonos változókhoz, a t-tesztet pedig a normál eloszlású folytonos változókhoz használtuk. Minden egyéb adatot az R statisztikai programmal elemeztünk (www.r-project.org).

A qRT-PCR adatok vizsgálatához a gén expressziókat a belső kontrollként használt *RPLP0* gén expressziójához viszonyítottuk. A $\Delta\Delta C_t$ módszert használtuk a génexpresszió változások nagyságának, t-tesztet pedig a különbségek

szignifikanciájának megállapításához. A szignifikancia szintet $p=0,05$ -re állítottuk be. A Proteome Profiler adatok analízisének először a nyers kemilumineszcenciás jelekből kivontuk a háttér jeleket, majd pedig ezen adjusztált kemilumineszcenciás jelek adatait logaritmizáltuk, és belőlük a belső kontrollként használt 60 kDa-os hősokkfehérje (HSP60) logaritmizált jelértékeit kivontuk. A becsült átlag $\pm$ standard hiba (SE) értékeket összegeztük, és t-tesztet (p értékek) majd fals találati arány (FDR) számítást (q értékek) használtunk a szignifikancia szintek számolásához. A szignifikancia szintet $q=0,1$ -re állítottuk be.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A syndecan-1 vizsgálatainak eredményei

4.1.1. Demográfiai és klinikai adatok

A demográfiai és klinikai adatok az **1. táblázatban** láthatóak. A szisztolés és diasztolés csúcs vérnyomás-értékek egyaránt magasabbak voltak minden betegcsoportban a kontrollokhoz képest. Proteinuria minden esetben előfordult a betegeknél, a kontrolloknál viszont nem volt jelen. A vizsgálatba bevont várandósokat terhességi kor alapján párosítottuk. Az átlag terhességi kor ennek megfelelően a korai kontroll és a korai betegcsoportokban nem különbözött, a késői kontroll és a késői praeclampsias csoportok között kis különbség adódott csak. Az újszülöttek születési súlya szignifikánsan alacsonyabb volt a késői praeclampsias csoportban, mint a késői kontrolloknál, és alacsonyabb volt, bár nem szignifikánsan, korai praeclampsiasban és HELLP szindrómában a korai kontrollokhoz képest.

4.1.2. Syndecan-1 expresszió és villosus trophoblast differenciáció

Először megvizsgáltuk a késői kontroll csoportba tartozó méhlepényeket, ahol a syndecan-1 immunfestődése a syncytiotrophoblast apikális membránjában granuláris jellegű volt. Az immunopozitív granulomok a syncytiotrophoblast citoplazmájában is megfigyelhetők voltak. A chorionbolyhokban ugyanakkor nem volt festődés a cytotrophoblastokban vagy egyéb más típusú sejtekben (**2A ábra**). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a syndecan-1 expresszió függ a villosus trophoblast differenciációjától.

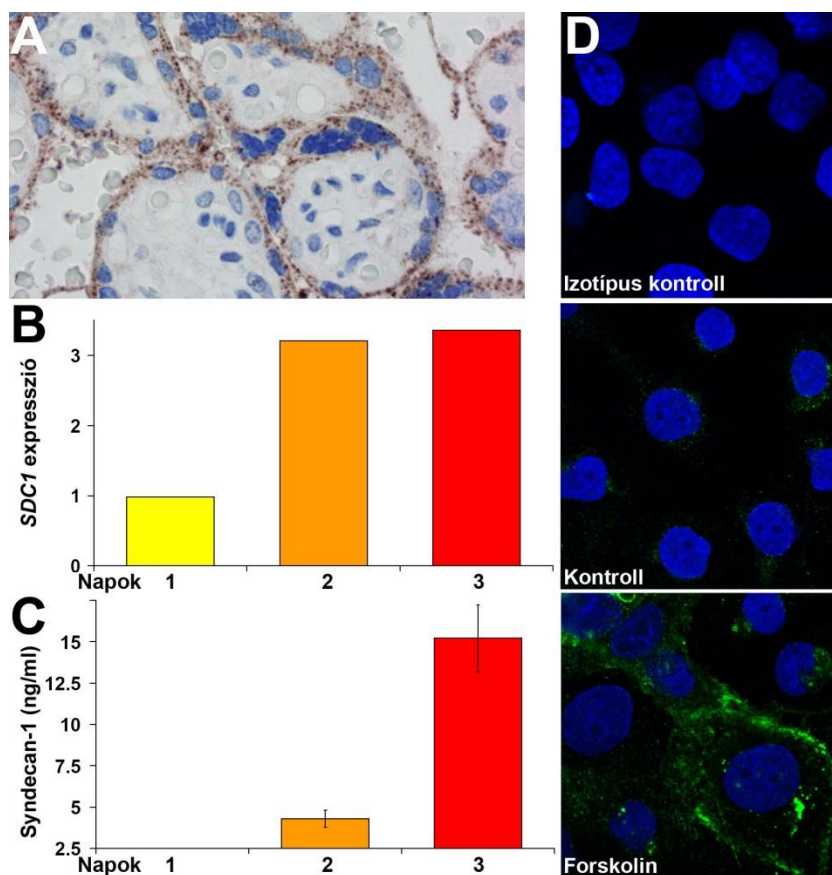
Ezt a jelenséget modelleztük *in vitro* körülmények között BeWo trophoblast-szerű sejtekkel, melyek a syncytiotrophoblast kialakítására képesek cAMP indukálta sejtdifferenciáció során. A Forskolinnal kezelt BeWo sejtek a morfológiai és biokémiai differenciáció folyamata alatt egyre növekvő mennyiségben expresszálták az *SCD1*-et: 1. nap nem volt változás, 2. nap 3,2-szeres emelkedés volt megfigyelhető ($p=8,3 \times 10^{-4}$), 3. nap pedig 3,4-szeres emelkedés volt detektálható ($p=5,3 \times 10^{-5}$) (**2B ábra**).

A differenciálódó és syncytiotrophoblastot kialakító BeWo sejtkultúrák felülúszójában a syndecan-1 koncentráció szignifikánsan magasabb volt a 2. napon

($4,3 \pm 0,5$ ng/ml, $p=0,028$) és a 3. napon ($15,2 \pm 2,0$ ng/ml, $p=0,008$), mint az 1. napon (a detektálási minimum, 2,56 ng/ml, alatt volt) (**2C ábra**).

Összehasonlítva a nem kezelt BeWo sejtekkel, a Forskolinnal kezeltknél, főleg a fúzionált, többmagvú sejteknél a syndecan-1 erős sejtmembrán festődést mutatott a 3. napon. A chorionbolyhokban talált festődésekhez hasonlóan a BeWo sejtek syndecan-1 festődése is granuláris jellegű volt a sejtmembránban és a citoplazmában (**2D ábra**).

2. ábra. A syndecan-1 expresszió a villosus trophoblast differenciációjától függ.



A) A késői kontroll placentákban lineáris, granuláris jellegű syndecan-1 festődés látható a syncytiotrophoblast apikális membránján. Emellett immunopozitivitás a syncytiotrophoblast citoplazmában is megfigyelhető. A chorionbolygó más sejtjeiben nincs syndecan-1 festődés (hematoxilin háttérfestés, 400x nagyítás). **B)** *SDC1* génexpresszió szignifikánsan emelkedik a differenciáció második napjától kezdve a Forskolinnal kezelt BeWo sejtekben (2. nap: 3,2-szeres növekedés, $p=8,3 \times 10^{-4}$; 3. nap: 3,4-szeres növekedés, $p=5,3 \times 10^{-5}$). **C)** A syndecan-1 koncentráció szignifikánsan emelkedik a sejt kultúrák felülszójában a differenciáció második napjától kezdve a Forskolinnal kezelt BeWo sejtekben (2. nap: 4,3ng/ml, $p=0,028$; 3. nap: 15,2ng/ml, $p=0,008$). **D)** A Forskolinnal kezelt BeWo sejtekben erősebb syndecan-1 sejtmembrán festődés látszik a 3. napon a kezeletlen sejtekhez képest. A granuláris jellegű membrán és citoplazmatikus syndecan-1 festődés szintén megfigyelhető a BeWo sejtekben is (DAPI háttérfestés, 1500x nagyítás).

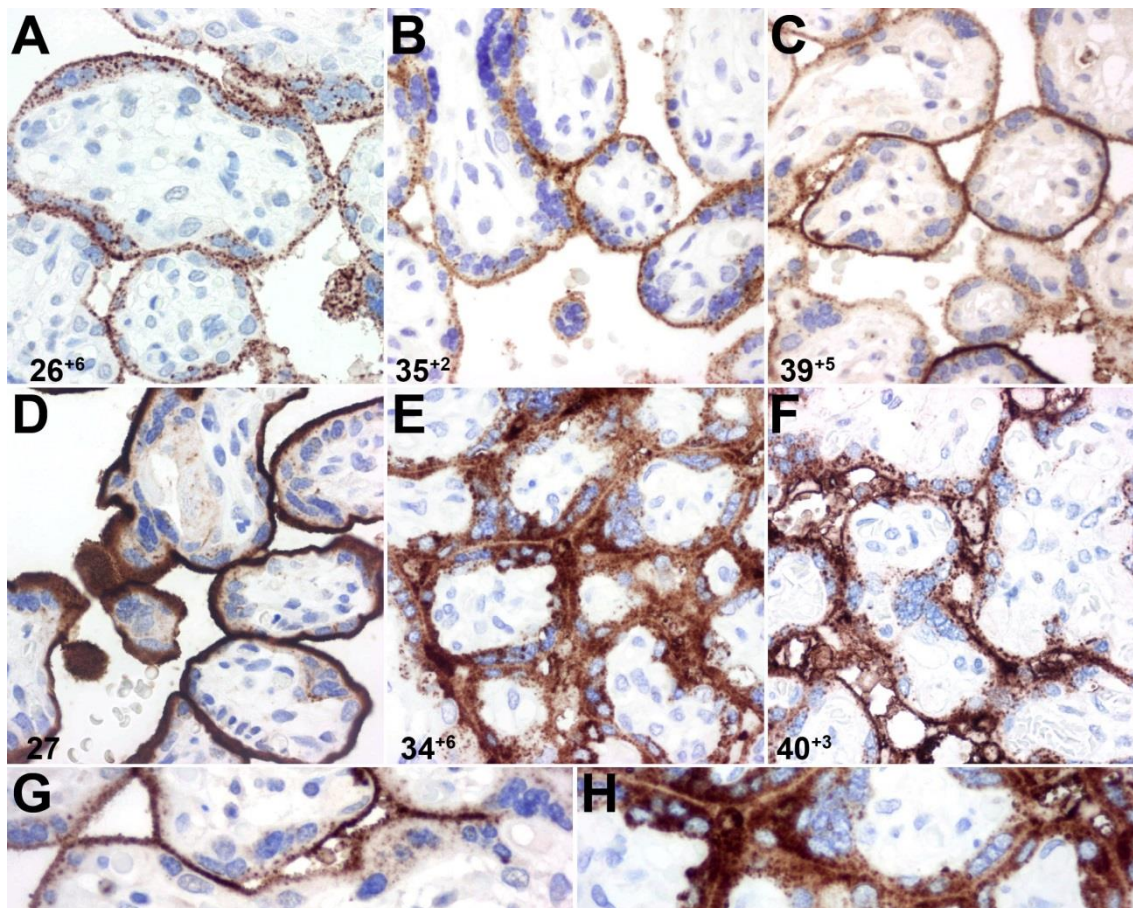
4.1.3. *Placentáris syndecan-1 mRNS expresszió praeeklampsziában*

Egyes korábbi nézetek szerint a villosus trophoblast differenciáció károsodása játszhat szerepet a praeeklampsia kialakulásában [133]. Mivel a syndecan-1 expressziója a villosus trophoblast differenciációjával kapcsolt folyamat, ezért újra vizsgáltuk korábbi microarray adatsorunkat az *SDC1* gén expresszió változását illetően korai praeeklampsia eseteiben. Érdekes módon nem találtunk szignifikáns eltérést a lepényi *SDC1* expressziójában sem korai praeeklampsziában (1,56-szoros csökkenés $p=0,65$), sem pedig HELLP szindrómában (1,43-szoros csökkenés, $p=0,74$) a korai kontrollokhoz képest.

4.1.4. *A syndecan-1 immunfestődése a méhlepényben praeeklampsziában és HELLP szindrómában*

Ezek után a placentáris syndecan-1 szintézis változásait fehérje szinten is megvizsgáltuk a különböző betegcsoportokban. A legnagyobb immunfestődési különbséget a korai praeeklampsziás betegeknel találtuk, ahol a syncytiotrophoblast citoplazmájában erős volt az immunreakció, de a syncytiotrophoblast apikális membránjában sok esetben negatív volt az immunfestődés. Hasonló eredményeket kaptunk a késői praeeklampsziás eseteknél is, bár az immunreakció erőssége kicsit gyengébb volt. A HELLP szindrómás betegeknel a syncytiotrophoblast apikális membránja erős lineáris festődést mutatott (**3. ábra**). Az egyes betegcsoportokban az esetek 29-55%-ban annak jelét is láttuk, hogy a syndecan-1 a syncytiotrophoblastból az intervillousus úrbe kerül ki, leginkább korai praeeklampsziánál és HELLP szindrómánál (**3. ábra**).

3. ábra. A placentáris syndecan-1 immunfestődés erősebb praeclampsziában és HELLP szindrómában a kontrollokhöz képest.



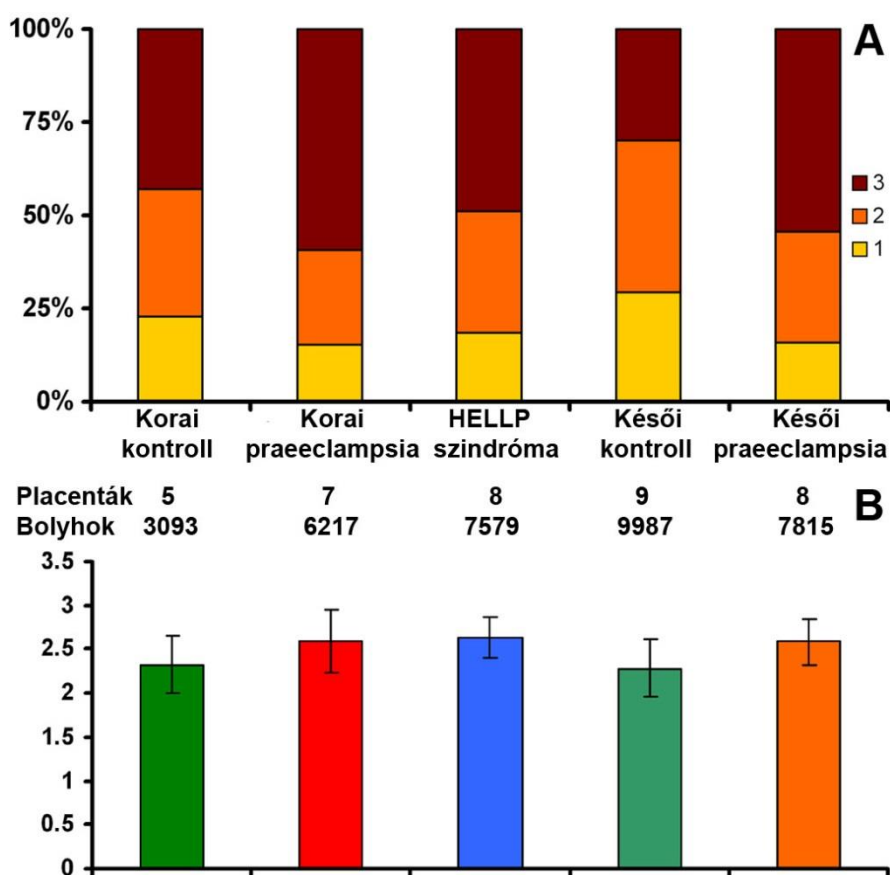
A-C) A syndecan-1 immunfestődés hasonló a korai kontroll (**A:** terhességi hét 26⁺⁶, **B:** terhességi hét 35⁺²) és késői kontroll csoportokban (**C:** terhességi hét 39⁺⁵). Lineáris, granuláris jellegű syndecan-1 immunfestődés látható a syncytiotrophoblast apikális membránján, valamint a citoplazmában is. **D)** HELLP szindrómában (terhességi hét 27) a syncytiotrophoblast apikális membránja lineáris immunpozitivitást mutat. **E)** Korai praeclampsziában (terhességi hét 34⁺⁶) a syncytiotrophoblast citoplazmájában erős immunreakció látható. Néhány helyen a syncytiotrophoblast apikális membrán festődése negatív. **F)** Hasonló, de kevésbé intenzív apikális membrán és citoplazmáris syndecan-1 immunfestődést látunk késői praeclampsziában (terhességi hét 40⁺³). A syncytiotrophoblast apikális membránja nagy nagyításon a késői kontroll mintákban (**G**) és a korai praeclampsziás mintákban (**H**). Hematoxilin háttérfestés, 400x (**A-F**) vagy 600x (**G-H**) nagyítás.

A beszkenelt TMA-k placentáris syndecan-1 immunfestődésének objektív kiértékeléséhez az újonnan kifejlesztett Pannoramic Viewer v1.15 MembraneQuant programját használtuk és a következő eredményeket kaptuk:

1) A syndecan-1 immunfestődés nem változik a terhességi korrall, a korai (2,33±0,33) és a késői (2,29±0,33) kontroll csoportban is hasonló átlag pontszámokat (immunscore)

kaptunk ($p=0,66$); 2) A syndecan-1 immunreakció erősebb volt késői praeclampsziában ($2,59\pm 0,26$, $p=0,0001$) mint a késői kontroll csoportban ($2,29\pm 0,33$); 3) A syndecan-1 immunreakció erősebb volt HELLP szindrómában ($2,63\pm 0,23$, $p=0,02$) mint a korai kontroll csoportban ($2,33\pm 0,33$); és 4) A syndecan-1 immunreakció erősebb volt korai praeclampsziában ($2,59\pm 0,36$, $p=0,02$) mint a korai kontroll csoportban ($2,33\pm 0,33$) (4. ábra).

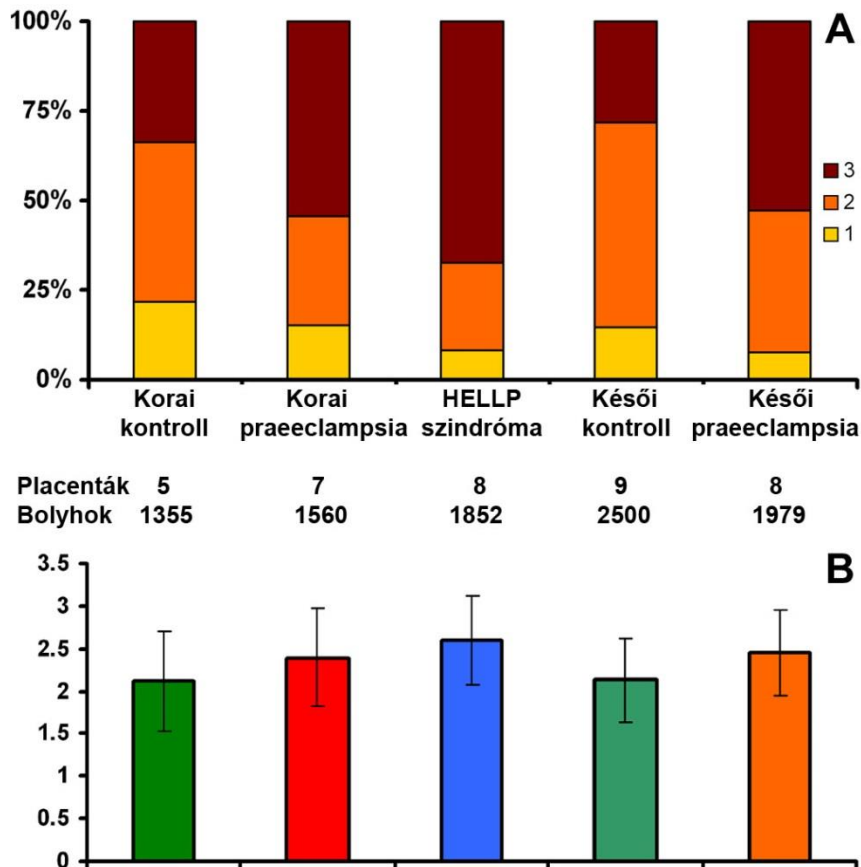
4. ábra. A placentáris syndecan-1 immunfestődésének kiértékelése a MembraneQuant programmal



A) Minden betegcsoportban nagyobb arányban vannak jelen a +3 minősítést kapott chorionbolyhok, mint a hozzájuk tartozó kontroll csoportokban. A vizsgált méhlepények és az értékelt chorionbolyhok darabszámait az oszlopdiagram alatt láthatóak. **B)** Az oszlopdiagram a chorionbolyhok immunfestődésének átlag pontszámait mutatja a különböző beteg és kontroll csoportokban (átlag±szórás). A syndecan-1 immunfestődés a terhességi korról nem változik (korai kontrollok: $2,33\pm 0,33$ és késői kontrollok: $2,29\pm 0,33$, $p=0,66$). A syndecan-1 immunfestődés erősebb a HELLP szindrómás betegek méhlepényeiben ($2,63\pm 0,23$, $p=0,02$) és korai praeclampsziás betegek méhlepényeiben ($2,59\pm 0,36$, $p=0,02$), mint a korai kontroll csoport méhlepényeiben ($2,33\pm 0,33$). Emellett a syndecan-1 immunfestődés erősebb késői praeclampsziás betegek méhlepényeiben ($2,59\pm 0,26$, $p=0,0001$), mint a késői kontroll csoport méhlepényeiben ($2,29\pm 0,33$).

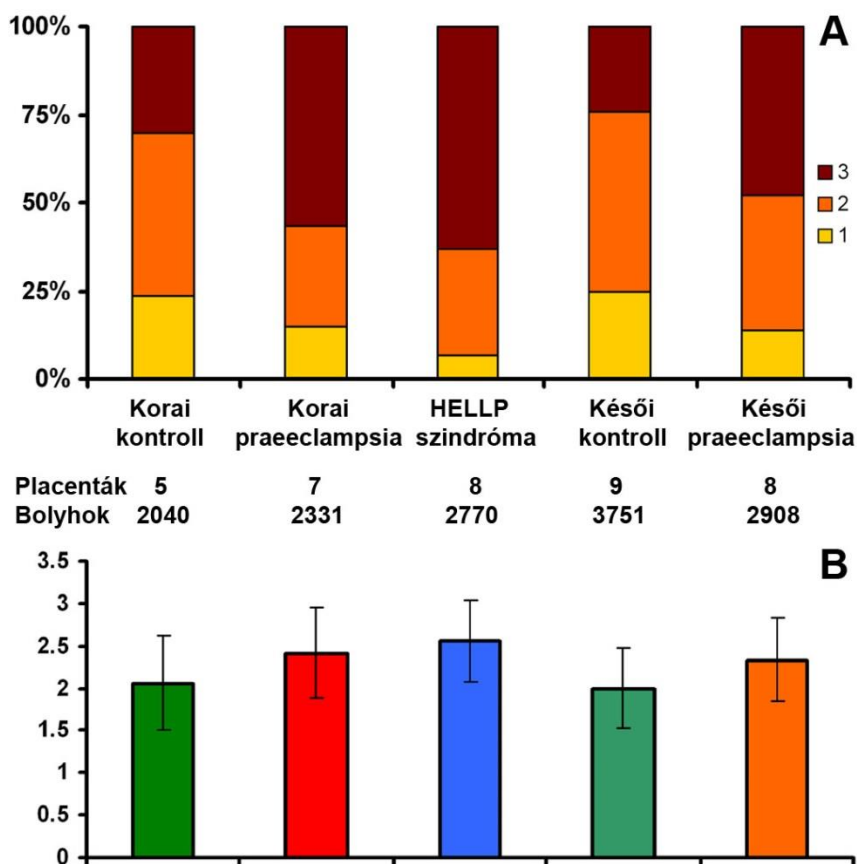
A TMA-kat mikroszkóposan és virtuálisan, a Panoramic Viewer 1.15. program felületén szabad szemmel is értékeltük (5-6. ábra). A MembraneQuant kiértékelő program eredményeihez hasonló eredményeket kaptunk.

5. ábra. A placentáris syndecan-1 immunfestődés mikroszkópos értékelése



A) Minden betegcsoportban nagyobb arányban vannak jelen a +3 minősítést kapott chorionbolyhok, mint a hozzájuk tartozó kontroll csoportokban. A vizsgált méhlepények és az értékelt chorionbolyhok darabszámai az oszlopdiagram alatt láthatóak. **B)** A syndecan-1 immunfestődés a terhességi korról nem változott (korai kontroll: $2,12 \pm 0,59$ és késői kontroll: $2,13 \pm 0,49$, $p=0,93$). A syndecan-1 immunfestődés értéke magasabb a HELLP szindrómás terhesek méhlepényeiben ($2,59 \pm 0,52$, $p=0,009$), mint a korai kontroll méhlepényekben ($2,12 \pm 0,59$), és magasabb késői praeeclapsiások méhlepényében ($2,45 \pm 0,51$, $p=0,02$), mint a késői kontroll csoport méhlepényeiben ($2,13 \pm 0,49$). A syndecan-1 immunfestődés értéke emelkedő tendenciát mutat korai praeeclapsiások méhlepényében ($2,39 \pm 0,58$, $p=0,33$) a korai kontroll méhlepényekhez képest.

6. ábra. A placentáris syndecan-1 immunfestődés virtuális mikroszkópos értékelése.



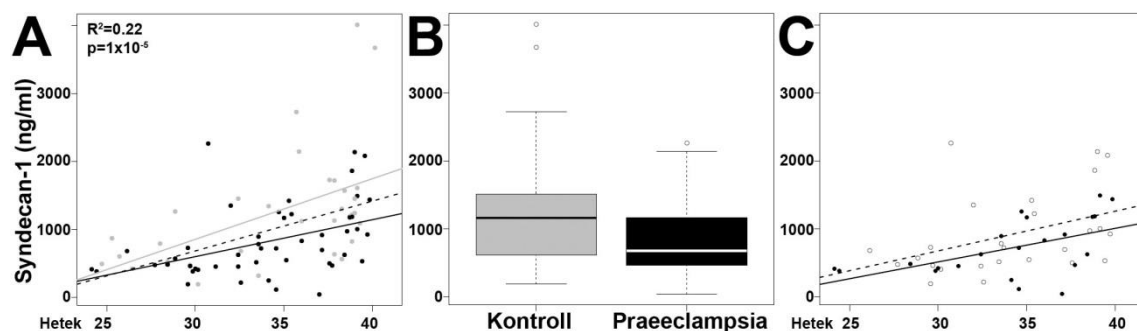
A) Minden betegcsoportban nagyobb arányban vannak jelen a +3 minősítést kapott chorionbolyhok, mint a hozzájuk tartozó kontroll csoportokban. A vizsgált méhlepények és az értékelt chorionbolyhok darabszámai az oszlopdiagram alatt láthatóak. **B)** A syndecan-1 immunfestődés a terhességi korrallal nem változik (korai kontroll: $2,06 \pm 0,56$ és késői kontroll: $1,99 \pm 0,47$, $p=0,6$). A syndecan-1 immunfestődés értéke magasabb a HELLP szindrómások méhlepényeiben ($2,56 \pm 0,48$, $p=0,003$), mint a korai kontrollok méhlepényeiben ($2,06 \pm 0,56$), és magasabb késői preeclampsziások méhlepényeiben ($2,33 \pm 0,49$, $p=0,01$), mint a késői kontroll méhlepényekben ($1,99 \pm 0,47$). A syndecan-1 immunfestődés értéke emelkedő tendenciát mutat a korai preeclampsziások méhlepényében ($2,42 \pm 0,53$, $p=0,08$) a korai kontroll méhlepényekhez képest.

4.1.5. A syndecan-1 koncentrációja az anyai szérumban preeclampsziában

Az anyai szérumban a syndecan-1 koncentráció pozitív korrelációt mutatott a születési súllyal ($R^2=0,25$, $p=1,7 \times 10^{-6}$) és a terhességi korrallal ($R^2=0,22$, $p=1 \times 10^{-5}$) (7A ábra), negatívan korrelált viszont az artériás középnyomás értékkel ($R^2=0,08$, $p=0,012$) és a fehérjeürítéssel ($R^2=0,06$, $p=0,039$). A preeclampsziás betegekben az anyai szérumban syndecan-1 koncentráció alacsonyabb volt (középérték: 673 ng/ml, IQR: 459-1161

ng/ml) mint a kontroll csoportban (középérték: 1158 ng/ml, IQR: 622-1480 ng/ml) **(7B ábra)** azután is, hogy az eredményeket adjusztáltuk a születési súlyra és a terhességi korra ($p=0,03$). Nem volt különbség a szérumban syndecan-1 koncentrációban a praeclampsziás betegek csoportján belül a HELLP szindróma tüneteit nem mutató betegek (középérték: 718 ng/ml, IQR: 460-1168 ng/ml) és a HELLP szindróma tüneteit mutató betegek (középérték: 546 ng/ml, IQR: 413-721 ng/ml) között. Az alacsonyabb szérumban syndecan-1 szintek nem a terhességi korhoz képest kis súlyú (SGA) újszülöttek kiviselésével kapcsolatosak, mert az anyai szérumban syndecan-1 szint nem változott praeclampszián belül az SGA-val szövődött (középérték: 703 ng/ml, IQR: 497-1220 ng/ml) és az SGA szövődmény nélküli (középérték: 617 ng/ml, IQR: 411-1035 ng/ml; $p=0,2$) csoportban **(7C ábra)**.

7. ábra. Az anyai szérumban syndecan-1 koncentráció praeclampsziában alacsonyabb, mint a kontroll csoportban.



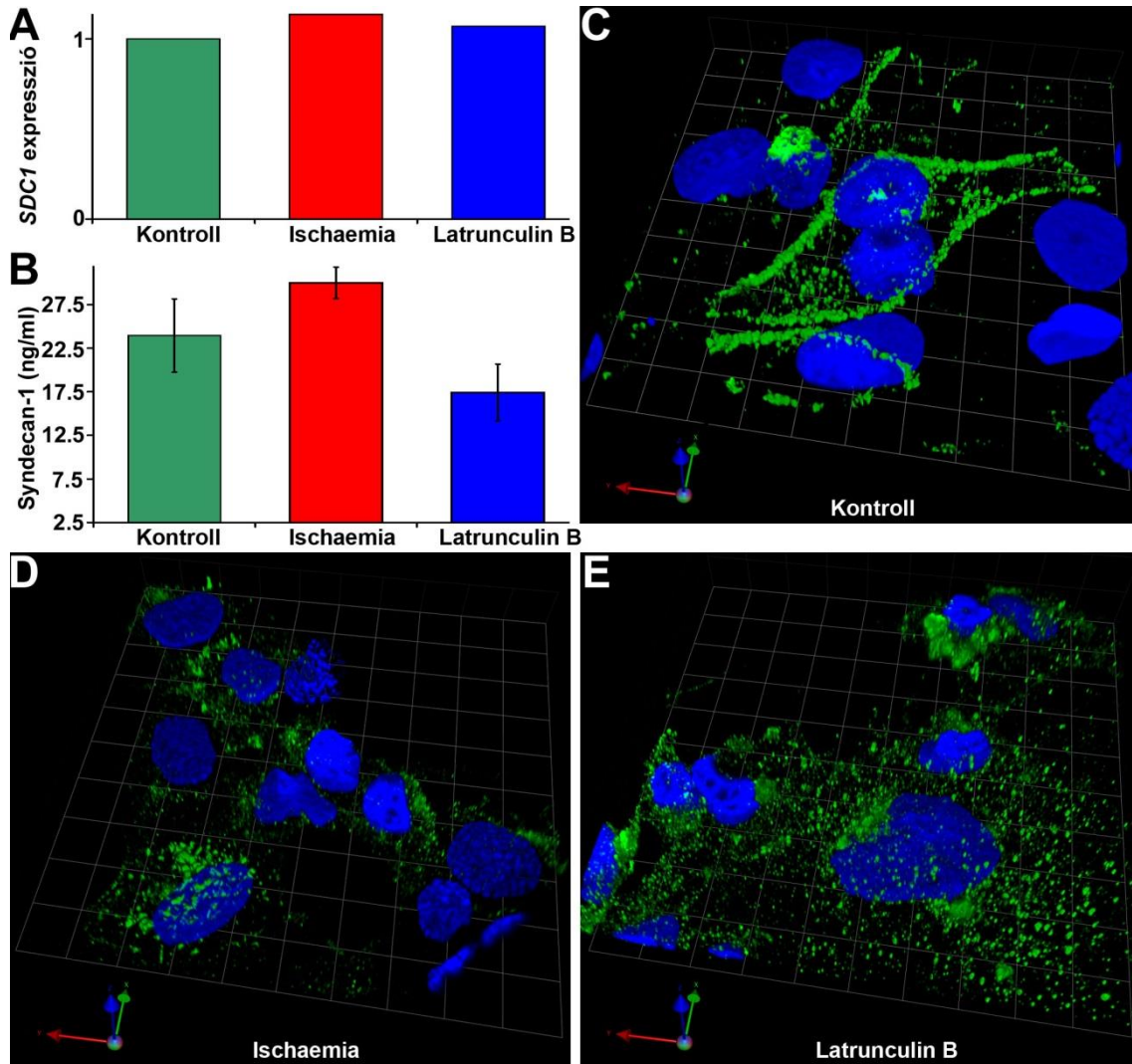
A) Az anyai szérumban syndecan-1 koncentráció minden csoportban korrelál a terhességi korrall (szürke: kontroll, fekete: praeclampsia; a regressziós vonalakat a kontroll (szürke), a praeclampsia (fekete), és az összes esetre együtt (szaggatott) is alkalmaztuk ($R^2=0,22$, $p=1 \times 10^{-5}$). **B)** Az anyai szérumban syndecan-1 koncentráció alacsonyabb a praeclampsziás terhesekben (medián: 673ng/ml, interkvartilis tartomány (IQR): 459-1161ng/ml) mint a kontroll csoportokban (medián: 1158ng/ml, IQR: 622-1480ng/ml). **C)** Nincs különbség az anyai szérumban syndecan-1 koncentrációban a praeclampsziás csoporton belül azoknál, akiknél a terhességi kornál kisebb újszülött született ($p=0,2$) (besatírozott körök; medián: 617ng/ml, IQR: 411-1035ng/ml), mint akiknél terhességi kornak megfelelő súlyú újszülött született (üres körök; medián: 703ng/ml, IQR: 497-1220ng/ml).

4.1.6. Az ischaemia és az aktin citoskeleton károsodásának hatása a syndecan-1 felszabadulására BeWo sejtekben

Ahhoz, hogy *in vitro* modellezni tudjuk a syndecan-1 syncytiotrophoblastban megfigyelt lokalizáció változásait praeclampsziában és HELLP szindrómában,

differentiálódásban indukált trophoblast-szerű BeWo sejtekkel végeztünk többféle kísérletet. A Forskolinnal kezelt BeWo sejteket vagy ischaemiás környezetbe tettük 24 órára, vagy 12 órán át Latrunculin B-vel kezeltük őket, ami gátolja az aktin citoszkeleton működését. Az *SDC1* gén expressziójában nem volt különbség sem az ischaemiás (1,14-szeres változás, $p=0,72$), sem pedig a Latrunculin B-vel kezelt BeWo sejtekben (1,07-szeres változás, $p=0,69$) a kontroll sejtekhez képest **(8A ábra)**. Érdekes módon azonban emelkedett volt a syndecan-1 koncentráció szint az ischaemiás környezetben lévő sejt kultúrák felülszójában ($30 \pm 1,8$ ng/ml, $p=0,042$), és alacsonyabb volt a syndecan-1 koncentráció szint a Latrunculin B-vel kezelt sejt kultúrák felülszójában ($17,4 \pm 3,3$ ng/ml, $p=0,05$) a kontrollokhoz viszonyítva ($24,0 \pm 4,2$ ng/ml) **(8B ábra)**. Immunfluoreszcens vizsgálattal a Forskolinnal kezelt, sokmagvú, fuzionált kontroll sejtek membránján volt a legerősebb a syndecan-1 festődése **(8C ábra)**. Az ischaemiás környezetben tartott BeWo sejtek membránján a festődés gyenge volt, ami arra utal, hogy nőtt a syndecan-1 shedding a trophoblastok felszínéről **(8D ábra)**. A Latrunculin B-vel kezelt BeWo sejtek membránján nem, vagy nagyon gyengén festődött a syndecan-1. A citoplazmában viszont erősebb, granuláris syndecan-1 festődést láttunk, azt sugallva hogy a syndecan-1 nem jutott ki a sejtmembránra az aktin citoszkeleton működésének károsodása miatt **(8E ábra)**.

8. ábra. A syndecan-1 shedding a BeWo sejtekben ischaemiás stressz hatására és az aktin citoszkeleton károsodásának hatására változik.



A) A *SDC1* gén expressziója nem változik sem ischaemia (1,14-szeres változás, $p=0,72$) sem pedig Latrunculin B kezelés (1,07-szeres változás, $p=0,69$) hatására Forskolinnal kezelt kontroll BeWo sejtekhez képest. **B)** A syndecan-1 koncentráció emelkedett BeWo sejtkultúrák felülszójában ischaemia hatására ($30 \pm 1,8 \text{ ng/ml}$, $p=0,042$) és csökkent Latrunculin B kezelés hatására ($17,4 \pm 3,3 \text{ ng/ml}$, $p=0,050$) a kontrollokhoz képest ($24,0 \pm 4,2 \text{ ng/ml}$). **C)** A soksejtmagvú, fuzionált BeWo sejtek mutatják a legerősebb syndecan-1 membránfestődést. **D)** A BeWo sejtekben ischaemia hatására csökken a sejtmembrán syndecan-1 immunfestődése. **E)** Latrunculin B-vel kezelt BeWo sejtekben nincs, vagy nagyon gyenge a syndecan-1 immunfestődés a sejtmembránban, míg emelkedett, granuláris jellegű festődést találunk a citoplazmában. **C-E)** 3D rekonstrukció; DAPI háttérfestés; 1 unit= $10,65 \mu\text{m}$.

4.2. Kináz útvonalak vizsgálatainak eredményei

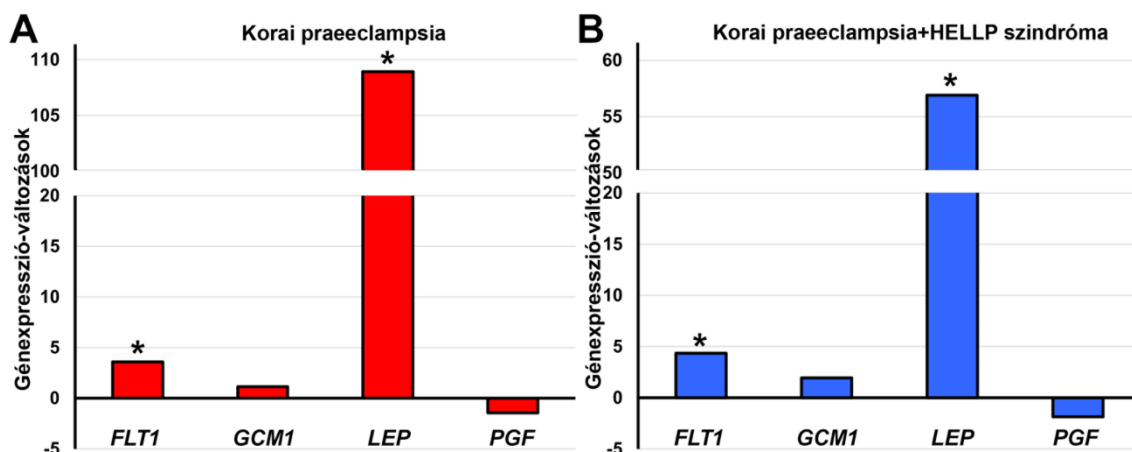
4.2.1. Demográfiai és klinikai adatok

A demográfiai és klinikai adatok az **1. táblázatban** láthatóak.

4.2.2. Génexpresszió változások korai praeclampsias és HELLP szindrómás betegek méhlepényében

A munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában microarray vizsgálatot végeztünk praeclampsias és kontroll terhesek méhlepényeiből [47]. Ezek a minták a mostani tanulmányunkban is szerepelnek. Először újra megvizsgáltuk a microarray adatsorunkat, és kiválasztottunk négy gént (*FLT1*, *GCM1*, *LEP*, *PGF*), amelyek a villosus trophoblastban termelődnek [172-174], változik az expressziójuk a méhlepényben praeclampsiasban, és összefüggésbe is hozhatóak a betegség lepenyi eredetével [49, 50, 76, 175]. A *LEP* expresszió a korai praeclampsias terhesekből származó méhlepényekben 108,9-szeresére ($q=6,4 \times 10^{-5}$), HELLP szindrómás terhesekből származó méhlepényekben 56,9-szeresére ($q=0,002$) nőtt a korai kontroll méhlepények expressziójához képest. Hasonlóan, az *FLT1* expresszió korai praeclampsias terhesek méhlepényében 3,6-szeresére ($q=0,085$), HELLP szindrómás terhesek méhlepényében pedig 4,3-szeresére ($q=0,04$) nőtt a korai kontroll méhlepények expressziójához képest. A *GCM1* és *PGF* expresszió HELLP szindrómás és praeclampsias betegek méhlepényében nem változott szignifikánsan a korai kontrollokhoz képest a microarray tanulmányunk kritériumai alapján [47] (**9. ábra**). Ennek ellenére ezt a két gént is belevettük a kutatásba, mert más szerzők vizsgálatai szerint viszont szignifikánsan változik az expressziójuk a placentában praeclampsiasban [141, 142, 176].

9. ábra. A placentáris génexpresszió változások korai praeeklampsziában és HELLP szindrómában.

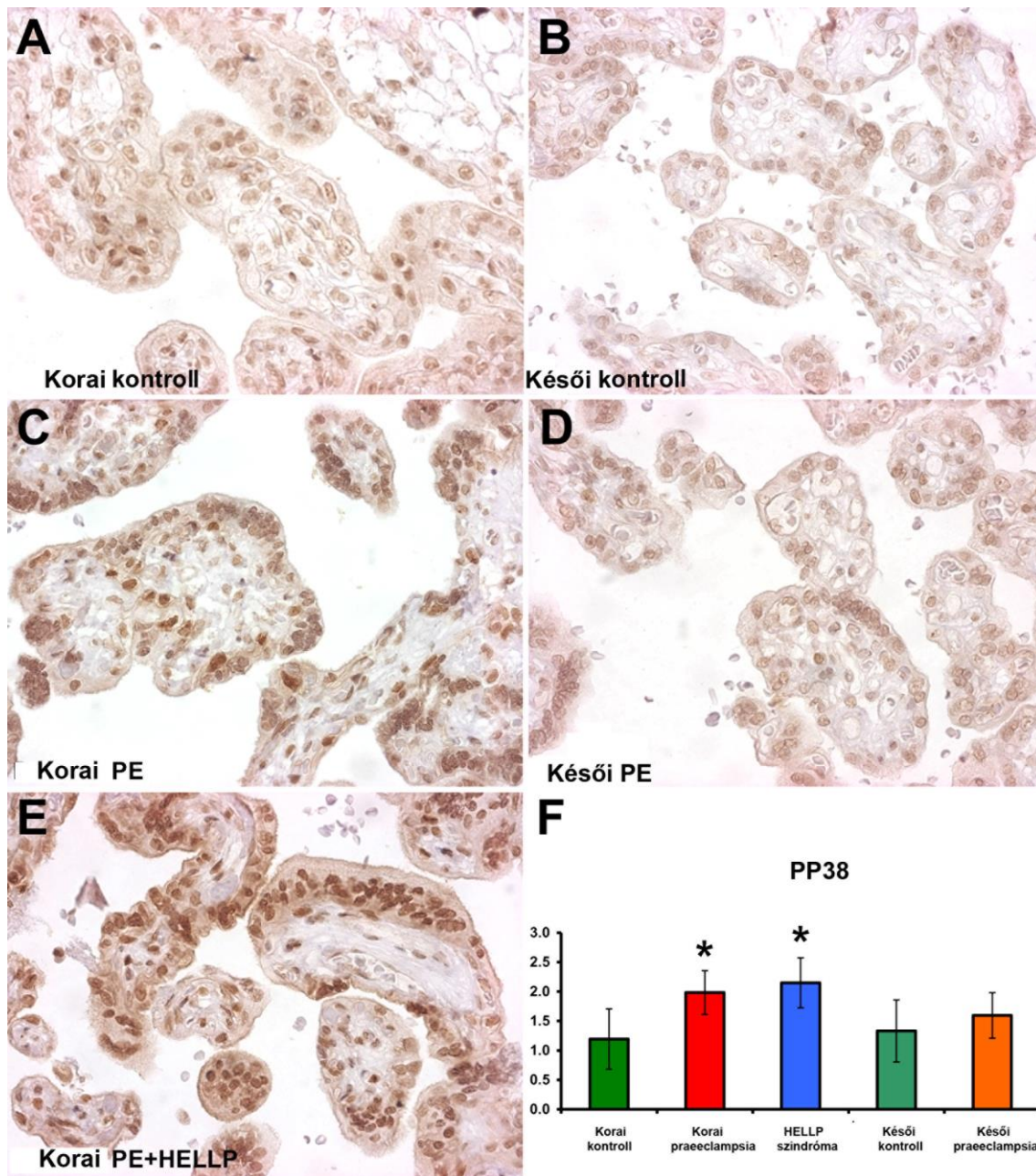


Placentáris microarray adataink közül [47] az *FLT1*, *GCM1*, *LEP* és *PGF* expressziós értékei láthatóak. A méhlepényi *LEP* expresszió korai praeeklampsziában 108,9-szeres ($q=6,4 \times 10^{-5}$) HELLP szindrómában pedig 56,9-szeres ($q=0,002$) emelkedést mutat a korai kontroll csoporthoz viszonyítva. A méhlepényi *FLT1* expresszió korai praeeklampsziában 3,6-szeres emelkedést mutat ($q=0,085$) HELLP szindrómában 4,3-szeres ($q=0,04$) emelkedést mutat a korai kontroll csoporthoz képest. Csillagokkal jelöltük a szignifikáns változásokat.

4.2.3. A villosus trophoblast jelátviteli útvonalainak megváltozása praeeklampsziában és HELLP szindrómában

Ezt követően a villosus trophoblast jelátviteli útvonalainak változásait vizsgáltuk. A foszforilált Akt-1, ERK1/2, JNK, és p38 kinázok immunopozitivitását értékeltük a praeeklampsziás, HELLP szindrómás és kontroll csoportokban. A TMA-kat a kináz ellenes antitestekkel megfestettük, beszkeneltük, digitalizáltuk, majd pedig virtuálisan értékeltük az immunfestődés erősségét. A legnagyobb változást a pp38 kináznál tapasztaltuk. A praeeklampsziás csoportok közül a HELLP szindróma tüneteit mutató praeeklampsziás betegek méhlepényeiben nagyobb mértékben emelkedett az immunfestés erőssége (átlag $\pm$ szórás: $2,15 \pm 0,43$, $p=0,004$), mint a HELLP szindróma tüneteit nem mutató korai praeeklampsziás betegek méhlepényeiben ($1,98 \pm 0,37$, $p=0,01$) a korai konrollokhoz ($1,19 \pm 0,51$) képest. A késői praeeklampsziások méhlepényeiben nem találtunk eltérést ($1,60 \pm 0,39$, $p=0,5$) a késői kontroll csoport méhlepényeihez képest ($1,33 \pm 0,53$) (10. ábra).

10. ábra. A villosus trophoblastok pp38 kináz immunfestődésének változása praeclampsziában és HELLP szindrómában



A-E) A foszforilált p38 (pp38) kináz immunfestődése leginkább a villosus trophoblastok sejtmagjában detektálható. **A,C,E)** A villosus trophoblastok magi festődése erősebb korai praeclampsziában mind a HELLP szindróma tüneteit mutató, mind pedig a HELLP szindróma tüneteit nem mutató betegekben a korai kontroll csoportokhoz képest. **B,D)** Nincs különbség a villosus trophoblast magi festődésében a késői kontroll és a késői praeclampsia csoportok között. A jellegzetes képek a csoportokról 400x-os nagyításon láthatóak. **F)** A villosus trophoblastok pp38 kináz immunfestődésének átlagértéke magasabb korai praeclampsziában (átlag±szórás: $1,98 \pm 0,37$, $p=0,01$) és HELLP szindrómásokban ($2,15 \pm 0,43$, $p=0,004$), mint a korai kontrollokban ($1,19 \pm 0,51$). A pp38 kináz immunfestődés átlagértéke nem különbözik a késői praeclampsia ($1,60 \pm 0,39$, $p=0,5$) és a késői kontroll csoportokban ($1,33 \pm 0,53$).

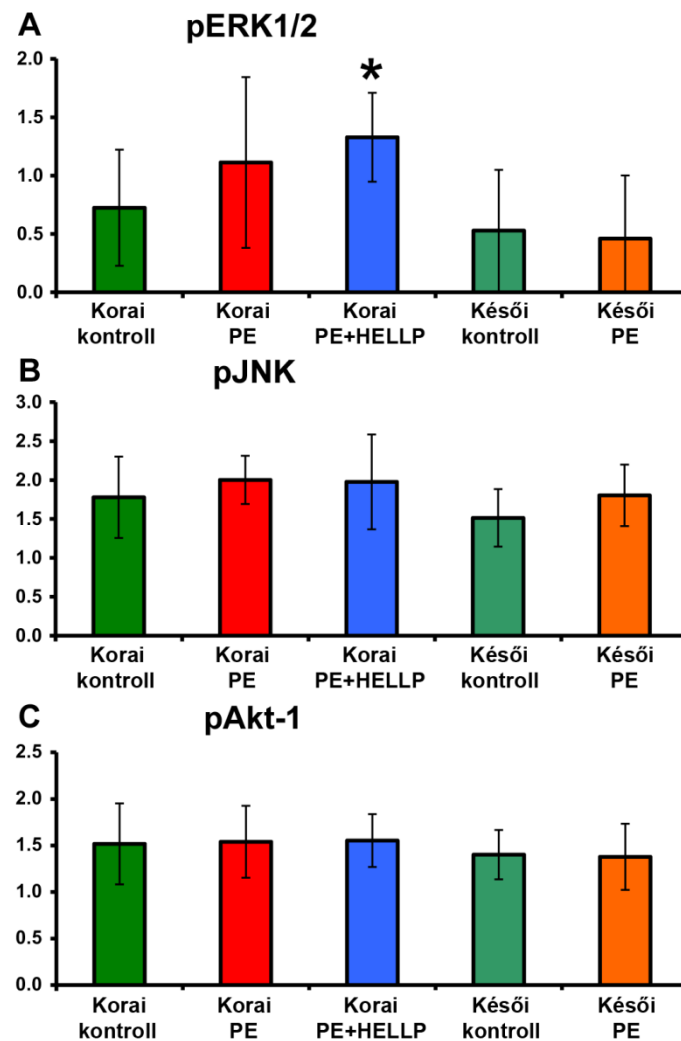
Hasonló, de kisebb intenzitású változásokat találtunk a foszforilált, aktív ERK1/2 kináz esetén. A korai praeclampsias csoporton belül a HELLP szindróma tüneteit mutató betegek esetében a méhlepényi pERK1/2 immunfestődés szignifikánsan erősebb volt ($1,33 \pm 0,38$, $p=0,03$), mint a kontroll csoport méhlepényi pERK1/2 immunfestődése, míg azon betegek méhlepényeiben, ahol nem volt a praeclampsia mellett HELLP szindróma is ($1,11 \pm 0,73$), a változás nem volt szignifikáns ($p=0,3$) **(11A ábra)**.

Késői praeclampsias terhesek méhlepényeiben nem találtunk eltérést ($0,46 \pm 0,54$, $p=0,8$) a késői kontroll méhlepényekhez képest ($0,53 \pm 0,52$).

Hasonlóan a pJNK sem mutatott festődési különbséget sem a korai sem a késői praeclampsias terhesek méhlepényeiben, bár látszik egy emelkedő tendencia késői praeclampsia esetén ($1,80 \pm 0,4$, $p=0,14$) a késői kontrollokhoz viszonyítva ($1,51 \pm 0,37$) **(11B ábra)**.

Nem találtunk változást a pAkt-1 kináz immunfestődésénél egyik csoportban sem **(11C ábra)**.

11. ábra. A villosus trophoblastok pERK1/2, pJNK és pAkt-1 immunfestődése



A) A villosus trophoblast pERK1/2 immunfestődés átlagértéke magasabb HELLP szindrómásokban (átlag±szórás: $1,33 \pm 0,38$, $p=0,03$), mint a korai kontroll csoportokban ($0,72 \pm 0,50$). Nincs különbség a villosus trophoblast pERK1/2 immunfestődésében a késői praeclampsia és a késői kontroll csoportok között. **B)** Nincs különbség a villosus trophoblast pJNK immunfestődésében sem korai sem késői praeclampszában a kontroll csoportokhoz képest. **C)** A villosus trophoblast pAkt immunfestődésénél nincs különbség a különböző csoportok között.

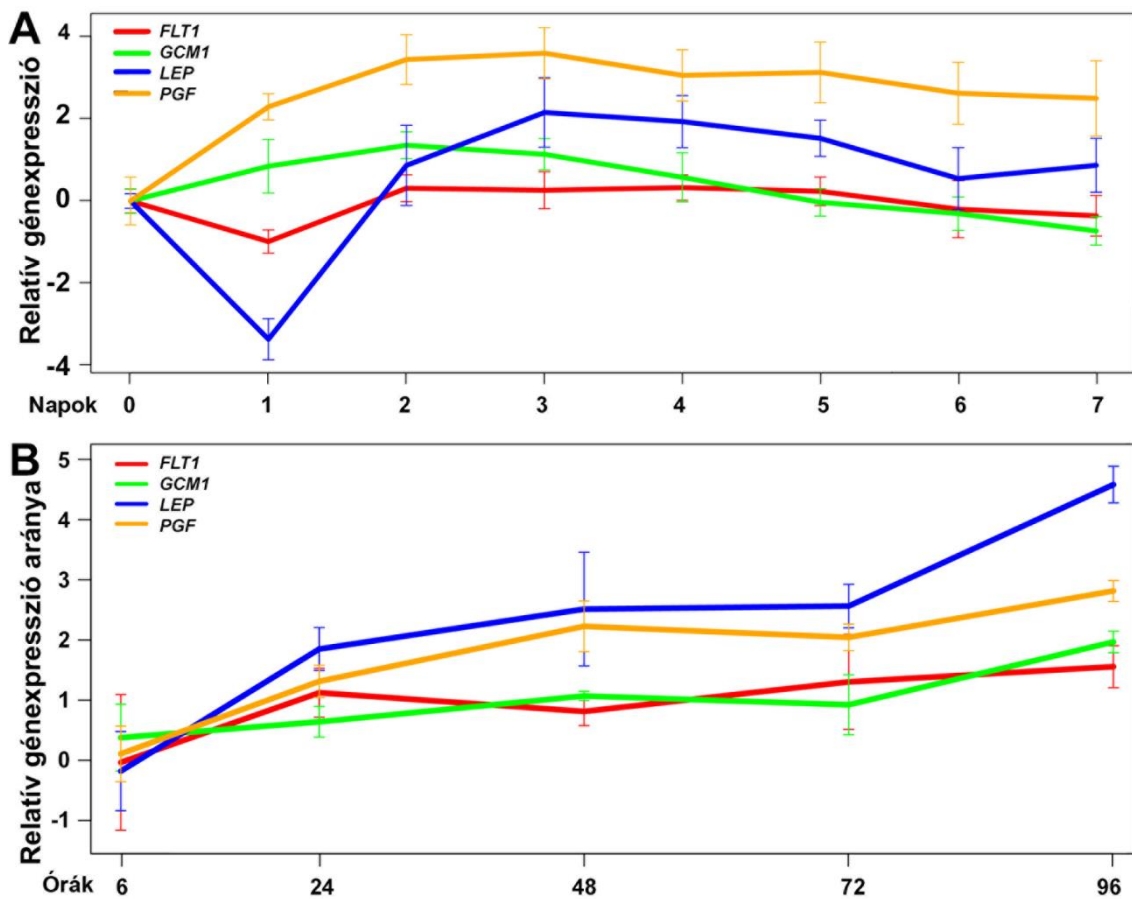
4.2.4. Trophoblast differenciáció hatása egyes angiogén és anti-angiogén gének méhlepényi expressziójára

Munkacsoportunk *in vitro* tanulmányában modelleztük, hogy a kináz útvonalak változásai hogyan befolyásolhatják a *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expresszióját a villosus trophoblast sejtekben. Először megvizsgáltuk a génexpresszió változásait a

trophoblast differenciáció folyamata alatt, hogy optimalizálni tudjuk a kísérletünket. Terminusban szülő egészséges nők méhlepényéből származó elsődleges trophoblast sejteket differenciáltattunk, és azt az eredményt kaptuk, hogy a vizsgált gének a differenciálódás 2. és 3. napján érik el a csúcsexpressziót (**12A ábra**).

Érdekes módon az *FLT1* expresszió csak enyhén változott, míg a *PGF* expresszió jelentős emelkedést mutatott a 3. napon. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a differenciációs események hatással vannak az érfejlődést segítő és gátló gének expressziójára a villosus trophoblastban.

12. ábra. A trophoblast differenciáció alatti génexpresszió változások



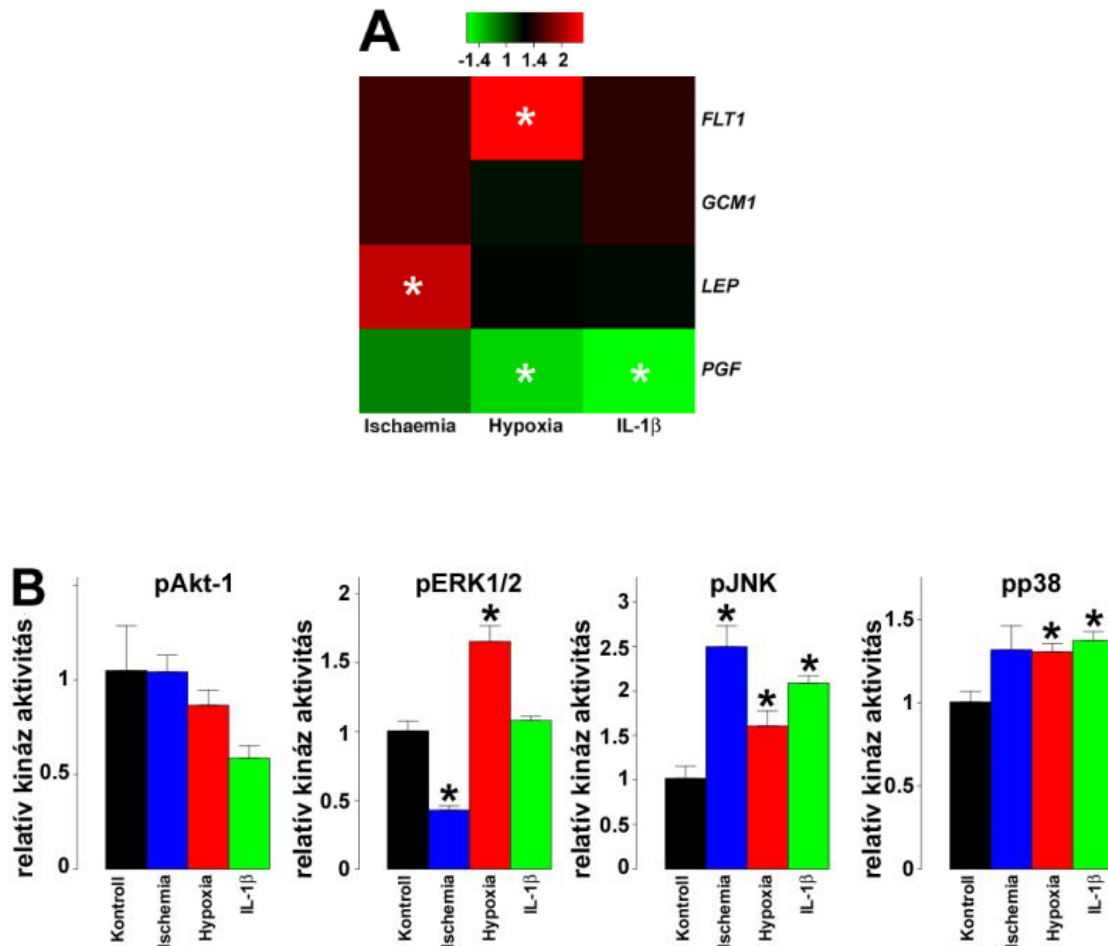
A qRT-PCR eredmények a *FLT1*, *GCM1*, *LEP* és *PGF* expresszió dinamikus változását mutatják **A**) Az elsődleges trophoblast sejtkultúrákban (n=4), és **B**) a differenciálódó BeWo sejtekben (n=3). Az x tengely a differenciáció idejét mutatja, az y tengely **A**) az *RPLP0* génhez viszonyított relatív génexpressziót (átlag±szórás) vagy **B**) a Forskolinnal kezelt és a kontroll sejtek relatív génexpresszió arányát mutatja (átlag±szórás).

Mivel a vizsgálatba bevont méhlepények száma limitált volt, és sok trophoblast sejtre volt szükségünk a további vizsgálatokhoz, a változásokat a már részletesen jellemzett BeWo sejteken is megnéztük. Ezek a sejtek hasonlóan képesek syncytiotrophoblastot kialakítani cAMP indukció után, mint az elsődleges trophoblast. A differenciált BeWo sejtekben a négy gén expressziója ugyancsak a 2. és a 3. nap között volt a legmagasabb **(12B ábra)**. Hasonlóan az elsődleges trophoblastokhoz, jelentős emelkedést tapasztaltunk a *PGF* és *LEP* gének expressziójában, míg az *FLT1* kifejeződése csak enyhébb emelkedést mutatott a differenciáció során. Mivel relatíve magas és stabil génexpresszió volt szükséges a BeWo sejtek további vizsgálatához, a differenciálódás 2-3. napját választottuk a további kísérletekhez.

4.2.5. Génexpressziós mintázatok a hypoxiás és ischaemiás trophoblast sejtekben

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk a kiválasztott gének expressziójának változását a különböző stressz kondíciókban, a BeWo sejteket differenciáltattuk, és a második naptól kezdve 24 órán keresztül három különböző stressz hatásnak tettük ki őket. **(13A ábra)**: 1) Ischaemiában a *LEP* expresszió 2,1-szeresére emelkedett ($p=0,04$), ami összefügghet azzal, a *LEP* méhlepényi expressziója a legnagyobb mértékben up-regulált korai praeclampszában és HELLP szindrómában **(9. ábra)** [47]. Érdekes módon nem találtunk szignifikáns eltérést az *FLT1* és a *PGF* expressziójában ebben a stressz kondícióban. 2) Hypoxiában az *FLT1* expresszió 2,5-szeresére emelkedett ($p=0,056$), míg a *PGF* expresszió 1,4-szeres csökkenést mutatott ($p=0,04$). Ezen eredményeink egybevágóak azzal, hogy korai praeclampszában és HELLP szindrómában emelkedik a placentáris *FLT1* expresszió **(9. ábra)** [47]. 3) A praeclampsziás terhesek méhlepényében lejátszódó pro-inflammatorikus változásokat modellező $IL-1\beta$ kezelést követően a *PGF* expresszió 1,6-szeres csökkenést mutatott ($p=0,01$), de nem volt szignifikáns változás az *FLT1* és a *LEP* expressziójában.

13. ábra. Génexpresszió és kináz aktivitás változások BeWo sejtekben, különböző stressz kondíciók hatására



A) A hőtérkép bemutatja a qRT-PCR adatok alapján a különböző stressz kondíciók hatását az *FLT1*, *GCM1*, *LEP* és *PGF* expresszióra a differenciálódó BeWo sejtekben. A színskála a változások mértékét ábrázolja a normoxiás környezetben tartott differenciálódó BeWo sejtekhez képest. Ischaemiában a *LEP* expresszió 2,1-szeresére emelkedik ($p=0,04$). Hypoxiában az *FLT1* expresszió 2,5-szeresére emelkedik ($p=0,056$), míg a *PGF* expresszió 1,4-szeres csökkenést mutat ($p=0,04$). Az IL-1 β kezelést követően a *PGF* expresszió 1,6-szeres csökkenést mutat ($p=0,01$). Csillagokkal jelöljük a szignifikáns változásokat. **B)** Az oszlopdiagramok mutatják a pAkt-1, pERK1/2, pJNK és pp38 kináz-aktivitások adatait a különböző stressz kondíciókban differenciálódó BeWo sejtekben ($n=3$). Ischaemiában a pJNK aktivitás a 2,5-szeresére nő ($q=0,03$), az ERK1/2 aktivitás a 2,4-szeres csökkenést mutat ($q=0,02$), míg a pp38 kináz aktivitás 1,3-szeresére nő ($q=0,17$). Hypoxiában a pERK1/2 aktivitás (1,7-fold, $q=0,03$), a pJNK aktivitás (1,6-fold, $q=0,1$) és a pp38 kináz aktivitás (1,3-szeres, $q=0,06$) nő szignifikánsan. Az IL-1 β kezelést követően a pJNK aktivitás 2,1-szeres emelkedést mutat ($q=0,03$), míg a pp38 kináz aktivitás 1,4-szeresére emelkedik ($q=0,04$). Csillagokkal jelöljük a szignifikáns változásokat.

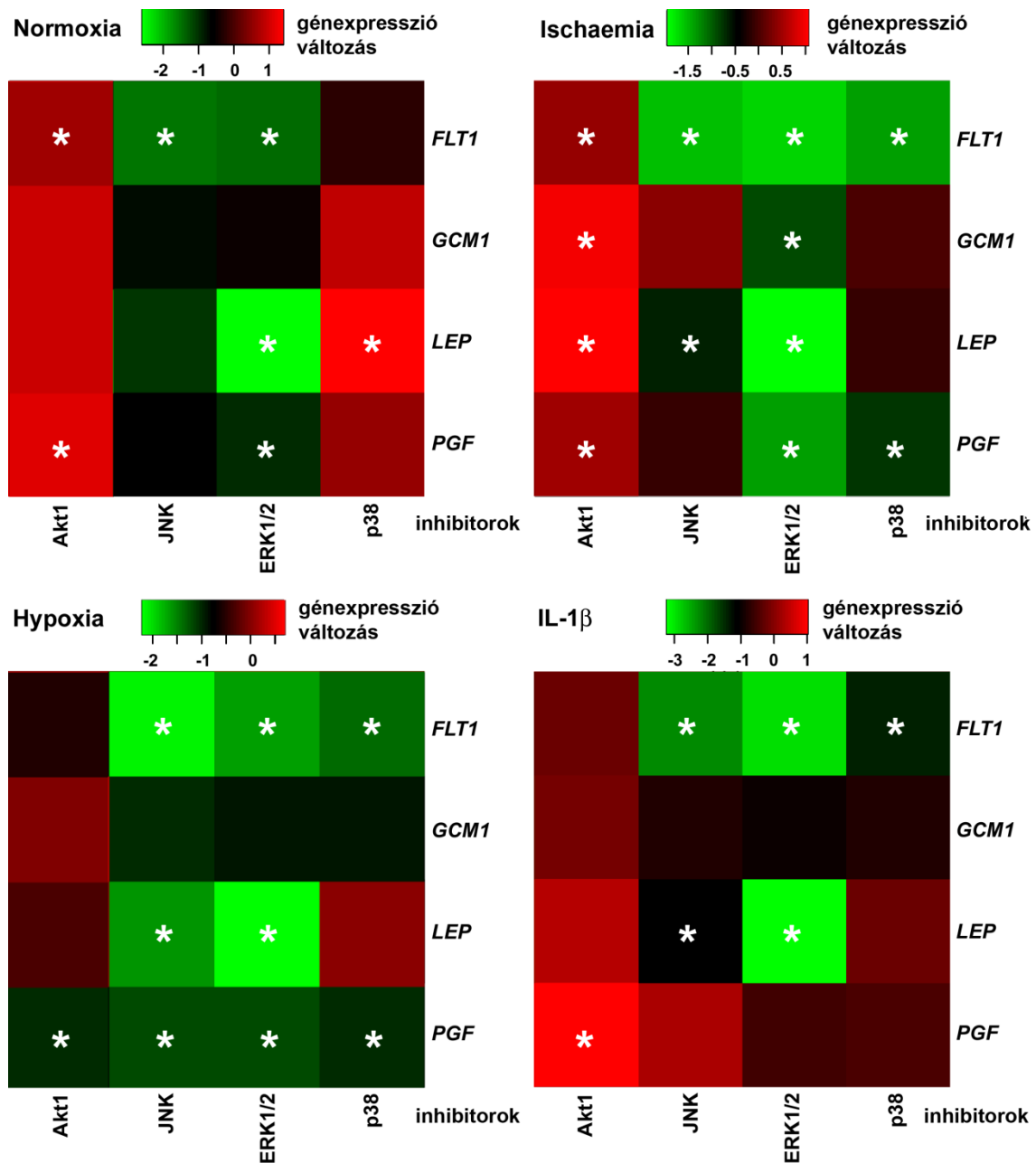
4.2.6. Génexpresszió és kináz aktivitás változások BeWo sejtekben, különböző stressz kondíciók hatására

Hogy megvizsgálhassuk a lehetséges változásokat az Akt-1, ERK1/2, JNK és a p38 kinázok aktivitásában, melyek a vizsgált gének megváltozott génexpressziójához vezethetnek BeWo sejtekben, a sejteket ugyanolyan módon kezeltük, mint a qRT-PCR vizsgálatokhoz, a kináz-aktivitás próbát pedig BeWo sejtek fehérje lizátumából végeztük. **(13B ábra):** 1) Ischaemiás környezetben a JNK 2,5-szer magasabb aktivitást mutatott ($q=0,03$), az ERK1/2 aktivitása 2,4-szeres csökkenést mutatott ($q=0,02$), míg 1,3-szeres emelkedést tapasztaltunk a p38 kináz aktivitás tekintetében ($q=0,17$). 2) Hypoxiás környezetben három kináz esetében kaptunk szignifikáns eredményt: 1,7-szeres emelkedést láttunk az ERK1/2 aktivitásban ($q=0,03$), 1,6-szeres emelkedést tapasztaltunk a JNK aktivitásban ($q=0,01$), és 1,3-szeres emelkedést mutatott a p38 kináz aktivitás ($q=0,06$). 3) IL-1 β kezelést követően a JNK aktivitása 2,1-szeres ($q=0,03$), a p38 kináz aktivitása pedig 1,4-szeres emelkedést mutatott ($q=0,04$).

4.2.7. A p38 kináz útvonal hatása BeWo sejtek génexpresszió változásaira hypoxiában és ischaemiában

Ezt követően teszteltük, hogy normál BeWo sejtekben és különböző stressznek kitett BeWo sejtekben hogyan változik a génexpressziós mintázat, ha gátoljuk a négy vizsgált kináz-útvonalat **(14. ábra):** 1) Kontroll BeWo sejtekben az ERK1/2 gátlásakor az *FLT1*, *LEP* és *PGF* gének expressziója csökkent, összefüggésben az ERK1/2 villosus trophoblast differenciációban betöltött kritikus szerepével [178]; 2) Hypoxiában a p38 és a JNK kinázok gátlása okozta a legtöbb változást a génexpresszióban a normoxiás, kontroll BeWo sejtekhez képest, ami egybevág azzal, hogy a környezeti stressz jeleket leginkább a p38 és JNK jelátviteli útvonalak továbbítják a placentában [101, 102, 179, 180]; 3) Ischaemia esetén a p38 és az Akt-1 kinázok gátlása hatott a legnagyobb mértékben a génexpresszióra normoxiás, kontroll BeWo sejtekhez képest; 4) IL-1 β kezelés esetén a p38 kináz gátlás volt legnagyobb hatással a génexpresszióra normoxiás, kontroll sejtekhez képest. Összeségében a p38 kináznak volt a legnagyobb hatása a BeWo sejtek *LEP*, *FLT1* és *PGF* expressziójának megváltozására.

14. ábra. Génexpresszió változás BeWo sejtekben kináz inhibitoros kezelés hatására, különböző stressz kondíciókban hőtésképen bemutatva



A hőtékép mutatja a qRT-PCR adatokat, a négy kináz inhibitor és a különböző stressz kondíciók hatásait a *FLT1*, *GCM1*, *LEP* és *PGF* gének expressziójára a differenciálódó BeWo sejtekben. A színskála ábrázolja a génexpressziós változások nagyságát a kináz inhibitoros kezeléstől mentes, differenciálódó BeWo sejtekhez képest. A csillagokkal jelöljük a szignifikáns változásokat.

15. ábra. Génexpresszió változás a BeWo sejtekben kináz inhibitoros kezelés hatására, különböző stressz kondíciókban, táblázatos formában bemutatva

A Ischaemia vs. normoxia					B Hypoxia vs. normoxia					C IL1- β vs. normoxia				
			↓	<i>FLT1</i>	↓			↓	<i>FLT1</i>	↓			↓	<i>FLT1</i>
↑		↓		<i>GCM1</i>					<i>GCM1</i>					<i>GCM1</i>
↑	↑		↓	<i>LEP</i>		↓		↓	<i>LEP</i>		↑		↓	<i>LEP</i>
			↓	<i>PGF</i>	↓	↓		↓	<i>PGF</i>			↑		<i>PGF</i>
Akt1 inh.	JNK inh.	ERK inh.	P38 inh.		Akt1 inh.	JNK inh.	ERK inh.	P38 inh.		Akt1 inh.	JNK inh.	ERK inh.	P38 inh.	

A három táblázat bemutatja a differenciálódó BeWo sejtek kináz-inhibitorok alkalmazásának hatására történt génexpresszió változásait, különböző stressz kondíciókban a normoxiás kondícióhoz képest. A qRT-PCR adatok a 14. ábrán láthatóak. A piros nyilak az expresszió növekedését mutatják, tehát ha a növekvő trend normoxiában szignifikánssá válik a vizsgált stressz kondícióban, vagy akkor, ha normoxiában jelen lévő szignifikáns expresszió csökkenés elveszik a vizsgált stressz kondícióban. Hasonlóan a zöld nyilak az expresszió csökkenését mutatják, ami vagy a normoxiában jelen lévő csökkenő trend szignifikánssá válását jelenti a vizsgált stressz kondícióban, vagy a normoxiában jelen lévő szignifikáns expresszió emelkedés elvesztését mutatja a vizsgált stressz kondícióban.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Syndecan-1 vizsgálatai

5.1.1. A syndecan-1 expresszió növekedése villosus trophoblast differenciáció során

A syndecan-1 immunfestődése kimutatható volt a syncytiotrophoblast citoplazmájában és apikális membránján, míg más chorionboholy sejteknél nem volt festődés. A harmadik trimeszterben a terhességi kor növekedésével nem változott a syndecan-1 festődése. Ezen eredmények megegyeznek más tanulmányokban leírtakkal, ahol szintén nem találtak különbséget a syncytiotrophoblast syndecan-1 immunfestődésében első és harmadik trimeszter között [148-150]. Számos cikk említi azt is, hogy a syndecan-1 csak a syncytiotrophoblastban található [148-151, 181]. Ennek alapján feltételezhető volt, hogy a syndecan-1 expressziója a villosus trophoblast differenciációjától függ, és *in vitro* eredményeink ezt a hipotézist alátámasztandó emelkedő syndecan-1 expressziót és felszabadulást mutattak a Forskolinnal kezelt, differenciálódó BeWo sejtekben.

A villosus cytotrophoblast jelentős strukturális, funkcionális és metabolikus változáson megy keresztül a differenciáció folyamán, ahogy fúzionál a syncytiotrophoblast réteggel; ehhez a trophoblast transzkripciós programjának teljes megváltoztatására van szükség [73, 134]. Ez a transzkripciós átprogramozás több ezer gént érint, melyek expressziója vagy fokozódik vagy csökken, aminek eredményeképpen új trophoblast és méhlepényi funkciók jönnek létre [73]. Ennek a sokrétűen és szorosan szabályozott folyamatnak az eredménye a soksejtmagvú syncytiotrophoblast létrejötte, aminek létfontosságú szerepe van a terhességben. A syncytiotrophoblaston keresztül történik a gázcsere, a tápanyagok felvétele, az anyagcseretermékek kiválasztása, valamint a syncytiotrophoblast hormonokat termel, amik a magzat fejlődését szabályozzák, és egy immunológiai gátat képez az anya és a magzat között [131]. Eredményeink azt mutatják, hogy a syncytiotrophoblast felszínén, az anyai-magzati határon magas a syndecan-1 expressziója, ami azt jelentheti, hogy ez a proteoglikán fontos szerepet játszik az anya és magzat közti interakciókban. Mivel a syndecan-1 expresszió különböző tumorokban is megváltozik [52, 182-186], ezért ennek a proteoglikánnak onkodevelopmentális jelentősége lehet.

5.1.2. *A placentáris syndecan-1 immunfestődés változásai praeclampsziában és HELLP szindrómában*

A különböző betegcsoportok méhlepényeinek syndecan-1 immunfestődési vizsgálata során emelkedett intenzitású immunfestődést tapasztaltunk a syncytiotrophoblast apikális membránján mind a korai, mind pedig késői praeclampsziában, illetve HELLP szindrómában a kontroll csoportokhoz képest. Ezek az eredmények megegyeznek Ogawa és munkatársai tanulmányában leírtakkal, miszerint korai praeclampsziában nő a méhlepényi syndecan-1 immunfestődés intenzitása a korai kontroll csoporthoz viszonyítva [151]. Érdekes módon két másik publikációban éppen ellentétes eredményre jutottak a szerzők, korai és késői praeclampsziában is csökkenő syndecan-1 immunfestődést találtak a syncytiotrophoblastban a korai és késői kontrollokhoz képest [149, 150]. Az eltérő eredményeket a használt módszerek különbözősége okozhatta. Mindhárom előző tanulmány ugyanazt az egér monoklonális IgG1 antitestet használta (B-B4 klón), ami a humán syndecan-1 fehérje ektodoménjéhez kötődik [187]. Ez a B-B4 antitest ugyanoda, vagy egy nagyon közeli epitópra tud kötni a syndecan-1 fehérjén, mint az általunk használt MI15 antitest [188]. A fő különbség azonban az, hogy mi, hasonlóan Ogawa és munkatársai tanulmányához, antigén feltárást is alkalmaztunk, míg Jokimaa és munkatársai cikkeiben nincs erre vonatkozó utalás, holott a gyártó ajánlása szerint a syndecan-1 immunfestésnél kell antigén feltárást végezni (DakoCytomation ajánlás). Elképzelhető, hogy a festődési különbség oka az, hogy ha nincs antigén feltárást, a formalinos fixálás miatt keresztkötések keletkezhetnek a syndecan-1 fehérje komponenseiben, és így a fehérje bizonyos epitópjai rejtve maradhatnak az antitest előtt.

A méhlepény morfológiai kutatásaiból kiderül, hogy a placentáris fejlődés megváltozik, és a placenta morfológiája abnormális lesz IUGR-rel szövődött korai praeclampsziában, de IUGR-rel nem szövődött késői praeclampsziában ezek a változások nem figyelhetők meg [189]. Az is kiderült, hogy a placentáris transzkripció különbözik a késői praeclampsziás és az IUGR-rel szövődött korai praeclampsziás betegekben [49]. A génexpressziós mintázat azonban hasonlóan alakul a korai praeclampsziás és a HELLP szindrómás terhesek méhlepényeiben [47]. Sok más paramétert is vizsgáltak már a praeclampsia különböző alcsoportjaiban. Mi munkacsoportunk és kollaborátoraink is találtak összefüggést például korai

praeclampsziában bizonyos méhlepényi hisztológiai léziók gyakorisága és a méhlepényi perfúzió csökkenés között, késői praeclampsziában viszont nem találtak ilyen összefüggéseket [47, 115, 190, 191], ami a praeclampsia heterogenitásának elméletét támasztja alá [2, 4, 12]. Eredményünk azért jelentős, mert a syncytiotrophoblast syndecan-1 immunfestődése a praeclampsia két alcsoportjában és HELLP szindrómában is erősebb volt a kontrollokhoz képest, azt sugallván, hogy a vizsgált proteoglikán diszregulációja egy közös probléma ezekben a betegségekben. Egy kis heterogenitást azonban mi is megfigyeltünk a syndecan-1 immunfestődési mintázatában és a sejten belüli megoszlásában a praeclampsias és HELLP szindrómás terhesek méhlepényeiben. Voltak olyan esetek, ahol nagyon erős immunfestődést tapasztaltunk a syncytiotrophoblast apikális membrán régiójában, ez főleg HELLP szindrómás terhesek méhlepényeinél fordult elő. Voltak olyan placenták, ahol erős citoplazmatikus festődést tapasztaltunk, mintha a syndecan-1 felhalmozódna a syncytiotrophoblast citoplazmájában. Néhány esetben a syncytiotrophoblast apikális membránja teljesen negatív volt a syndecan-1-re nézve, főleg korai praeclampsias betegek méhlepényeiben, ami azt feltételezi, hogy ilyenkor csökken a proteoglikán transzport a sejtfelszínre, ugyanakkor a shedding viszont megnőtt a felszínről.

5.1.3. Csökkent szérum syndecan-1 koncentráció praeclampsias terheseknél

A 24. és a 40. terhességi hét között az anyai szérumban emelkedő koncentrációban volt jelen a syndecan-1. Eredményeink egyeznek egy korábbi tanulmányban leírtakkal [192], ahol az anyai szérum syndecan-1 koncentráció szintje a terhesség alatt folyamatosan emelkedett, és több, mint 100-szor nagyobb koncentrációt is mértek a nem terhesek mintáihoz képest [192]. Mivel a syndecan-1 immunfestődése a syncytiotrophoblastban a terhességi korrall nem változik [148-150], és a születési súly pozitív korrelációt mutat az anyai szérum syndecan-1 szinttel, felvetettük, hogy a szérum syndecan-1 koncentráció emelkedése a terhességi korrall annak köszönhető, hogy a syndecan-1-et termelő villosos trophoblastok térfogata és felülete a méhlepény fejlődése során egyre növekszik [193].

Munkacsoportunk elsőként vizsgálta meg az anyai szérum syndecan-1 koncentráció szinteket praeclampsziában. Mind a korai, mind pedig a késői praeclampsias csoportban a klinikai tünetek megjelenésekor csökkent syndecan-1 koncentrációt mértünk a terhességi kornak megfelelő kontroll csoporthoz képest, annak

ellenére, hogy ennél a betegcsoportnál a méhlepény syndecan-1 immunfestődése erősebb volt a kontrollok méhlepényeihez képest. Miután előző tanulmányunkban a microarray eredmények nem mutattak eltérést a *SDC1* placentáris expressziójában korai praeclampsziában és HELLP szindrómában, ezért az alacsony szérumszint és a magas immunfestődés a méhlepényben együttesen azt jelentheti, hogy ezekben a betegségekben a syncytiotrophoblast syndecan-1 transzportja sérül.

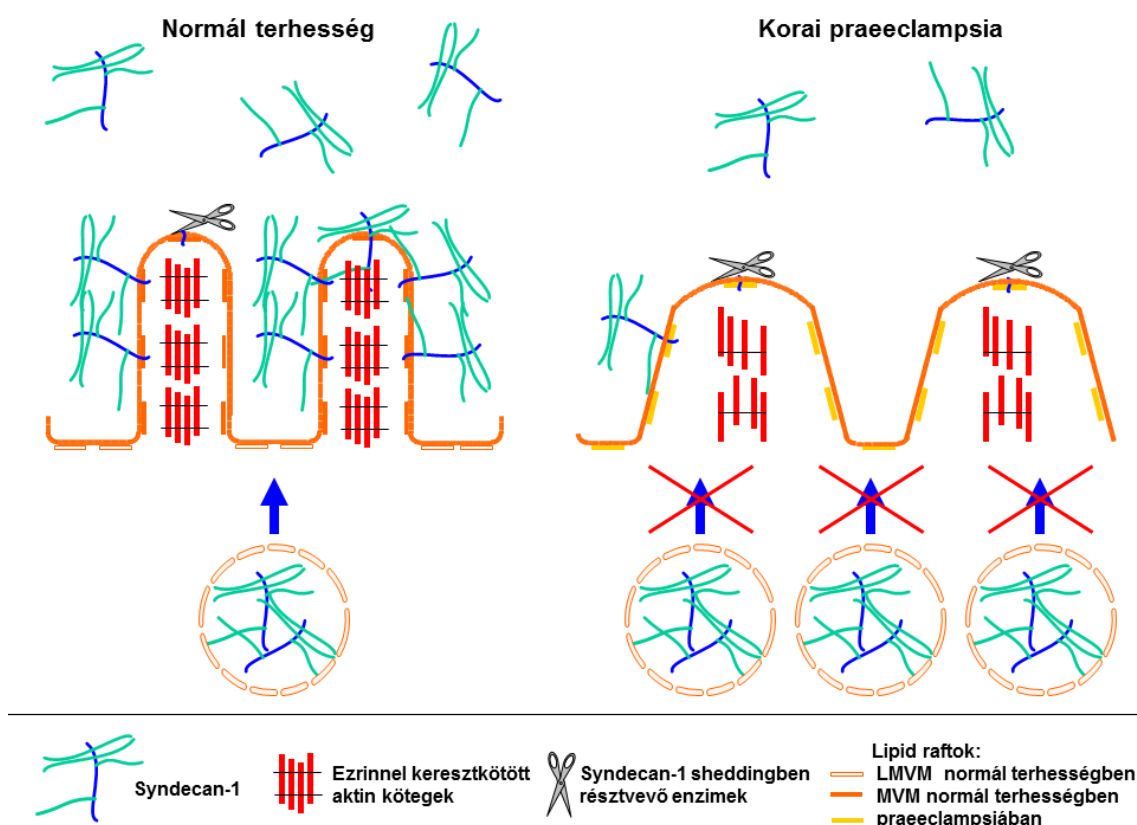
5.1.4. Az ischaemia és a sérült aktin citoskeleton hatása a syncytiotrophoblast syndecan-1 transzportjára

Korábban már leírták, hogy a syndecan-1 sejten belüli transzportja az aktin citoskeleton épségétől függ [194]. Egy nemrég közölt tanulmányban leírták, hogy praeclampsziás terhesek méhlepényeiben olyan gének, amik az aktin citoskeleton szabályozásában részt vesznek, alul-regulálódtak [195]. Egy másik kutatás pedig bemutatta, hogy praeclampsziás betegek méhlepényeiben a villosus cytotrophoblastban csökkent az aktin és ezrin fehérjék expressziója, amely fehérjék a mikrovillus membrán szerkezetének integritásáért felelősek [196]. Azt is kimutatták, hogy praeclampsziás betegek méhlepényének syncytiotrophoblastjában az apikális membránban megváltozik a citoskeleton fehérjehálózat [197]. Ennek fontos szerepe lehet a syncytiotrophoblast mikrovillus felszínének elváltozásában, ahogyan ezt egy elektronmikroszkópos tanulmányban korábban már leírták [198]. BeWo-sejtes eredményeinkben az aktin citoskeleton Latrunculin B-vel való gátlása esetén a syndecan-1 visszatartása fokozódott a sejtben. Ebből arra következtethetünk, hogy ha praeclampsziában és HELLP szindrómában megváltozik az aktin citoskeleton hálózat a syncytiotrophoblastban, ez a syndecan-1 akkumulálódását okozhatja az apikális membrán alatt és a citoplazmában. Ez lehet a magyarázat arra, hogy praeclampsziában a syncytiotrophoblast citoplazmában erős syndecan-1 festődést, ugyanakkor a szérumban syndecan-1 koncentráció csökkenést találtunk [197] **(16. ábra)**.

Más tanulmányokban szó esik arról, hogy a lipid raftok integritása is meghatározza a syndecan-1 membránban való elhelyezkedését és biológiai aktivitását [199, 200]. Mi a kontroll placentában a syndecan-1-nél granuláris festődést tapasztaltunk, ami arra utalt, hogy a syndecan-1 a lipid raftokban helyezkedik el a mikrovillus membránban. Egy tanulmányban azt találták, hogy kétféle szerkezetű lipid

raft található a syncytiotrophoblast kefeszegély felszínén: a klasszikus mikrovillus membrán (MVM) és a könnyű mikrovillus membrán (LMVM) [201]. Praeclampsziában viszont a kefeszegély felszíne szerkezetileg megváltozik, és az MVM és LMVM területén is csak egyféle lipid raft szerkezet található, ami arra utalhat, hogy számottevő változás történik a lipid raftokban ezekben a kórképekben [197]. A beteg méhlepényekben mi azt figyeltük meg, hogy a granuláris syndecan-1 festődés helyett inkább lineáris festődés volt a jellemző, amiből mi is indirekt arra következtethetünk, hogy a lipid raftok szerkezete megváltozott.

16. ábra. A syndecan-1 transzport és shedding megváltozása praeclampsziában



Normál terhességben a syndecan-1 a syncytiotrophoblast apikális membránjára transzportálódik, ahonnan a shedding mechanizmus révén folyamatosan bekerül az anyai véráramba. Praeclampsia esetén a megváltozott kortikális aktin citoszkeleton hálózat a syndecan-1 akkumulálódásához vezet a syncytiotrophoblast apikális membránja alatt és a citoplazmában. Az ábra adaptálásra került a Riquelme G et al.: Lipid rafts and cytoskeletal proteins in placental microvilli membranes from preeclamptic and IUGR pregnancies (*J. Membr. Biol.*, 2011;241:127-140) közleményből [197].

5.2. Villosus trophoblast kináz útvonalainak vizsgálatai

5.2.1. A hypoxia és az ischaemia génexpresszió változásokat indukál a BeWo sejtekben, hasonlóan a korai praeclampsia méhlepényekhez

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk a villosus trophoblastok szerepét praeclampsiaiban, előző microarray tanulmányunkból [47] kiválasztottunk négy gént (*FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF*), melyek főként a villosus trophoblastokban termelődnek [172-174], változik az expressziójuk korai praeclampsiaiban, és feltételezhetően szerepük van ezen szindróma patogenezisében [49-51, 76, 141-143, 175, 202, 203]. A *LEP* és az *FLT1* magasan expresszáldott a HELLP szindróma tüneteit mutató és a HELLP szindróma tüneteit nem mutató korai praeclampsia betegcsoportok méhlepényeiben is, ami alátámasztja a hipotézist, miszerint ezen szindrómákban anyai szisztémás anti-angiogén és pro-inflammatorikus kórállapot a lepenyi eredet miatt alakul ki. Más tanulmányok eredményeinek némiképpen ellentmondóan [141-143, 202, 203] a *GCM1* és *PGF* placentáris expresszió változása a mi microarray adatsorunkban nem érte el a szignifikancia szintet.

Ezt követően *in vitro* modelleztük a villosus trophoblast stresszre adott reakcióját Forskolinnal kezelt, differenciálódó BeWo sejtekben, melyek jelentős mértékben expresszálták a négy kiválasztott gént. A pro-inflammatorikus kezelés hatására nem emelkedett az *FLT1* és a *LEP* expressziója, ami azt sugallja, hogy ezen stresszállapot nem lehet egyedüli meghatározó oka a placentáris génexpresszió változásoknak praeclampsiaiban.

Az ischaemia ugyanakkor megemelte a *LEP* expresszióját, míg a hypoxia az *FLT1* expresszióját növelte a *PGF* expresszióját pedig csökkentette. Mivel a *LEP* és az *FLT1* emelkedett expressziója a korai praeclampsia placentáris biomarkere [47, 51], *in vitro* eredményeink azt jelenthetik, hogy valószínűleg az ischaemia és a hypoxia együttes hatása alakítja ki a villosus trophoblastok jellegzetes génexpressziós változásait korai praeclampsiaiban és HELLP szindrómában. Mivel önmagában egyetlen stressz kondíció sem volt képes utánozni a korai praeclampsia betegek méhlepényében talált génexpressziós változásokat, lehetséges, hogy nem volt megfelelő a hypoxia és az ischaemia mértéke a kísérletünkben, vagy pedig a BeWo trophoblast-szerű sejtek nem voltak a legoptimálisabbak a villosus trophoblast stressz modellezésére. Emellett

előfordulhat, hogy a hypoxia és ischaemia mellett más, még ismeretlen faktorok is hozzájárulnak a villosus trophoblast transzkripciójának és működésének megváltozásához praeclampsziában és HELLP szindrómában. Ezt támasztja alá, hogy a méhlepényben a *LEP* és az *FLT1* gén metilációs mintázatai oly módon változnak meg praeclampsziában normál terhességhez képest, amely emelheti ezen gének expresszióját [204-207].

5.2.2. *A trophoblast jelátviteli útvonalainak szerepe praeclampsziában és HELLP szindrómában*

Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a méhlepény hypoxiás károsodása és a HIF-1 α útvonal aktiválódása felelősek a praeclampsia méhlepényi patomechanizmusáért [156, 161]. A következményesen megemelkedett sFlt-1 és sEng koncentrációknak kiemelt szerepe van ebben [156, 161]. Legújabb eredmények viszont azt mutatták, hogy a méhlepényi oxidatív stressz és reaktív oxigén gyökök (ROS) játszhatnak igazán meghatározó szerepet a praeclampsia kialakulásában. Ezek ugyanis aktiválják a MAPK és az NF κ B útvonalakat, ugyanakkor gátolják a PI3/Akt útvonalat a méhlepényben [36, 42]. Ezen útvonalak befolyásolják a sejt túlélését és az apoptózist, a proliferációt, differenciációt, a gyulladásos mediátorok és anti-angiogén anyagok felszabadulását, amik praeclampsziás terhesek méhlepényében károsodnak [36, 42].

Kísérleteinkben az Akt-1 és három MAPK kináz, az ERK1/2, a JNK és a p38 vizsgálataira fókuszáltunk. Az ERK1/2-t elsősorban növekedési faktorok, mitogén hatású anyagok aktiválják, míg a JNK és p38 útvonal inkább a stresszre és különböző citokinekre reagál [208]. Az ERK1-2-nek fontos szerepe van a sejtproliferációban, a sejt túlélésében, és a villosus trophoblast sejtek differenciációjáért és proliferációjáért is felelős [42, 80, 164]. A p38 citokinek, kemokinek, bakteriális lipopoliszacharidok hatására aktiválódik, és gyulladásban, immunválaszban, apoptózisban játszik szerepet [209]. A JNK leginkább citokinek, UV sugárzás és DNS-t károsító mechanizmusok hatására aktiválódik, és az apoptózist szabályozza [210]. Az Akt-1 viszont a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalban a sejt túlélésében játszik szerepet, gátolja az apoptózist, serkenti a sejtnövekedést és a proliferációt [42, 80, 164].

A placentáris TMA-k vizsgálata során a villosus trophoblast immunfestődésének erősségéből a négy kináz aktív formáinak mennyiségére, és így az általuk reprezentált jelátviteli útvonal aktiválódására is következtethettünk indirekt módon. A

legmarkánsabb változást a pp38 kináznál találtuk, amelynek immunfestődése korai praeclampsziában erősebb volt a korai kontroll csoporthoz képest, míg késői praeclampsziás terhesek méhlepényében nem volt változás a késői kontrollokéhoz képest **(11. és 17. ábra)**. Érdekes módon nem találtunk szignifikáns változást a pJNK immunfestődésében betegek méhlepényeiben kontrollokéhoz képest **(12. és 17. ábra)**. Ezen eredmények összességében azt mutatják, hogy korai praeclampsziában nagyobb, kifejezettebb villosus trophoblast stressz van jelen, mint késői praeclampsziában. Ez az eredmény összhangban van a méhlepény hisztopatológiai [2, 33-35, 38, 45, 168, 190, 211, 212] és transzkripciós változásaival [49], és azzal, hogy korai praeclampsziában a méhlepényből korábban és nagyobb mennyiségben szabadulnak fel az anti-angiogén anyagok, mint késői praeclampsziában [2, 26].

Érdekes, hogy a korai praeclampsziás csoporton belül a HELLP szindrómával szövődött terhességek esetében az átlag pp38 immunfestődés értéke erőteljesebben nőtt mint a HELLP szindrómával nem szövődött terhességek esetén, ami a stresszre adott fokozottabb válaszreakciót sejtet a villosus trophoblastokban **(10. és 17. ábra)**. Ez az eredmény egybevág a korábbi microarray eredményeinkkel, ahol szintén a HELLP szindrómás betegek esetén a méhlepényekben súlyosabb patológiás elváltozásokat és fokozottabb gyulladásos génexpressziós változásokat találtunk [47]. A HELLP szindrómás terhesek méhlepényében a pERK1/2 immunfestődés értéke is szignifikánsan emelkedett volt szemben a HELLP szindróma tüneteit nem mutató korai és késői praeclampsziásokéhoz képest **(11. és 17. ábra)**, ami azt sugallja, hogy HELLP szindrómában van még egyéb környezeti stimulus is, ami aktiválja a villosus trophoblastok ERK1/2 jelátviteli útját.

5.2.3. A hypoxia, ischaemia és pro-inflammatorikus stimulus hatása a BeWo sejtek jelátviteli útjaira

Ezen eredmények ismeretében kíváncsiak voltunk, hogy mely stressz stimulus vált ki hasonló választ BeWo sejtekben, mint a praeclampsziás és HELLP szindrómás esetek villosus trophoblastjaiban. A BeWo sejteket Forskolinnal kezeltük, hogy modellezük a cytotrophoblastok és a syncytiotrophoblastok együttes jelenlétét a chorionbolyhokban. Azt az időpontot választottuk ki a vizsgálatra a differenciáció során, amikor a kiválasztott gének stabilan, erősen expresszálódnak. Érdekes módon mindhárom stressz kondíció ugyanúgy aktiválta a p38 és a JNK kináz útjait, a hypoxia és az

ischaemia az ERK1/2 kináz útvonalra pont ellentétesen hatott, míg az IL-1 β kezelés ez utóbbi útvonalat nem, csak az előbbi kettőt érintette **(13. és 17. ábra)**. Ezek az eredmények összhangban vannak más tanulmányok eredményeivel, ahol különböző sejtekben, szövetekben az ischaemia aktiválta a JNK [213-215] és a p38 útvonalakat [216], a hypoxia aktiválta az ERK1/2 [217-219], JNK [219] és p38 [42, 217] útvonalakat, a pro-inflammatorikus kondíció pedig a JNK [220, 221] és a p38 [221-223] útvonalakra volt hatással.

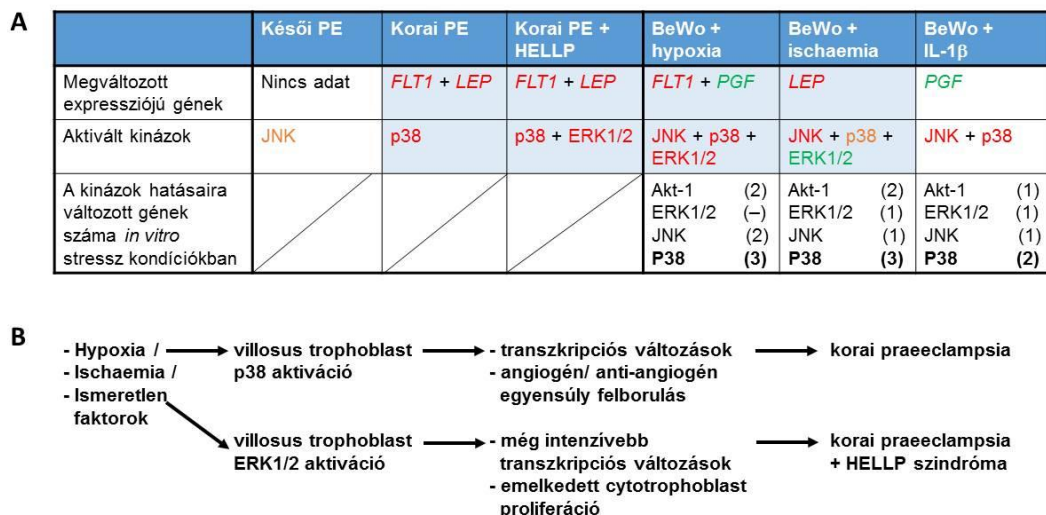
Hasonlóan a génexpressziós változásokhoz, a kináz aktivitásbeli változások is azt mutatják, hogy az a sejtmodell áll a legközelebb a villosus trophoblastok megváltozott jelátviteli útvonalaihoz praeclampsziában, ahol a hypoxia és az ischaemia együttes hatása érvényesül. Eredményeink azt is sugallják, hogy amennyiben az ischaemia mellett fenáll egy erős hypoxiás stimulus is, ez aktiválhatja az ERK1/2 jelátvitelt a villosus trophoblastokban, HELLP szindrómát kialakítva.

A kináz inhibitorokat alkalmazva megállapítható volt, hogy normális parciális oxigén nyomás mellett az ERK1/2 útvonalnak van a legnagyobb hatása a génexpresszióra, ami összhangban van ezen jelátviteli útvonal meghatározó szerepével villosus trophoblast differenciációban [178]. A három stressz kondícióban a p38 kináz útvonal volt a legnagyobb hatással a *LEP*, *FLT1* és a *PGF* expresszióra BeWo sejtekben **(14. és 17. ábra)**. Ez összefügg a p38 kináz környezeti stresszre adott központi szerepével a méhlepényben [101, 179, 180], és fontos szerepét valószínűsíti a trophoblast stresszállapotokra adott anti-angiogén és pro-inflammatorikus válaszában a praeclampsia és HELLP szindróma kialakulása folyamán.

5.2.4. Konklúziók és jövőbeni tervek

Eredményeim a praeclampsia és HELLP szindróma patomechanizmusának újabb aspektusait tárták fel. Bemutattam, hogy a különböző stresszfaktorok hogyan befolyásolhatják a villosus trophoblastok működését ezen két kórképben, és hogy milyen jelátviteli útvonalakat aktiválhatnak a károsodott méhlepényben. További terveim között szerepel a syndecan-1 és a protein kinázok terhességben betöltött fiziológiás szerepének további tisztázása, valamint expressziójuk és funkciójuk változásainak részletesebb megismerése a terhességi kórképek kialakulásában.

17. ábra. Összefoglaló ábra



A) A táblázat összefoglalja a kiválasztott gének expresszió változásait és a kiválasztott kinázok aktivációjának változásait mind a méhlepényi mintákban, mind pedig a háromféle stressz indukált BeWo sejtekben mindhárom betegcsoportban. A piros betűk a szignifikáns emelkedést, a narancssárga betűk az emelkedő tendenciát, míg a zöld betűk a szignifikáns csökkenést mutatják. A kék háttérrel jelzett adatok sugallják, hogy a villosus trophoblast ischaemia és hypoxia vezethet a talált jelátviteli útvonal és transzkripciós változásokhoz korai praeeklampsziában és HELLP szindrómában. A kináz inhibitoros kezelés a p38 kináz jelátviteli útvonal központi szerepét mutatja a trophoblast génexpressziójának változásaiban a különböző stressz kondíciók hatására. **B)** A villosus trophoblast p38 kináz jelátviteli útvonalának aktiválása lehet a kulcsmechanizmus a méhlepényi transzkripciós változásokhoz, és a következményesen kialakuló angiogén és anti-angiogén faktorok arányának felborulásához korai praeeklampsziában. Az ERK1/2 jelátviteli útvonal aktiválódása vezethet az intenzívebb transzkripciós változásokhoz, a méhlepényi gyulladáshoz és a cytotrophoblast proliferációhoz HELLP szindróma tüneteit mutató praeeklampsziás betegekben, összehasonlítva a HELLP szindróma tüneteit nem mutató praeeklampsziás betegekkel [47].

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A syndecan-1 érett, normál méhlepényekben a syncytiotrophoblastban, főleg az apikális membránon lokalizálódik;
2. Kontroll méhlepényekben a syndecan-1 immunfestődés erőssége a syncytiotrophoblastban és annak apikális membránján a terhességi kor növekedésével nem változik;
3. A syncytiotrophoblast apikális membrán syndecan-1 immunfestődése erősebb korai és késői praeclampsziában valamint HELLP szindrómában kontrollokhoz képest;
4. A *SDC1* génexpresszió nem változik sem korai praeclampsziás, sem HELLP szindrómások méhlepényében a korai kontrollokhoz képest;
5. Az anyai szérum syndecan-1 koncentráció pozitívan korrelál a terhességi korrall és a születési súllyal, ugyanakkor negatívan korrelál a vérnyomás és a proteinuria mértékével;
6. Az anyai szérum syndecan-1 koncentráció alacsonyabb a praeclampsziás csoportban mint a hasonló terhességi korú kontroll csoportban;
7. Az SGA-val szövődött praeclampsziás terhesek szérum syndecan-1 koncentrációja nem különbözik az SGA-val nem szövődött praeclampsziás terhesekétől;
8. Az aktin citoszkeleton károsodása a syndecan-1 akkumulálódásához vezet a BeWo sejtek syncytiotrophoblastjának citoplazmájában, míg az ischaemiás stressz fokozza a BeWo sejtekről a syndecan-1 sheddingjét;
9. A villosus trophoblastok pp38 kináz immunfestődése erősebb a korai praeclampsziás terhesek méhlepényeiben, főleg HELLP szindrómás esetekben, a korai kontroll csoport méhlepényeihez képest;

10. A pERK1/2 immunfestődés erősebb a HELLP szindrómás terhesek méhlepényeiben, mint a korai kontroll csoport méhlepényeiben;
11. A differenciálódó BeWo sejtekben az ischaemia emeli a *LEP* expressziót, valamint növeli a JNK és csökkenti az ERK1/2 kinázok aktivitását;
12. A differenciálódó BeWo sejtekben a hypoxia emeli az *FLT1* és csökkenti a *PGF* expressziót, valamint növeli az ERK1/2, JNK, és p38 kinázok aktivitását;
13. A differenciálódó BeWo sejtekben az IL-1 β kezelés csökkenti a *PGF* expressziót, valamint növeli a JNK és p38 kinázok aktivitását;
14. A vizsgált MAPK kináz útvonalak közül a p38 jelátviteli útnak van a legnagyobb hatása a stressz indukálta *LEP*, *FLT1* és *PGF* expresszió változására BeWo sejtekben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A praeclampsia és HELLP szindróma fő okai az anyai és perinatális megbetegedéseknek és halálozásoknak világszerte. Valószínűsíthető, hogy a korai placenta fejlődési zavar következtében kialakult hypoxiás és ischaemiás állapotok miatt károsodott méhlepénynek és villosus trophoblastnak kulcsfontosságú szerepe van az angiogén és anti-angiogén faktorok egyensúlyának felborításán keresztül ezen szülészeti kórképek kialakulásában. Kutatómunkámban célom volt ezen kórképek méhlepényi patomechanizmusának vizsgálata különböző jelátviteli útvonalak analízisével.

A syndecan-1 a placentában nagy mennyiségben termelődő sejtfelszíni proteoglikán, amihez számos angiogén és növekedési faktor kapcsolódni képes, ezáltal jelátviteli folyamatokat befolyásolhat. A syndecan-1 a chorionbolyhokban leginkább a syncytiotrophoblast apikális membránjára lokalizálódik és expressziója a villosus trophoblast differenciációjával kapcsolt. Praeclampsias és HELLP szindrómás betegek méhlepényeiben a syncytiotrophoblast syndecan-1 immunfestődése erősebb a kontroll méhlepényekhez képest, a szérum syndecan-1 koncentráció pedig csökkent a praeclampsias terhesek szérumában. A praeclampsiasban megfigyeltekhez hasonlóan változik BeWo sejtekben a syndecan-1 citoplazmáris transzportja és sheddingje ischaemia és az aktin citoszkeleton károsodásának hatására. Eredményeink arra utalnak, hogy ezen sejtszintű patomechanizmusok jelentősen befolyásolhatják a villosus trophoblast jelátviteli útvonalait praeclampsiasban és HELLP szindrómában.

A villosus trophoblast Akt-1 és MAPK jelátviteli útvonalainak vizsgálatakor megállapítottuk, hogy korai praeclampsias és HELLP szindrómás méhlepényekben a legkifejezettebb növekedés a pp38 kináz immunfestődésben van korai kontrollok méhlepényeihez képest, ami villosus trophoblast stresszre utal. HELLP szindrómában emellett a trophoblast ERK1/2 aktivitás növekedése is megfigyelhető. Differenciálódó BeWo sejteken ischaemia és hypoxia hatása tudja legjobban előidézni a praeclampsias terhesek méhlepényeiben talált génexpressziós és kináz aktivitás változásokat. Ischaemiás és hypoxiás stressz kondíciókban pedig a p38 jelátviteli útvonal van a legnagyobb hatással a BeWo sejtek *LEP*, *FLT1* és *PGF* expressziójára, ami szintén a trophoblast p38 kináz aktiválódásának praeclampsiasban betöltött szerepére enged következtetni.

Eredményeim a praeclampsia és HELLP szindróma patomechanizmusainak új aspektusait tárták fel és remélhetőleg elősegítik majd a méhlepényi kóreredetük tisztázását.

8. SUMMARY

Praeclampsia and HELLP syndrome are major causes of maternal and perinatal mortality and morbidity worldwide. It has been suggested that abnormal placentation in early pregnancy leads to hypoxic-ischemic stress of the placenta and the villous trophoblast, resulting in the development of an angiogenic/anti-angiogenic imbalance and clinical symptoms in these syndromes. I aimed to study how stress and various signaling pathways influence trophoblastic functions in distinct subforms of these syndromes.

Syndecan-1 is a cell-surface heparan-sulfate proteoglycan highly expressed in the placenta and involved in the regulation of cell signaling through binding to angiogenic and growth factors. Syndecan-1 is localized mainly to the apical membrane of the syncytiotrophoblast, and its expression is dependent on villous trophoblast differentiation. In cases of early-onset preeclampsia with or without HELLP syndrome, syndecan-1 immunostaining in the syncytiotrophoblast is stronger than in controls, while maternal serum syndecan-1 concentrations are lower in preeclampsia compared to controls. Similar to that seen in preeclampsia, the cytoplasmic transport and shedding of syndecan-1 are altered in BeWo cells due to ischemic stress and the disruption of the actin cytoskeleton. Our results suggest that these cellular pathomechanisms may impact villous trophoblast signaling pathways in preeclampsia and HELLP syndrome.

From the investigated Akt-1 and MAPK signaling pathways of the villous trophoblast, the most significant increase in immunoscores was found for the activated pp38 kinase in preterm preeclampsia and HELLP syndrome compared to preterm controls, which suggests villous trophoblastic stress. In addition, HELLP syndrome is also characterized by the activation of trophoblastic ERK1/2. In differentiating BeWo cells, hypoxia and ischaemia can best mimic the changes in placental gene expressions and kinase activities found in preterm preeclampsia. In ischemic and hypoxic stress conditions, the p38 signaling pathway has the most impact on *LEP*, *FLT1* and *PGF* expression in BeWo cells, supporting the role of trophoblastic p38 signaling pathway activation in the development of preeclampsia.

My results uncovered new aspects of the complex pathomechanisms of preeclampsia and HELLP syndrome, and they will hopefully promote the delineation of the placental origins of these severe obstetrical syndromes.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet* 365:9461:785-799.
2. Than NG, Vaisbuch E, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Erez O, Yeo L, Mittal P, Hupuczi P, Varkonyi T, Hassan SS, Papp Z, Romero R, Early-Onset Preeclampsia and HELLP Syndrome: An Overview, in *Handbook of growth and growth monitoring in health and disease.*, VR Preedy, Editor. 2012, Springer: Heidelberg. p. 1867–1891.
3. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. (2008) Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 59:61-78.
4. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. (2003) Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 22:143-148.
5. (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 99:159-167.
6. Pritchard JA, Weisman R, Jr., Ratnoff OD, Vosburgh GJ. (1954) Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. *N Engl J Med* 250:89-98.
7. Weinstein L. (1982) Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 142:159-167.
8. Barton JR, Sibai BM. (2004) Diagnosis and management of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Clin Perinatol* 31:807-833, vii.
9. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. (2009) The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth* 9:8.
10. Rath W, Faridi A, Dudenhausen JW. (2000) HELLP syndrome. *J Perinat Med* 28:249-260.
11. Baxter JK, Weinstein L. (2004) HELLP syndrome: the state of the art. *Obstet Gynecol Surv* 59:838-845.
12. 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.

13. Cox P, Marton T. (2009) Pathological assessment of intrauterine growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 236:751-764.
14. Hupuczi P, Rigo B, Sziller I, Szabo G, Szigeti Z, Papp Z. (2006) Follow-up analysis of pregnancies complicated by HELLP syndrome. *Fetal Diagn Ther* 216:519-522.
15. Duckitt K, Harrington D. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 3307491:565.
16. Sibai BM, Ewell M, Levine RJ, Klebanoff MA, Esterlitz J, Catalano PM, Goldenberg RL, Joffe G. (1997) Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 1775:1003-1010.
17. Laasanen J, Hiltunen M, Romppanen EL, Punnonen K, Mannermaa A, Heinonen S. (2003) Microsatellite marker association at chromosome region 2p13 in Finnish patients with preeclampsia and obstetric cholestasis suggests a common risk locus. *Eur J Hum Genet* 113:232-236.
18. Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Haiva-Mallinen L, Sundstrom H, Laitinen T, Kaaja R, Ylikorkala O, Kere J. (2003) Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 721:168-177.
19. Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebourcet R, Mondon F, Letourneur F, Mignot TM, Barbaux S, Vaiman D. (2008) STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One* 312:e3905.
20. Cudihy D, Lee RV. (2009) The pathophysiology of pre-eclampsia: current clinical concepts. *J Obstet Gynaecol* 297:576-582.
21. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. (2002) The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 3461:33-38.
22. Trogstad L, Skrandal A, Stoltenberg C, Magnus P, Nesheim BI, Eskild A. (2004) Recurrence risk of preeclampsia in twin and singleton pregnancies. *Am J Med Genet A* 126A1:41-45.

23. Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizan JM, Kafury-Goeta AC. (1999) Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 181:1026-1035.
24. Repke JT. (1991) Prevention of preeclampsia. *Clin Perinatol* 18:779-792.
25. Thangaratinam S, Langenveld J, Mol BW, Khan KS. (2011) Prediction and primary prevention of pre-eclampsia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25:419-433.
26. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-Tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine RJ, Karumanchi SA. (2008) A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21:9-23.
27. Chaiworapongsa T, Romero R, Savasan ZA, Kusanovic JP, Ogge G, Soto E, Dong Z, Tarca A, Gaurav B, Hassan SS. (2011) Maternal plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 24:1187-1207.
28. Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, Gotsch F, Edwin S, Nien JK, Chaiworapongsa T, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Than NG, Gomez R, Hassan SS. (2008) The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21:279-287.
29. Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Tarca AL, Gervasi MT, Kusanovic JP, Mittal P, Ogge G, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Dong Z, Kim SK, Yeo L, Hassan SS. (2010) An imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors precedes fetal death in a subset of patients: results of a longitudinal study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23:1384-1399.
30. Papp Z. (2007) A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Semmelweis Kiadó

31. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508-1518.
32. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Than NG, Papp Z, Jai Kim C. (2006) Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med* 34:447-458.
33. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. (2011) The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 204:193-201.
34. Brosens IA. (1977) Morphological changes in the utero-placental bed in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol* 43:573-593.
35. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27:939-958.
36. Burton GJ, Jauniaux E. (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25:287-299.
37. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. (2009) Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 30:473-482.
38. Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. (2003) The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol* 189:1173-1177.
39. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. (1996) Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 97:540-550.
40. 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 Suppl A:S43-48.
41. Borzsonyi B, Demendi C, Rigo J, Jr., Szentpeteri I, Rab A, Joo JG. (2013) The regulation of apoptosis in intrauterine growth restriction: a study of Bcl-2 and Bax gene expression in human placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26:347-350.

42. Cindrova-Davies T. (2009) Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta* 30 Suppl A:S55-65.
43. Staff AC, Dechend R, Pijnenborg R. (2010) Learning from the placenta: acute atherosclerosis and vascular remodeling in preeclampsia-novel aspects for atherosclerosis and future cardiovascular health. *Hypertension* 56:1026-1034.
44. Staff AC, Dechend R, Redman CW. (2013) Review: Preeclampsia, acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease: two new hypotheses. *Placenta* 34 Suppl:S73-78.
45. Sebire NJ, Goldin RD, Regan L. (2005) Term preeclampsia is associated with minimal histopathological placental features regardless of clinical severity. *J Obstet Gynaecol* 252:117-118.
46. Smulian J, Shen-Schwarz S, Scorza W, Kinzler W, Vintzileos A. (2004) A clinicohistopathologic comparison between HELLP syndrome and severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 165:287-293.
47. Varkonyi T, Nagy B, Fule T, Tarca AL, Karaszi K, Schonleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigo J, Jr., Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG. (2011) Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta* 32 Suppl:S21-29.
48. Centlow M, Wingren C, Borrebaeck C, Brownstein MJ, Hansson SR. (2011) Differential gene expression analysis of placentas with increased vascular resistance and pre-eclampsia using whole-genome microarrays. *J Pregnancy*:472354.
49. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Udagawa Y. (2007) Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia. *Placenta* 285-6:487-497.
50. Reimer T, Koczan D, Gerber B, Richter D, Thiesen HJ, Friese K. (2002) Microarray analysis of differentially expressed genes in placental tissue of pre-eclampsia: up-regulation of obesity-related genes. *Mol Hum Reprod* 87:674-680.

51. Kleinrouweler CE, van Uitert M, Moerland PD, Ris-Stalpers C, van der Post JA, Afink GB. (2013) Differentially expressed genes in the pre-eclamptic placenta: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 87:e68991.
52. Kovalszky I, Dudas J, Gallai M, Hollosi P, Tatrai P, Tatrai E, Schaff Z. (2004) [Proteoglycans in the liver]. *Magy Onkol* 483:207-213.
53. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 773:638-643.
54. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1733 Pt 1:753-759.
55. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1813:2221-2230.
56. Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ, Weich H, Ahmed A. (1996) Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* 133-4:243-250,color plates I-II,pre bk cov.
57. Athanassiades A, Lala PK. (1998) Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 197:465-473.
58. Knudsen UB, Kronborg CS, von Dadelszen P, Kupfer K, Lee SW, Vittinghus E, Allen JG, Redman CW. (2012) A single rapid point-of-care placental growth factor determination as an aid in the diagnosis of preeclampsia. *Pregnancy Hpertension* 2(1):8-15.
59. Hassan MF, Rund NM, Salama AH. (2013) An Elevated Maternal Plasma Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 to Placental Growth Factor Ratio at Midtrimester Is a Useful Predictor for Preeclampsia. *Obstet Gynecol Int* 2013:202346.
60. Rizos D, Eleftheriades M, Karampas G, Rizou M, Haliassos A, Hassiakos D, Vitoratos N. (2013) Placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 are useful markers for the prediction of preeclampsia but not for small

- for gestational age neonates: a longitudinal study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1712:225-230.
61. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 3507:672-683.
 62. Molvarec A, Gullai N, Stenczer B, Fugedi G, Nagy B, Rigo 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.
 63. Gullai N, Stenczer B, Molvarec A, Fugedi G, Veresh Z, Nagy B, Rigo J, Jr. (2013) Evaluation of a rapid and simple placental growth factor test in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res* 365:457-462.
 64. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 1115:649-658.
 65. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I. (2006) Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2914:R1085-1093.
 66. Powers RW, Jeyabalan A, Clifton RG, Van Dorsten P, Hauth JC, Klebanoff MA, Lindheimer MD, Sibai B, Landon M, Miodovnik M. (2010) Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PLoS One* 510:e13263.
 67. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. (2003) Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 885:2348-2351.
 68. McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM, Hunter AJ, McClure N. (2004) Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased

- throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol* 1914:1240-1246.
69. Shibata E, Rajakumar A, Powers RW, Larkin RW, Gilmour C, Bodnar LM, Crombleholme WR, Ness RB, Roberts JM, Hubel CA. (2005) Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 908:4895-4903.
 70. Lapaire O, Shennan A, Stepan H. (2010) The preeclampsia biomarkers soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor: current knowledge, clinical implications and future application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1512:122-129.
 71. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 75:575-583.
 72. Baumwell S, Karumanchi SA. (2007) Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract* 1062:c72-81.
 73. Aronow BJ, Richardson BD, Handwerger S. (2001) Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiol Genomics* 62:105-116.
 74. Cox B, Sharma P, Evangelou AI, Whiteley K, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Baczyk D, Czikk M, Kingdom J, Rossant J, Gramolini AO, Adamson SL, Kislinger T. (2011) Translational analysis of mouse and human placental protein and mRNA reveals distinct molecular pathologies in human preeclampsia. *Mol Cell Proteomics* 1012:M111 012526.
 75. Cudmore MJ, Ahmad S, Sissaoui S, Ramma W, Ma B, Fujisawa T, Al-Ani B, Wang K, Cai M, Crispi F, Hewett PW, Gratacos E, Egginton S, Ahmed A. (2012) Loss of Akt activity increases circulating soluble endoglin release in

- preeclampsia: identification of inter-dependency between Akt-1 and heme oxygenase-1. *Eur Heart J* 339:1150-1158.
76. Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA. (2008) Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995:566 e561-511.
 77. Guller S, Buhimschi CS, Ma YY, Huang ST, Yang L, Kuczynski E, Zambrano E, Lockwood CJ, Buhimschi IA. (2008) Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia. *Lab Invest* 8810:1057-1067.
 78. Hertig A, Liere P. (2010) New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 41121-22:1591-1595.
 79. Junus K, Centlow M, Wikstrom AK, Larsson I, Hansson SR, Olovsson M. Gene expression profiling of placentae from women with early- and late-onset preeclampsia: down-regulation of the angiogenesis-related genes ACVRL1 and EGFL7 in early-onset disease. *Mol Hum Reprod* 183:146-155.
 80. Knofler M. (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 542-3:269-280.
 81. Maynard SE, Moore Simas TA, Bur L, Crawford SL, Solitro MJ, Meyer BA. (2010) Soluble endoglin for the prediction of preeclampsia in a high risk cohort. *Hypertens Pregnancy* 293:330-341.
 82. 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* 126:642-649.
 83. El Shahat AM, Ahmed AB, Ahmed MR, Mohamed HS. (2013) Maternal serum leptin as a marker of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2886:1317-1322.
 84. Maymo JL, Perez AP, Gambino Y, Calvo JC, Sanchez-Margalet V, Varone CL. (2011) Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta* 32 Suppl 2:S146-153.

85. Rytlewski K, Huras H, Kusmierska-Urban K, Galas A, Reron A. (2012) Leptin and interferon-gamma as possible predictors of cesarean section among women with hypertensive disorders of pregnancy. *Med Sci Monit* 188:CR506-511.
86. Wang S, Qiao FY, Feng L. (2013) High leptin level and leptin receptor Lys656Asn variant are risk factors for preeclampsia. *Genet Mol Res* 123:2416-2422.
87. Teppa RJ, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM. (2000) Free leptin is increased in normal pregnancy and further increased in preeclampsia. *Metabolism* 498:1043-1048.
88. Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y. (2008) Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients. *Endocr J* 553:565-573.
89. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 111:1155-1161.
90. Linnemann K, Malek A, Schneider H, Fusch C. (2001) Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. *Biochem Soc Trans* 29Pt 2:86-90.
91. Weissgerber TL, Wolfe LA. (2006) Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. *Appl Physiol Nutr Metab* 311:1-11.
92. Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C. (2006) The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 183:297-303.
93. Fruhbeck G. (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393Pt 1:7-20.
94. Rigo J, Szendei G, Rosta K, Fekete A, Bogi K, Molvarec A, Ronai Z, Ver A. (2006) Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. *Gynecol Endocrinol* 229:521-525.
95. Cheng YH, Nicholson RC, King B, Chan EC, Fitter JT, Smith R. (2000) Glucocorticoid stimulation of corticotropin-releasing hormone gene expression requires a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element in human

- primary placental cytotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1937-1945.
96. Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. (2003) The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem* 49:727-731.
 97. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, Okazaki S, Chiba H, Okai T. (2007) Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Chem* 53:399-404.
 98. Crocker I. (2007) Gabor Than Award Lecture 2006: pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities. *Placenta* 28 Suppl A:S4-13.
 99. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. (2009) Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 24:147-158.
 100. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *The American journal of pathology* 170:1511-1520.
 101. Cindrova-Davies T, Yung HW, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, Burton GJ, Charnock-Jones DS. (2007) Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol* 171:1168-1179.
 102. Delidaki M, Gu M, Hein A, Vatish M, Grammatopoulos DK. (2011) Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol* 332:2:213-220.
 103. Li W, Li H, Bocking AD, Challis JR. (2010) Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFkB and MAPK1/3 pathway. *Biol Reprod* 83:481-487.

104. Than NG, Erez O, Wildman DE, Tarca AL, Edwin SS, Abbas A, Hotra J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan SS, Espinoza J, Papp Z, Romero R. (2008) Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Fetal Neonatal Med* 217:429-442.
105. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. (1998) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1791:80-86.
106. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. (1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1802 Pt 1:499-506.
107. Roberts JM. (1999) Objective evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia. *Am J Kidney Dis* 335:992-997.
108. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. (2001) Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1854:792-797.
109. Chaiworapongsa T, Gervasi MT, Refuerzo J, Espinoza J, Yoshimatsu J, Berman S, Romero R. (2002) Maternal lymphocyte subpopulations (CD45RA+ and CD45RO+) in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1874:889-893.
110. Roberts JM, Lain KY. (2002) Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 235:359-372.
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. Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 3085728:1592-1594.
113. Luppi P, Tse H, Lain KY, Markovic N, Piganelli JD, DeLoia JA. (2006) Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway. *Am J Reprod Immunol* 562:135-144.
114. Shah TJ, Walsh SW. (2007) Activation of NF-kappaB and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1961:48 e41-48.
115. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J, Jr., Romero R, Papp Z. (2008) Placental protein 13 (galectin-13) has

- decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch* 4534:387-400.
116. Fischer I, Weber M, Kuhn C, Fitzgerald JS, Schulze S, Friesse K, Walzel H, Markert UR, Jeschke U. (2011) Is galectin-1 a trigger for trophoblast cell fusion?: the MAP-kinase pathway and syncytium formation in trophoblast tumour cells BeWo. *Mol Hum Reprod* 1712:747-757.
 117. Szalai G, Romero R, Chaiworapongsa T, Xu Y, Wang B, Ahn H, Xu Z, Chiang P.J, Sundell B, Wang R, Jiang Y, Plazyo O, Olive M, Tarca AL, Dong Z, Qureshi F, Papp Z, Hassan SS, Hernandez-Andrade E, NG. T. (2013) Full-length human placental sFlt-1-e15a isoform induces distinct maternal phenotypes of preeclampsia in mice. *Plos One* submitted
 118. 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. (2014) In Vivo Experiments Reveal the Good, the Bad and the Ugly Faces of sFlt-1 in Pregnancy. *PLoS One* 911:e110867.
 119. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. (2000) Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1836:1554-1557.
 120. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. (2003) Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1881:177-182.
 121. Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ. (1998) Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 1796 Pt 1:1539-1544.
 122. Banyasz I, Szabo S, Bokodi G, Vannay A, Vasarhelyi B, Szabo A, Tulassay T, Rigo J, Jr. (2006) Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 124:233-236.

123. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. (2002) Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 131:260-264.
124. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. (2000) Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 128:1232-1235.
125. 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* 1604:1405-1423.
126. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sherif DD, Esakof DD, Chaudhry GM, Symes JF, Isner JM. (1997) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1711:2793-2800.
127. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 276:838-844.
128. Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP, Tofukuji M, Sellke FW, Bunting S, Simons M. (1997) Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol* 2733 Pt 2:H1317-1323.
129. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. (1999) Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 27435:25130-25135.
130. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2004) Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol* 246:548-556.
131. Bischof P, Irminger-Finger I. (2005) The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol* 371:1-16.

132. Aplin JD. (2010) Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. *Int J Dev Biol* 542-3:323-329.
133. Huppertz B. (2008) Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 514:970-975.
134. Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL, Redman CW, Lee JM, Freeman TC. (2004) An analysis using DNA microarray of the time course of gene expression during syncytialization of a human placental cell line (BeWo). *Placenta* 256:479-488.
135. Ge YC, Li JN, Ni XT, Guo CM, Wang WS, Duan T, Sun K. (2011) Cross talk between cAMP and p38 MAPK pathways in the induction of leptin by hCG in human placental syncytiotrophoblasts. *Reproduction* 1422:369-375.
136. Maymo JL, Perez Perez A, Maskin B, Duenas JL, Calvo JC, Sanchez Margalet V, Varone CL. (2012) The alternative Epac/cAMP pathway and the MAPK pathway mediate hCG induction of leptin in placental cells. *PloS One* 710:e46216.
137. Uh A, Simmons CF, Bresee C, Khoury N, Gombart AF, Nicholson RC, Kocak H, Equils O. (2009) MyD88 and TRIF mediate the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) induced corticotropin releasing hormone (CRH) expression in JEG3 choriocarcinoma cell line. *Reprod Biol Endocrinol* 7:74.
138. van der Laan S dKE, Meijer OC. (2009) Timing Is Critical for Effective Glucocorticoid Receptor Mediated Repression of the Camp-Induced Crh Gene. *PloS One* 4 (1):e4327
139. Fahlbusch FB, Ruebner M, Volkert G, Offergeld R, Hartner A, Menendez-Castro C, Strick R, Rauh M, Rascher W, Dotsch J. (2012) Corticotropin-releasing hormone stimulates expression of leptin, 11beta-HSD2 and syncytin-1 in primary human trophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol* 10:80.
140. Karteris E, Vatish M, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. (2005) Preeclampsia is associated with impaired regulation of the placental nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway by corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-related peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 906:3680-3687.
141. Chen CP, Chen CY, Yang YC, Su TH, Chen H. (2004) Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta* 255:413-421.

142. Chiang MH, Liang FY, Chen CP, Chang CW, Cheong ML, Wang LJ, Liang CY, Lin FY, Chou CC, Chen H. (2009) Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J Biol Chem* 284:17411-17419.
143. 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. (2014) Evolutionary origins of the placental expression of Chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta* submitted
144. Yu C, Shen K, Lin M, Chen P, Lin C, Chang GD, Chen H. (2002) GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem* 277:50062-50068.
145. Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G. (2014) Evolutionary origins of the placental expression of Chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta* submitted
146. Romero R, Kusanovic JP, Than NG, Erez O, Gotsch F, Espinoza J, Edwin S, Chefetz I, Gomez R, Nien JK, Sammar M, Pineles B, Hassan SS, Meiri H, Tal Y, Kuhnreich I, Papp Z, Cuckle HS. (2008) First-trimester maternal serum PP13 in the risk assessment for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 192:122 e121-122 e111.
147. Desforges M, Sibley CP. (2010) Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* 54:377-390.
148. Crescimanno C, Marzioni D, Paradinas FJ, Schrurs B, Muhlhauser J, Todros T, Newlands E, David G, Castellucci M. (1999) Expression pattern alterations of syndecans and glypican-1 in normal and pathological trophoblast. *J Pathol* 189:600-608.
149. Jokimaa V, Inki P, Kujari H, Hirvonen O, Ekholm E, Anttila L. (1998) Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua. *Placenta* 19:157-163.

150. Jokimaa VI, Kujari HP, Ekholm EM, Inki PL, Anttila L. (2000) Placental expression of syndecan 1 is diminished in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 183:1495-1498.
151. Ogawa M, Yanoma S, Nagashima Y, Okamoto N, Ishikawa H, Haruki A, Miyagi E, Takahashi T, Hirahara F, Miyagi Y. (2007) Paradoxical discrepancy between the serum level and the placental intensity of PP5/TFPI-2 in preeclampsia and/or intrauterine growth restriction: possible interaction and correlation with glypican-3 hold the key. *Placenta* 28:224-232.
152. Teng YH, Aquino RS, Park PW. (2012) Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol* 31:3-16.
153. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD. (2010) Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood* 115:2449-2457.
154. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74:385-410.
155. Hayashida K, Parks WC, Park PW. (2009) Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood* 114:3033-3043.
156. Tal R. (2012) The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha in preeclampsia pathogenesis. *Biol Reprod* 87:134.
157. Luo X, Yao ZW, Qi HB, Liu DD, Chen GQ, Huang S, Li QS. (2011) Gadd45alpha as an upstream signaling molecule of p38 MAPK triggers oxidative stress-induced sFlt-1 and sEng upregulation in preeclampsia. *Cell Tissue Res* 344:551-565.
158. Park JK, Jeong JW, Kang MY, Baek JC, Shin JK, Lee SA, Choi WS, Lee JH, Paik WY. (2010) Inhibition of the PI3K-Akt pathway suppresses sFlt1 expression in human placental hypoxia models in vitro. *Placenta* 31:621-629.
159. Skurk T, van Harmelen V, Blum WF, Hauner H. (2005) Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res* 13:969-973.

160. Xiong Y, Liebermann DA, Holtzman EJ, Jeronis S, Hoffman B, Geifman-Holtzman O. (2013) Preeclampsia-associated stresses activate Gadd45a signaling and sFlt-1 in placental explants. *J Cell Physiol* 228:362-370.
161. Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. (2010) Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta* 31:951-957.
162. Johnstone ED, Sibley CP, Lowen B, Guilbert LJ. (2005) Epidermal growth factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (p38 MAP kinase) activation. *Biology of reproduction* 73:1282-1288.
163. Kita N, Mitsushita J, Ohira S, Takagi Y, Ashida T, Kanai M, Nikaido T, Konishi I. (2003) Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts. *Placenta* 24:164-172.
164. Knofler M, Pollheimer J. (2012) IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta* 33 Suppl:S55-62.
165. Papp C, Szabo G, Toth-Pal E, Papp Z. (1991) [Fetal growth rate and its variations 1988/89]. *Orv Hetil* 132:1865-1866, 1869-1870.
166. Hargitai B, Marton T, Cox PM. (2004) Best practice no 178. Examination of the human placenta. *J Clin Pathol* 57:785-792.
167. Khong TY. (2001) A topographical and clinical approach to examination of the placenta. *Pathology* 33:174-186.
168. Redline RW. (2008) Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta* 29 Suppl A:S86-91.
169. Balogh A, Pozsgay J, Matko J, Dong Z, Kim CJ, Varkonyi T, Sammar M, Rigo J, Jr., Meiri H, Romero R, Papp Z, Than NG. (2011) Placental protein 13 (PP13/galectin-13) undergoes lipid raft-associated subcellular redistribution in the syncytiotrophoblast in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 205:156 e151-114.
170. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-1582.
171. Szabo S, Xu Y, Romero R, Fule T, Karaszi K, Bhatti G, Varkonyi T, Varkonyi I, Krenacs T, Dong Z, Tarca AL, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Papp Z,

- Kovalszky I, Than NG. (2013) Changes of placental syndecan-1 expression in preeclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch* 463:445-458.
172. Baczyk D, Drewlo S, Proctor L, Dunk C, Lye S, Kingdom J. (2009) Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death Differ* 165:719-727.
 173. Cameo P, Bischof P, Calvo JC. (2003) Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod* 682:472-477.
 174. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. (1997) Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 188:657-665.
 175. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, Acharya G. (2009) Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 305:424-433.
 176. Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. (2003) Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 104:178-188.
 177. Szabo S, Mody M, Romero R, Xu Y, Karaszi K, Mihalik N, Xu Z, Bhatti G, Fule T, Hupuczi P, Krenacs T, Rigo Jr. J, Tarca AL, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kovalszky I, Papp Z, Than NG. (2014) Activation of villous trophoblastic p38 and ERK1/2 signaling pathways in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Pathol Oncol Res* DOI: 10.1007/s12253-014-9872-9
 178. Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L, Lafond J. (2005) ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 566Pt 2:409-423.
 179. Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. (2005) Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 88:181-199.
 180. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in

- response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol* 1705:1511-1520.
181. Lorenzi T, Turi A, Crescimanno C, Morroni M, Castellucci M, David G, Tranquilli AL, Marzioni D. (2010) Syndecan expressions in the human amnion and chorionic plate. *Eur J Histochem* 544:e42.
 182. Mathe M, Suba Z, Nemeth Z, Tatrai P, Fule T, Borgulya G, Barabas J, Kovalszky I. (2006) Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas. *Oral Oncol* 425:493-500.
 183. Sebestyen A, Kovalszky I, Mihalik R, Gallai M, Bocsi J, Laszlo E, Benedek S, Sreter L, Kopper L. (1997) Expression of syndecan-1 in human B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer* 3313:2273-2277.
 184. Tatrai P, Egedi K, Somoracz A, van Kuppevelt TH, Ten Dam G, Lyon M, Deakin JA, Kiss A, Schaff Z, Kovalszky I. (2010) Quantitative and qualitative alterations of heparan sulfate in fibrogenic liver diseases and hepatocellular cancer. *J Histochem Cytochem* 585:429-441.
 185. Zong F, Fthenou E, Castro J, Peterfia B, Kovalszky I, Szilak L, Tzanakakis G, Dobra K. (2010) Effect of syndecan-1 overexpression on mesenchymal tumour cell proliferation with focus on different functional domains. *Cell Prolif* 431:29-40.
 186. Zong F, Fthenou E, Mundt F, Szatmari T, Kovalszky I, Szilak L, Brodin D, Tzanakakis G, Hjerpe A, Dobra K. (2011) Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PLoS One* 66:e14816.
 187. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Lutz RJ, Yasui H, Okawa Y, Kiziltepe T, Vallet S, Pozzi S, Santo L, Perrone G, Tai YT, Cirstea D, Raje NS, Uherek C, Dalken B, Aigner S, Osterroth F, Munshi N, Richardson P, Anderson KC. (2009) The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 1512:4028-4037.
 188. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. (1999) Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating

- the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 104:152-162.
189. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. (2003) Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 24:219-226.
 190. Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic JP, Yeo L, Kim CJ, Hassan SS. (2011) Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med* 39:641-652.
 191. Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, Yoo W, Dong Z, Topping V, Gotsch F, Yoon BH, Chi JG, Kim JS. (2010) The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod Pathol* 23:1000-1011.
 192. Hofmann-Kiefer KF, Knabl J, Martinoff N, Schiessl B, Conzen P, Rehm M, Becker BF, Chappell D. (2013) Increased serum concentrations of circulating glycocalyx components in HELLP syndrome compared to healthy pregnancy: an observational study. *Reprod Sci* 20:318-325.
 193. Mayhew TM, Wadrop E, Simpson RA. (1994) Proliferative versus hypertrophic growth in tissue subcompartments of human placental villi during gestation. *J Anat* 184 (Pt 3):535-543.
 194. Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. (1986) Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 103 Pt 2:2683-2696.
 195. Kang JH, Song H, Yoon JA, Park DY, Kim SH, Lee KJ, Farina A, Cho YK, Kim YN, Park SW, Kim GJ, Shim SH, Cha DH. (2011) Preeclampsia leads to dysregulation of various signaling pathways in placenta. *J Hypertens* 29:928-936.
 196. Johnstone ED, Sawicki G, Guilbert L, Winkler-Lowen B, Cadete VJ, Morrish DW. (2011) Differential proteomic analysis of highly purified placental cytotrophoblasts in pre-eclampsia demonstrates a state of increased oxidative

- stress and reduced cytotrophoblast antioxidant defense. *Proteomics* 1120:4077-4084.
197. Riquelme G, Vallejos C, de Gregorio N, Morales B, Godoy V, Berrios M, Bastias N, Rodriguez C. (2011) Lipid rafts and cytoskeletal proteins in placental microvilli membranes from preeclamptic and IUGR pregnancies. *J Membr Biol* 2413:127-140.
 198. Jones CJ, Fox H. (1980) An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. *Placenta* 11:61-76.
 199. Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ. (2000) Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J* 351 Pt 3:607-612.
 200. Paris S, Burlacu A, Durocher Y. (2008) Opposing roles of syndecan-1 and syndecan-2 in polyethyleneimine-mediated gene delivery. *J Biol Chem* 28312:7697-7704.
 201. Godoy V, Riquelme G. (2008) Distinct lipid rafts in subdomains from human placental apical syncytiotrophoblast membranes. *J Membr Biol* 2241-3:21-31.
 202. Drewlo S, Czikk M, Baczyk D, Lye S, Kingdom J. (2011) Glial cell missing-1 mediates over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in severe pre-eclamptic placental villi. *Hum Reprod* 265:1025-1034.
 203. Andraweera PH, Dekker GA, Laurence JA, Roberts CT. (2012) Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta* 336:467-472.
 204. Blair JD, Yuen RK, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. (2013) Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 1910:697-708.
 205. Hogg K, Blair JD, von Dadelszen P, Robinson WP. (2013) Hypomethylation of the LEP gene in placenta and elevated maternal leptin concentration in early onset pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 3671-2:64-73.
 206. Sundrani DP, Reddy US, Joshi AA, Mehendale SS, Chavan-Gautam PM, Hardikar AA, Chandak GR, Joshi SR. (2013) Differential placental methylation and expression of VEGF, FLT-1 and KDR genes in human term and preterm preeclampsia. *Clin Epigenetics* 51:6.

207. Xiang Y, Cheng Y, Li X, Li Q, Xu J, Zhang J, Liu Y, Xing Q, Wang L, He L, Zhao X. (2013) Up-regulated expression and aberrant DNA methylation of LEP and SH3PXD2A in pre-eclampsia. *PLoS One* 83:e59753.
208. Roux PP, Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 682:320-344.
209. Kovalszky H, Gallai M, Armbrust T, Ramadori G. (1994) Syndecan-1 gene expression in isolated rat liver cells (hepatocytes, Kupffer cells, endothelial and Ito cells). *Biochem Biophys Res Commun* 2042:944-949.
210. Kovalszky I, Schaff Z, Jeney A. (1993) Potential markers (enzymes, proteoglycans) for human liver tumors. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 645-6:157-163.
211. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. (2002) The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 1875:1416-1423.
212. Soto E, Romero R, Kusanovic JP, Ogge G, Hussein Y, Yeo L, Hassan SS, Kim CJ, Chaiworapongsa T. (2012) Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. *J Matern Fetal Neonatal Med* 255:498-507.
213. Roth S, Shaikh AR, Hennelly MM, Li Q, Bindokas V, Graham CE. (2003) Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 4412:5383-5395.
214. Armstrong SC. (2004) Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 613:427-436.
215. Dong Y, Liu HD, Zhao R, Yang CZ, Chen XQ, Wang XH, Lau LT, Chen J, Yu AC. (2009) Ischemia activates JNK/c-Jun/AP-1 pathway to up-regulate 14-3-3gamma in astrocyte. *J Neurochem* 109 Suppl 1:182-188.
216. E M Smith, E D Martin, S Verma, G F d Nicola, Marber MS. (2014) 22 Identifying the Substrates of P38 MAPK alpha in the Heart. *Heart* 100:A8
217. Jin N, Hatton N, Swartz DR, Xia X, Harrington MA, Larsen SH, Rhoades RA. (2000) Hypoxia activates jun-N-terminal kinase, extracellular signal-regulated

- protein kinase, and p38 kinase in pulmonary arteries. *Am J Respir Cell Mol Biol* 235:593-601.
218. Osorio-Fuentealba C, Valdes JA, Riquelme D, Hidalgo J, Hidalgo C, Carrasco MA. (2009) Hypoxia stimulates via separate pathways ERK phosphorylation and NF-kappaB activation in skeletal muscle cells in primary culture. *J Appl Physiol* (1985) 1064:1301-1310.
 219. Liu Q, Wang J, Liang Q, Wang D, Luo Y, Li J, Janicki JS, Fan D. (2014) Sparstolonin B attenuates hypoxia-reoxygenation-induced cardiomyocyte inflammation. *Exp Biol Med* (Maywood) 2393:376-384.
 220. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. (1999) Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 3112:2087-2099.
 221. Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. (2007) IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2922:H1139-1147.
 222. Pantouli E, Boehm MM, Koka S. (2005) Inflammatory cytokines activate p38 MAPK to induce osteoprotegerin synthesis by MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 3291:224-229.
 223. Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Dokladny K, Alhmoud T, Ereifej L, Said HM, Ma TY. (2013) Mechanism of IL-1beta modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation. *J Immunol* 19012:6596-6606.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Banyasz I, **Szabo S**, Bokodi G, Vannay A, Vasarhelyi B, Szabo A, Tulassay T, Rigo Jr. J. (2006) Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 124:233-236.
2. **Szabo S**, Xu Y, Romero R, Fule T, Karaszi K, Bhatti G, Varkonyi T, Varkonyi I, Krenacs T, Dong Z, Tarca AL, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Papp Z, Kovalszky I, Than NG. (2013) Changes of placental syndecan-1 expression in preeclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch* 463:445-458.
3. **Szabo S**, Mody M, Romero R, Xu Y, Karaszi K, Mihalik N, Xu Z, Bhatti G, Fule T, Hupuczi P, Krenacs T, Rigo Jr. J, Tarca AL, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kovalszky I, Papp Z, Than NG. (2014) Activation of villous trophoblastic p38 and ERK1/2 signaling pathways in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Pathol Oncol Res*, DOI: 10.1007/s12253-014-9872-9

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt megköszönöm Papp Zoltán Emeritus Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett doktori programban végezhettem kutatásaimat. Köszönöm feltétlen támogatását, útmutatását és hogy számomra kiváló kutatási lehetőséget biztosított a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb Maternity Klinikáján.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Than Nándor Gábornak mindennemű szakmai támogatását az elmúlt 10 évben a Semmelweis Egyetemen majd pedig a Wayne State Egyetemen. Köszönöm a lehetőséget, hogy csatlakozhattam a kutató csapatokhoz, melyeket nemzetközi kollaboráció keretében irányított. Hálás vagyok szakmai tanácsaiért, a kutatómunkámhoz biztosított pályázati támogatásáért, valamint a tudományos cikkek és téziseim megírásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Szeretném külön megköszönni Kovalszky Ilona Professzor Asszonynak, hogy az I.Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben nagy szeretettel fogadott, támogatásával és iránymutató tanácsaival munkámat segítette.

Ezúton fejezem ki köszönetemet Roberto Romero Professzor Úrnak a kollaborációs munkák támogatását, és kollégáinak a laboratóriumi vizsgálatokhoz nyújtott segítségüket a Wayne State Egyetemen és a National Institutes of Health Perinatológiai Kutatóközpontjában.

Köszönöm Rigó János Professzor Úr támogatását és a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak segítségét a klinikai mintagyűjtésben.

Köszönettel tartozom Dr. Füle Tibornak, Dr. Krenács Tibornak, Karászi Katalinnak, Dr. Mihalik Noéminak, Kiszler Gábornak és a 3DHistech Kft. munkatársainak az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezésében és a Panoramic Viewer program kifejlesztésében nyújtott segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hargitai Beátának és Dr. Schönleber Júliának a szövettani vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Adi L. Tarca-nak és munkatársainak a Wayne State Egyetemen a statisztikai analízisekhez adott támogatást.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Kar Morfológiai és Fiziológiai Tanszék előző és jelenlegi vezetőjének, Dr. Polgár Veronikának és Bednárikné Dr. Dörnyei Gabriellának, hogy támogattak és segítették munkámat.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom nagyszüleimnek, férjemnek és kisfiamnak a támogatásukért és a megértő türelmükért.