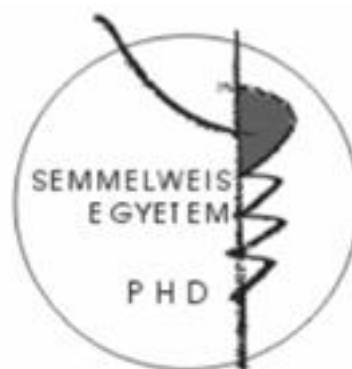


Molekuláris változások a szignáltranszdukciós útvonalakban praeclampsziában és HELLP szindrómában

Doktori tézisek

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

1. BEVEZETÉS

A praeclampsia és HELLP szindróma fő okai az anyai és perinatális megbetegedéseknek és halálozásoknak világszerte. Sajnos még célzott terápiás lehetőségek nem állnak rendelkezésre, és ezen kórképek egyetlen hatékony kezelése a terhesség befejezése. Ezért a nemzetközi kutatások fő célja, hogy korán kiszűrhetővé váljanak a magas kockázatú terhesek, illetve hogy kidolgozzanak olyan terápiás lehetőséget, amelyekkel biztosítható, hogy a terhesség minél tovább kiviselhető legyen anélkül, hogy az anya vagy a magzat egészségét veszélyeztetné.

Valószínűsíthető, hogy korai placentáris 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. 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 praeclampsziában. Emellett a villosus trophoblast különböző jelátviteli utainak aktiválódását is tanulmányoztuk, majd arra is kíváncsiak voltunk, hogy ezen jelátviteli útvonalak megváltozását milyen stressz állapotok idézhetik elő, és hogy ezek hogyan befolyásolják a méhlepényben a génexpressziót.

Azok közül a molekulák közül, melyek a placentáris jelátviteli útvonalakat befolyásolhatják, a syndecan-1 került a látókörrünkbe, mert erős expresszivitást mutat az emberi méhlepény syncytiotrophoblast rétegében, és számos angiogén és növekedési faktor képes kapcsolódni hozzá, ezáltal jelátviteli folyamatokat befolyásolhat. 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.

Kutatásunk fő célja volt még megvizsgálni, hogy stressz kondíciók és kináz útvonalak változásai hogyan befolyásolhatják a *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expresszióját a villosus trophoblastban. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában microarray vizsgálatot végeztünk praeclampsziás, HELLP szindrómás és kontroll terhesek lepenyeiből. Először újra megvizsgáltuk a microarray adatsorunkat, és kiválasztottunk négy gént (*FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF*), amelyek a villosus trophoblastban termelődnek, változik az expressziójuk a lepenyben praeclampsziában, és összefüggésbe hozhatók a betegség méhlepényi eredetével.

Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy egy összetett interakció zajlik praeclampszában a különböző stresszállapotok, trophoblastikus kináz jelátviteli útvonalak és a lepényi génextpressziós mintázat megváltozása valamint funkcionális változások között. Kutatásunk egyik célja volt, hogy a placentáris syndecan-1 jelátviteli molekula expressziójának változásait feltérképezzük a praeclampsia különböző csoportjaiban és HELLP szindrómában. Másrészt kíváncsiak voltunk, hogy az Akt-1 és MAPK jelátviteli útvonalak ismert tagjainak villosus trophoblastikus expressziója és aktivitása változik-e praeclampszában és HELLP szindrómában, valamint a feltételezett stressz kondíciók hatással vannak-e ezen kinázok működésére és a gén expresszióra a villosus trophoblastban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A syndecan-1 expresszió változásainak összehasonlító vizsgálata praeclampsziás és HELLP szindrómás betegektől valamint várandós kontrolloktól származó méhlepényekben;
2. A vérérum syndecan-1 koncentrációjának összehasonlító vizsgálatai egészséges terhesekben és praeclampsziás betegeken;
3. Az ischaemia és az aktin citoskeleton 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 praeclampsziás és HELLP szindrómás betegektől valamint várandós kontrolloktól származó méhlepényekben;
5. A praeclampsia kialakulásával társult *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expresszióját szabályzó cAMP jelátviteli útvonalak vizsgálata BeWo sejtmodellen;
6. Az *FLT1*, *GCM1*, *LEP*, és *PGF* gének expressziójának és az Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kinázok aktivitásának vizsgálata BeWo sejtmodellen, hypoxiás, ischémiás és gyulladáso stressz kondíciókban;
7. Az Akt-1, ERK1/2, JNK és p38 kináz inhibitorok hatásának vizsgálata BeWo sejtek génextpressziós mintázatára hypoxiás, ischémiás és gyulladáso stressz kondíciókban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Syndecan-1 vizsgálatai

3.1.1 Beteganyag, klinikai minták és definíciók

A vizsgálatokhoz a méhlepényeket a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttük. 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).

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. hét után jelentkeztek.

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 (thrombocytá $< 100\,000/\text{mm}^3$), és emelkedtek a májenzim-értékek (sALT és/vagy sAST > 70 IU/l).

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. 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 vizsgálatokat az etikai engedélynek és normáknak megfelelően végeztük.

Az anyai vérminták (n=81) a Perinatology Research Branch (NICHD, NIH, DHHS, Detroit, MI, USA) Biológiai Mintabankjából lettek kiválasztva. A betegeket a következő csoportokba osztottuk: 1) praeclampsia (n=49) és 2) kontrollok (n=32). 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.

3.1.2. A méhlepények szövettani vizsgálatai

A méhlepények közvetlenül a császármetszés után kerültek feldolgozásra. A microarray vizsgálatokhoz centrális cotyledók lettek kivágva, és a korábban leírt módszerrel lett elvégezve a microarray analízis. A méhlepények standard hisztopathológiai protokoll szerint lettek megvizsgálva, a morfológiai és makroszkópos elváltozások pedig az adatbázisban rögzítve lettek. 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, hematoxilin-eozin festékekkel megfestettük, és 10 véletlenszerűen kiválasztott mezőben mikroszkóppal értékeltük. A makroszkópikus és mikroszkópikus léziókat a publikált kritériumok alapján definiáltuk.

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 kontrollként 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 szkennelvel 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 intenzitások erősségét. A felismerési paraméterek beállítása után a MembraneQuant program a 20-150 µm 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 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, szabad szemmel értékelték a metszeteket (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Németország), ezt követően pedig a beszkenelt metszeteket számítógépes felületen keresztül is pontozták. A vizsgálók core-onként minimum 25 db, 20-150 µm átmérőjű chorionbolyh immunreaktivitását pontozták egy négyfokozatú intenzitáskála alapján (0, +1, +2, +3). Az az immunreakció kapott +3 minősítést, ahol intenzív festődést tapasztaltunk, 0-s minősítést pedig akkor adtunk, ha nem volt reakció. 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 sejtenyészti 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.

3) Az ischaemiás stressz syndecan-1 expresszióra és felszabadulásra gyakorolt hatását a következőképpen vizsgáltuk: BeWo sejteket 25 μ M 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; 5 μ g/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 felülúszóját minden nap begyűjtöttük és immunoassay vizsgálatnak vetettük alá. Hasonlóképpen mint az anyai szérumból, a sejtkultúrák felülúszójából 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. A próba 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-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. 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 TMA lemezeket egy éjszakán át foszfo-Akt-1 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), foszfo-JNK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), foszfo-Erk1/2 (Cell Signaling), foszfo-p38 (Cell Signaling) antitestekkel 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 vizsgálok core-onként minimum 25 db, 20-150 µm 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 reakció. Az eredményeket core-onként átlagoltuk. A kapott értékeket placentánként 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 alkalmazásával (n=4). Minden méhlepényből körülbelül 100g mennyiségű boholyzövetet 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 sejttenyésztő 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 géneexpressziós 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 (25 μ M), vagy kontrollként DMSO-val kezeltük (Sigma-Aldrich) 96 óráig, majd a géneexpressziós vizsgálatokhoz totál RNS-t izoláltunk. A kináz-útvonalak vizsgálatához a *BeWo* sejteket 25 μ M 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. ERK1/2, JNK, p38 α , Akt-1 kináz-inhibitorokat is alkalmaztunk. A kezeléseket után a *BeWo* sejteket lizáltuk, majd pedig totál RNS-t vagy totál fehérjét izoláltunk. Minden vizsgálatot háromszor végeztünk.

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 analízisét 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. Taqman próbákat használtuk a géneexpressziós profil elkészítéséhez, melyeket a Biomark qRT-PCR system (Fluidigm) segítségével futtattunk a gyártó instrukciói alapján.

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, pERK1/2, 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., 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. Minden egyéb adatot az R statisztikai programmal elemeztünk. A qRT-PCR adatok vizsgálatához a gén expressziókat a belső kontrollként használt *RPLP0* gén expressziójához viszonyítottuk. A $\Delta\Delta C_t$ módszert használtuk a génextpresszió 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 hő sokkfehérje (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 vizsgálatának eredményei

4.1.1. Demográfiai és klinikai adatok

A szisztolés és diasztolés csúcs vérnyomás-értékek egyaránt magasabbak voltak minden betegcsoportban kontrollokhoz képest. Proteinuria minden betegnél előfordult, 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 praeeclampsias csoportok között kis különbség

adódott csak. Az újszülöttek születési súlya szignifikánsan alacsonyabb volt a késői praeclampsziás csoportban, mint a késői kontrolloknál, és alacsonyabb volt, bár nem szignifikánsan, korai praeclampsziában és HELLP szindrómában a korai kontrollokhöz képest.

4.1.2. *Syndecan-1* expresszió és villosus trophoblast differenciáció

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.

A Forskolinnal kezelt BeWo sejtek a morfológiai és biokémiai differenciáció folyamata alatt egyre növekvő mennyiségben expresszálták az *SCDI*-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 ($p=5,3 \times 10^{-5}$).

A differenciálódó BeWo sejt kultúrák 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).

Összehasonlítva a nem kezelt BeWo sejtekkel, a Forskolinnal kezeltéknél, 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.

4.1.3. *A placentáris syndecan-1 mRNS expresszió praeclampsziában*

Nem találtunk eltérést a lepényi *SCDI* expressziójában sem korai praeclampsziában (1,56-szoros csökkenés $p=0,65$), sem pedig HELLP szindrómában (1,43-szoros csökkenés, $p=0,74$) a korai kontrollokhöz képest.

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

A legnagyobb immunfestődési különbséget a korai praeclampsziás betegeknél 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 praeclampsziás eseteknél is. A HELLP szindrómás betegeknél a syncytiotrophoblast apikális membránja erős lineáris festődést mutatott. Az egyes betegcsoportokban annak jelét is láttuk, hogy a syndecan-1 a syncytiotrophoblastból az

intervillosus ürbe kerül ki, leginkább korai preeclampsianál és HELLP szindrómánál. A beszkenelt TMA-k lepényi syndecan-1 immunfestődésének objektív kiértékelésekor a következő eredményeket kaptuk:

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

4.1.5. A syndecan-1 koncentrációja az anyai szérumban praeclampsziában

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 korrall ($R^2=0,22$, $p=1\times 10^{-5}$), negatívan korrelált az artériás középnyomás értékkel ($R^2=0,08$, $p=0,012$) és a fehérjeürítéssel ($R^2=0,06$, $p=0,039$). Praeclampsziás betegekben az anyai szérum syndecan-1 koncentráció alacsonyabb volt (középérték: 673 ng/ml, IQR: 459-1161 ng/ml) mint kontrolloknál (középérték: 1158 ng/ml, IQR: 622-1480 ng/ml, ($p=0,03$).

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

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. Érdekes módon azonban emelkedett volt a syndecan-1 koncentráció szint az ischaemiás környezetben lévő sejt kultúrák felülúszójában ($30\pm 1,8$ ng/ml, $p=0,042$), és alacsonyabb volt a syndecan-1 koncentráció szint a Latrunculin B-vel kezelt sejt kultúrák felülúszójában ($17,4\pm 3,3$ ng/ml, $p=0,05$) a kontrollokhöz viszonyítva ($24,0\pm 4,2$ ng/ml). Immunfluoreszcens vizsgálattal a Forskolinnal kezelt, sokmagvú, fúzionált kontroll sejtek membránján volt a legerősebb a syndecan-1 festődése. Az ischaemiás környezetben tartott BeWo sejtek membránján a festődés gyenge volt, ami arra utal, hogy nőtt a syndecan-1 shedding a trophoblastok felszínéről. 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 citoskeleton működésének károsodására miatt.

4.2. Kináz útvonalak vizsgálatának eredményei

4.2.1. Demográfiai és klinikai adatok

Az eredmények a 4.1.1. bekezdésben láthatóak.

4.2.2. Génexpresszió-változások korai praeclampsiás és HELLP szindrómás leányekben

A *LEP* expresszió a korai praeclampsiás 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 praeclampsiás 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 praeclampsiás betegek méhlepényében nem változott szignifikánsan a korai kontrollokhoz képest a microarray tanulmányunk kritériumai alapján.

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

Ezt követően a foszforilált Akt-1, ERK1/2, JNK, és p38 kinázok immunopozitivitását értékeltük a praeclampsiás, HELLP szindrómás és kontroll csoportokban. A legnagyobb változást a pp38-nál tapasztaltuk. A praeclampsiás csoportok közül a HELLP szindróma tüneteit mutató 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 praeclampsiás betegek méhlepényeiben ($1,98 \pm 0,37$, $p=0,01$) a korai kontrollokhoz ($1,19 \pm 0,51$) képest. A késői praeclampsiások méhlepényeiben nem találtunk eltérést ($1,60 \pm 0,39$, $p=0,5$) a késői kontroll csoport méhlepényeihez képest ($1,33 \pm 0,53$).

Hasonló, de kisebb intenzitású változásokat találtunk a foszforilált, aktív ERK1/2 kináz esetén. A korai praeclampsiás 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 praeclampsiá mellett HELLP szindróma is ($1,11 \pm 0,73$), a változás nem volt szignifikáns ($p=0,3$).

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

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 csúcs-expressziót. A differenciált BeWo sejtekben a négy gén expressziója ugyancsak a 2. és a 3. nap között volt a legmagasabb. 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: 1) Ischaemiában a *LEP* expresszió 2,1-szeresére emelkedett ($p=0,04$). Hypoxiában az *FLT1* expresszió 2,5-szeresére emelkedett ($p=0,056$), míg a *PGF* expresszió 1,4-szeres csökkenést mutatott ($p=0,04$). A praeclampsziás terhesek méhlepényében lejátszódó pro-inflammatorikus változásokat modellező IL-1 β kezelést követően a *PGF* expresszió 1,6-szeres csökkenést mutatott ($p=0,01$), de nem volt szignifikáns változás az *FLT1* és a *LEP* expressziójában.

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

A vizsgálatokhoz a sejteket ugyanolyan módon kezeltük, mint a qRT-PCR vizsgálatokhoz, a kináz-aktivitás próbát pedig BeWo sejtek fehérje lizátumából végeztük.: 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 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 aktivitása 1,4-szeres emelkedést mutatott ($q=0,04$).

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

1) Kontroll BeWo sejtekben az ERK1/2 gátlásakor az *FLT1*, *LEP*, és *PGF* expressziója csökkent. Hypoxiában a p38 és a JNK kinázok gátlása okozta a legtöbb változást a génexpresszióban a normoxiás, kontroll BeWo sejtekhez képest. 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 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 megváltozásában.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

6. 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

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt megköszönöm Papp Zoltán Emeritus Professor 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 Professor 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 Professor 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 Professor Úr támogatását és a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársainak segítségét a klinikai minták gyűjtésében.

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 Bednáríkné Dr. Dörnyei Gabriellának, hogy támogattak és segítették munkámat.

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