

# Pravastatin hatása preeclampsziás placenták NO szintáz aktivitására

Doktori értekezés

**Dr. Pánczél Zita**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Valent Sándor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Surányi Andrea, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szabó István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Nyirády Péter, az MTA tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Majoros Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Kozma Bence, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
Rövidítések jegyzéke .....	3
1. Bevezetés (irodalmi háttér).....	6
1.1. A preeclampsia fogalma .....	6
1.2. Epidemiológia .....	6
1.3. A preeclampsia pathofiziológiája .....	8
1.4. A kétlépcsős modell.....	11
1.5. Genetikai háttér.....	20
1.6. A preeclampsia immunológiai vonatkozásai .....	21
1.7. A vese érintettsége .....	22
1.8. A máj érintettsége .....	24
1.9. HELLP-szindróma .....	25
1.10. Eclampsia .....	25
1.11. Posztembrionális és késői anyai szövődmények .....	26
1.12. Szűrés, előrejelzés, prevenció.....	27
1.13. A preeclampsia kezelése.....	33
1.14. Gyógyszerfejlesztések .....	35
1.14.1. Statinok.....	35
1.15. A NO szerepe preeclampszában.....	38
2. Célkitűzések.....	42
2.1. Célok.....	42
2.2. Elméleti megfontolások .....	43
3. Módszerek.....	47
3.1. Résztvevők kiválasztása és klinikai adatainak felvétele.....	47
3.2. Placenta mikroszóma preparálás.....	47
3.3. Fehérje meghatározása.....	48
3.4. NO-szintáz aktivitás mérése .....	48
3.5. Az eNOS Ser1177 foszforilációjának vizsgálata Western blot módszerrel....	49

3.6. Placenta mikroszóma arginin felvételének meghatározása rapid filtrációs metodikával.....	50
3.7. Statisztikai analízis .....	51
3.8. Anyagok.....	51
4.Eredmények .....	52
4.1. A pravastatin eNOS aktivitásra kifejtett hatásmechanizmusának vizsgálata .	52
4.2. A placenta mikroszóma NOS aktivitásának vizsgálata .....	53
4.3. Pravastatin hatás és Hsp90.....	58
4.4. A pravastatin hatása az eNOS Ser1177 foszforilációjára .....	61
4.5. A pravastatin hatása a placenta mikroszóma arginin felvételére .....	62
4.6. Preeclampsias placenták BH4 rezisztenciájának vizsgálata .....	63
5. Megbeszélés.....	69
6. Következtetések.....	76
7. Összefoglalás .....	77
8. Summary.....	78
9. Irodalomjegyzék .....	79
10. Saját publikációk jegyzéke .....	107
10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények .....	107
10.2. Disszertációtól független közlemények.....	107
11. Köszönetnyilvánítás .....	108

## Rövidítések jegyzéke

**ADMA** aszimmetrikus dimetil-arginin

**Akt** Akt-kináz, más néven: proteinkináz B (PKB)

**ASK1** apoptosis-regulating signal kinase 1

**AT1-AA** angiotenzin II 1-es típusú receptorához kötődő agonista hatású antitestek

**BH2** dihidrobiopterin

**BH4** tetrahidrobiopterin

**BMI** testtömeg index

**COX** ciklooxygenáz

**CTG** kardiotokogram

**DDAH** dimetilarginin dimetil-aminohidroláz

**dNK** decidualis NK-sejt

**EDTA** etiléndiamin-tetraacetát

**eNOS** endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz

**FFA** free fatty acid, szabad zsírsav

**GOT** glutamát/oxálacetát transzamináz

**GPT** glutamát/piruvát transzamináz

**GSNO** S-nitrozo-glutation

**GTPCH** guanozin-trifoszfát ciklohidroláz

**HELLP** haemolyticus anaemia, emelkedett májenzimek, thrombocytopenia

**HEPES** 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

**HLA** humán leukocyt-antigén

**Hsp90** hősokkprotein 90

**IFPMA** International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations

**ISSHP** International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy

**IUGR** intrauterine growth restriction

**LDH** laktát dehidrogenáz

**LMWH** kis molekulásúlyú heparin

**MAHA** microangiopathiás haemolyticus anaemia

**MS** mikroszóma

**NF- $\kappa$ B** nukleáris faktor kappa-B

**NOS** nitrogén-monoxid-szintáz

**PAI** plazminogénaktivátor-inhibitor

**PAPP-A** terhességgel asszociált plazmaprotein A

**PDE** foszfodieszteráz

**PGI<sub>2</sub>** prosztaciklin

**PIGF** placentalis növekedési faktor

**pra** pravastatin

**PRMT** protein-arginin-metiltranszferáz

**ROS** reaktív oxigényökök

**SAPK-JNK** stress-activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase

**sEng** szolubilis endoglin

**sFlt** soluble Fms-like tyrosine kinase

**sVEGFR** szolubilis VEGF-receptor

**TBST** Tris Buffered Saline with Tween

**TNF- $\alpha$**  tumornekrózis-faktor- $\alpha$

**TXA2** tromboxán A2

**VEGF** vascular endothelial growth factor

# 1. Bevezetés (irodalmi háttér)

## 1.1. A preeclampsia fogalma

A preeclampsia a terhesség 20. hete után először jelentkező magas vérnyomás, melyhez szignifikáns proteinuria (>300 mg/24 óra fehérjeürítés vagy gyorssteszttel legalább egy kereszt fehérje a vizeletben), illetve ennek hiányában vagy emellett az anyai vese- és máj érintettségének jelei (emelkedett transzamináz szintek, emelkedett kreatinin érték), thrombocytopenia, idegrendszeri eltérések és/vagy magzati méhen belüli növekedési retardáció) társulnak. (Brown és mtsai, 2018) Súlyosnak minősül a preeclampsia, ha a szisztolés anyai vérnyomás eléri vagy meghaladja a 160 Hgmm-t és/vagy a diasztolés vérnyomás érték eléri vagy meghaladja a 110 Hgmm-t, továbbá ha a napi fehérjeürítés meghaladja az 5 grammot, illetve, ha anyai szervkárosodásra utaló jeleket észlelünk.

A kórkép világszerte, éves szinten több, mint félmillió magzat- illetve újszülött-, valamint több, mint 70000 anyai halálzásért felelős. Tekintettel a fentiekre, illetve arra, hogy a preeclampsia rapidan, alarmírozó előjelek nélkül is kialakulhat, az ISSHP 2018-as ajánlása a preeclampsia közép- illetve súlyos kategorizálását a továbbiakban már nem javasolja. A HELLP szindrómát pedig a preeclampsia egyik, igen súlyos megjelenési formájának tekinti (Brown és mtsai, 2018).

A kórképen belül a tünetek megjelenésének ideje alapján korai- (34. gesztációs hét előtt) illetve késői formát (34. gesztációs hét után) különítünk el.

## 1.2. Epidemiológia

A preeclampsia egy gyakori és súlyos terhességi kórkép, a terhességek 4,5–11,2%-ában alakul ki. A HELLP-szindróma a terhességek 0,5–0,9%-ában, a preeclampsias esetek 10–20%-ában jelentkezik (Haram és mtsai 2009).

Mind a magas (35 év feletti), mind az alacsony (20 év alatti) anyai életkor fokozott kockázatot jelent. (Pridjian és mtsa 2002; Reynolds és mtsai 2012) Negyvenéves anyai életkor felett megközelítőleg duplázódik a preeclampsia kialakulásának valószínűsége, függetlenül attól, hogy primiparitásról vagy multiparitásról van szó (Duckitt és mtsa 2005). Nagyobb kockázattal kell számolni afroamerikai etnikum, alacsony anyai születési súly, az anya előző terhességében jelentkezett preeclampsia vagy a családi anamnézisben (anya és/vagy leánytestvér) szereplő preeclampsia esetén. Növelik a kockázatot egyes terhesség előtt fennálló kórképek, illetve állapotok, mint az elhízás, a diabetes mellitus, a krónikus hipertónia, a vesebetegség, autoimmun betegségek, trombofiliák (antifoszfolipid-szindróma, az V. véralvadási faktor Leiden-mutációja, protein S-hiány, hiperhomociszteinémia) valamint a húgyúti infekciók (aszimptomatikus bakteriúria). A preeclampsia kialakulása és az anya terhesség előtti testsúlya között is összefüggés mutatható ki. Egy tanulmány szerint a terhesség előtti emelkedett BMI-vel arányosan nő a kórkép rizikója: 21 kg/m<sup>2</sup>-es BMI-vel rendelkező terhes nőkhöz képest a 26 kg/m<sup>2</sup>-es értékkel rendelkezők esetében duplázódik, míg 30 kg/m<sup>2</sup>-es BMI esetében megháromszorozódik a preeclampsia kialakulásának kockázata (Walsh 2007, Pridjian és mtsa 2002; Reynolds és mtsai 2012). Szintén magasabb a rizikó egyes várandóssággal összefüggő kórképek esetén, mint a többszörös terhesség, a mola hydatidosa, a hydrops fetalis és egyes strukturális kongenitális anomáliák (Duckitt és mtsa 2005; Pridjian és mtsa 2002; Reynolds és mtsai 2012).

A primiparitás a preeclampsia komoly kockázati tényezője (Pridjian és mtsa 2002). A preeclampsia gyakrabban alakul ki olyan többszörös szült nők esetén, akiknél más apától vagy heterológ inszemináció útján fogannak a gyermekek (primipaternitás elmélet). A következő terhességekben az azonos apa védő tényező (Li és mtsa 2000). Habár a szülések magasabb száma és a korábbi terhesség védelmező hatást jelent, ez a terhességek közötti időtartam növekedésével egyre jelentéktelenebbé válik, és tíz év elteltével a többszörös szült nők relatív rizikója az először szülőkével megegyezővé válik (Skjaerven és mtsai 2002). Újabb kutatások eredményei azt mutatják, hogy a fogantatás előtti rövid szexuális kapcsolat (<6 hónap) és a barrier típusú fogamzásgátlás használata szintén fokozza a preeclampsia kialakulásának esélyét. A „seminal priming” elmélete



szerint az apai antigéneknek a fogamzás előtt hosszabb ideig kitett anyai szervezetben jobb immuntolerancia alakul ki a magzat és a placenta iránt (Robillard és mtsai 1994).

A családi anamnézisben szereplő korai (50 éves kor előtti) kardiovaszkuláris betegségek (hipertónia, miokardiális infarktus, stroke) is a súlyos preeclampsia kockázati tényezői. Egy hazai tanulmány szerint a súlyos preeclampsziás nők szüleinek 43%-a korai szív-érrendszeri megbetegedésben szenvedett, szemben az egészséges kontrollcsoport 16%-ával (Rigó és mtsai 2006). Másrészt a preeclampsziás terhességet kiviselt nőkben az életük folyamán nagyobb eséllyel alakulnak ki kardiovaszkuláris betegségek, metabolikus szindróma és 2-es típusú diabetes mellitus (Cudihy és Lee 2009).

A HELLP-szindrómás esetek 70%-a a 27. és 37. gesztációs hét között jelentkezik, a betegek többsége már korábban szült, és átlagéletkoruk jellemzően magasabb, mint preeclampsziában (Haram és mtsai 2009). Magyarországon – a jó színvonalú terhesgondozás következtében ritkán bekövetkező – anyai halálesetek mintegy harmada a preeclampsziával hozható összefüggésbe. A perinatalis mortalitás és morbiditás többszöröse az egészséges anyák újszülöttjeihez képest, különösen ráarakódásos preeclampsziában (Magyar Nőorvos Társaság 2009). Ha a terhesség első harmadában a diasztolés vérnyomás meghaladja a 110 Hgmm-t, a ráarakódásos preeclampsia kifejlődésének esetén a perinatalis mortalitás a 25%-ot is elérheti. A leggyakoribb anyai szövődmény a vesefunkció beszűkülése, amely a ráarakódásos preeclampsziával szövődött hipertóniás terhességek 65%-ában fordulhat elő (Rigó 1996).

### **1.3. A preeclampsia pathofiziológiája**

Az utóbbi évtizedek intenzív kutatásai ellenére a preeclampsia még mindig a „teóriák betegsége”, a pontos etiológiája továbbra is tisztázatlan. (Broughton és mtsai 1998; Higgins és mtsai 1998) A kórelőzményben szereplő hajlamosító tényezők mellett a placentáció során kórosan végbemenő folyamatok az anyai oldal és a magzati oldal irányába is hatva hozzájárulnak a kórképre jellemző klinikai tünetek kialakulásához. Az anyai oldalon a magas vérnyomást, proteinuriát, szervkárosodás tüneteit, illetve a magzati oldalon a kóros méhlepényi funkció következményeként a méhen belüli növekedési retardációt,

oligohydramniont, valamint a magzati distressz jeleit, a kóros CTG-görbét és a kóros flowmetriát.

Bizonyos, hogy a preeclampsia kialakulásának obligát feltétele a lepényszövet jelenléte. A kórkép kizárólag terhességben jelentkezik, és míg kifejlődéséhez a lepényszövet jelenléte feltétlenül, addig a magzati szövet jelenléte nem feltétlenül szükséges. Erre utal, hogy komplett mola hydatidosa mellett írtak már le igen korai kezdetű, súlyos preeclampsziát. (Moore-Maxwell és mtsa 2004). Gyakoribb továbbá az előfordulása olyan kórképekben, ahol a placentaszövet mennyisége nagyobb (Pridjian és mtsa 2002), mint többes terhességekben illetve mola hydatidosa esetén. A méhlepény patológiai jelentőségét tovább erősíti, hogy a kórkép definitív kezelése jelenleg egyedül a terhesség befejezése és a méhlepény maradéktalan eltávolítása.

Fiziológiás várandósság során a plazmatérfogató nő, ezzel szemben a preeclampsziás terhes nők plazmatérfogata a nem terhes állapotnak megfelelő szint környékén marad. Míg a keringő térfogat akár 30–40%-kal csökken, az interstitialis folyadék mennyisége jelentősen megnő. Preeclampsziában az intravasculáris térfogat csökkenésének mértéke egyenesen arányos a kórkép súlyosságával. A fentiek miatt a preeclampsziás nők jóval hajlamosabbak az oedemaképződésre, mint az egészséges várandósok. Ennek oka egyrészt az endotélium károsodás és a következményes transzszudáció, amit súlyosbít a magas vérnyomás és az alacsony plazmaonkotikus nyomás. A plazmatérfogató növelésére irányuló folyadék- és elektrolitkezelés preeclampsziában nem javasolt, csak tovább növeli az interstitialis folyadék mennyiségét, mely tüdőoedema kialakulásával fenyegethet. (Pridjian és mtsa 2002)

Az intakt endotélium vérnyomást szabályozó és antitrombotikus hatása jól ismert, az egyik leghatásosabb antikoaguláns rendszer a szervezetben. Antikoaguláns (thrombomodulin, PGI<sub>2</sub>) és fibrinolitikus faktorokat (plazminogénaktivátorokat) termel, miközben fizikailag is bevonatot képez az érfal belső felszínén, ezzel gátolva a külsőbb, prokoaguláns rétegek aktiválódását. Az endotéliumtól megfosztott érfal felszíne aktiválja a véralvadási kaskádokat és hozzá kötődnek a trombocyták, trombocytáaggregáció jön létre. A kapillárisok szintjén a trombocytáaggregátumok képződése és a fibrinszálcák kialakulása mikrocirkulációs zavart okoz. Súlyos preeclampsziában microangiopathiás haemolyticus anaemia alakulhat ki a jellemző eltérésekkel: anaemia, trombocytopenia,

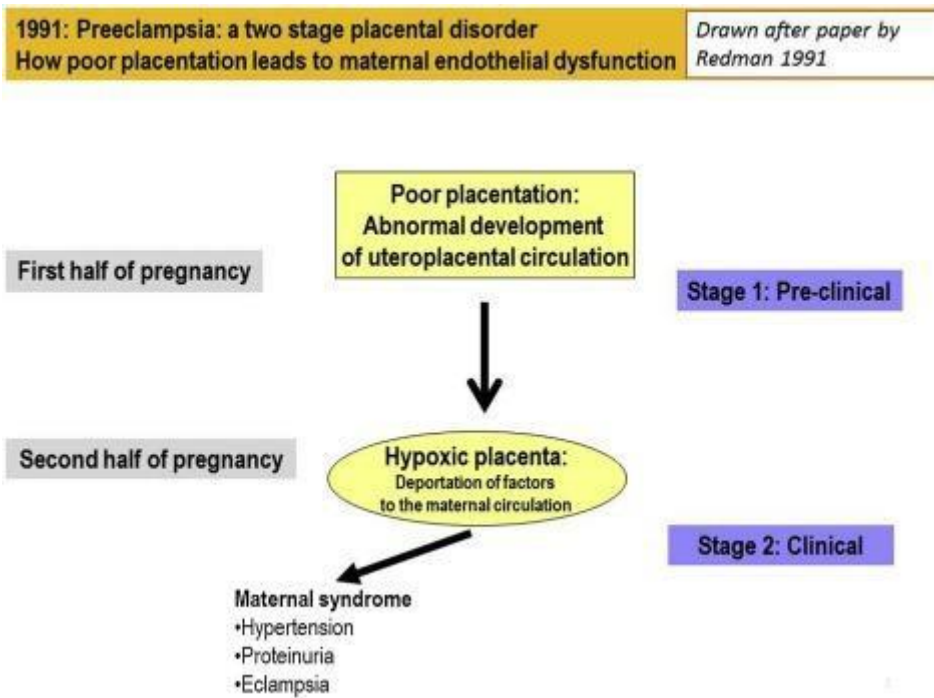
LDH-emelkedés, schistocyták a vérkenetben. A preeclampsziás esetek 15–20%-ában jelentkezik thrombocytopenia, melynek mértéke jelzi a betegség súlyosságát. Preeclampsziában a szérumból endothelin-1 koncentrációja magasabb, mint fiziológiás terhességben, mely erős vazokonstriktor hatásánál fogva emeli a vérnyomást és így hozzájárul a betegség kialakulásához. Az endothelin-1 szintje negatív korrelációt mutat a magzat súlyával és a vérlemezkeszámmal. Szérumból koncentrációja a terhesség után a fiziológiás szintre tér vissza. Az endothelintől származó vasodilatatív és antitrombotikus hatású prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) és a vazodilatátor NO szintje csökken, a thrombocytáereditű tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) szintje emelkedik. A preeclampszia súlyosságának előrehaladtával csökken a PGI<sub>2</sub> /TXA<sub>2</sub> hányados, ami vazokonstriktív eredményez és a thrombocyták fokozott aggregációs hajlamát okozza (Laufs és mtsai 1998).

Fiziológiás terhességben a plazma reninaktivitása, angiotenzin II- és aldoszteronszintje emelkedett, ugyanakkor az angiotenzin II-re adott válaszkészség és a katecholaminok iránti érzékenység is csökkent. Preeclampsziában a RAS komponenseinek szintje relatíve csökkent, ugyanakkor fokozott a vazopresszok (katecholaminok, angiotenzin II) iránti érzékenység. Élettani terhességben a RAS fontos szerepet játszik a decidualizációban, a spirális artériák átalakulásában és a kardiovaszkuláris adaptációban. (Pridjian és mtsai 2002, Craven és mtsai 1998). Preeclampsziás nők mintáiban az angiotenzin II 1-es típusú receptorához kötődő agonista antitestek (AT1-AA) magasabb szérumból koncentrációját is igazolták.

A hipertónia oka preeclampsziában a szív megnövekedett utóterhelése a fokozott perifériás vaszkuláris rezisztencia miatt. Ilyen körülmények között a szív csak magasabb vérnyomással tudja biztosítani a szervek megfelelő perfúzióját. Az afterloadot növeli a vasodilatatív hatású faktorok kiesése (NO, PGI<sub>2</sub>, VEGF), a vazokonstriktor anyagok jelenléte (endothelin, TXA<sub>2</sub>), illetve a vazokonstriktor hatású anyagokra (angiotenzin II, katecholaminok) való fokozott érzékenység (Reslan és mtsai 2010), valamint a mikroangiopátia (a kapillárisok lumenét obliteráló fibrin- és thrombocytáaggregátumok). A kórkép preklinikai fázisában hiperdinámiás keringési állapot a jellemző, melyet a tünetes szakaszban magas perifériás rezisztenciájú keringés vált fel (Pridjian és mtsai 2002).

## **1.4. A kétlépcsős modell**

A preeclampsia klasszikus kétlépcsős modelljét (1. ábra) Redman vezette be 1991-ben (Redman 1991). Az elégtelen placentációt preeclampszában már a XIX. század végén leírták. A preeclampsziát olyan terhességi hypertóniának tekintették, ami proteinúriával jár. Redman modelljének újdonsága az volt, hogy a terhesség során megjelenő magas vérnyomást és proteinúriát nem primer oknak, hanem másodlagosan kialakuló tünetnek tekintette. Redman szerint a preeclampsia trofoblaszt eredetű. Az első, placéntális stádiumot (preklinikai szakasz) a spirális artériák elégtelensége okozza, ami a placenta ischaemiájához vezet. Ez az elégtelen keringéssel rendelkező placenta olyan faktorokat juttat az anyai keringésbe, amelyek a második fázis (klinikai szakasz) tüneteinek kialakulásáért felelősek. (Alasztics és mtsai, 2012)



## 1. ábra

### A preeclampsia kétlépcsős modelljének eredeti változata

Az ábra a (Staff 2019) ábrája alapján készült

A kétlépcsős modellt már a következő évben módosította Redman, és az elmúlt harminc évben folyamatosan finomítottak rajta. A modell alapja változatlan, a preeclampsia kétlépcsős modellje a betegség kialakulását továbbra is a korábbi két szakaszra osztja: preklinikai szakaszra (a terhesség első 20 hete) és klinikai szakaszra (a 20. gesztációs hét után) (Cudihy és Lee 2009). A preeclampsia egy több szervrendszert érintő betegség, amelynek kórélettani változásai már jóval a klinikai tünetek jelentkezése előtt kialakulnak. A modell szerint a kórélettani folyamatok eredete az abnormális implantáció és az elégtelen vérkeringéssel rendelkező, hipoperfundált placenta (első szakasz). A kóros placentából a vérkeringésbe kerülő faktorok okozzák az anyában kialakuló klinikai szindrómát, amelyet magas vérnyomás, fehérjevizelés, oedema, trombofilia és májfunkciós eltérések jellemeznek (második szakasz) (Roberts és Hubel 2009).

Már a huszadik század második felében igazolódott, hogy a preeclampsiahoz vezető egyik elsődleges kórfolyamat az arteria uterina spirális végágainak nem megfelelő trofoblaszt inváziója. Az élettani terhességekben a placenta trofoblasztsejtjei mélyen behatolnak a méh állományába és a spirális artériákat átalakítják (remodeling). A folyamat során az erek muszkuláris rétege eltűnik és így azok maximálisan dilatált, kis ellenállású kapacitáserekké változnak (Lyall 2005). Ez az élettani folyamat trofoblaszttól független és trofoblaszttól függő szakaszokra osztható. Az első változások a terhesség korai szakaszában következnek be és még függetlenek a trofoblasztinváziótól, az ereket körülvevő renin-angiotenzin rendszer (RAS) helyi aktivációján alapulnak (Morgan és mtsai 1998). Újabb kutatások szerint a decidualis NK-sejtek (dNK) okozzák a myocyták rétegének diszrupcióját. A második szakaszban az implantáció helyéhez közeli ereket megközelítik a trofoblasztsejtek, de közvetlenül nem hatolnak be az érfalba. A harmadik szakaszban az erek falában található simaizomsejtek helyét átveszik az infiltráló trofoblasztsejtek, ezáltal az artériák további jelentős kalibernövekedésen mennek át, mediájuk eltűnik, maximális vazodilatáció jön létre, átmérőjük az eredeti többszörösét éri el. A három szakasz együttes jelenléte szükséges ahhoz, hogy a placenta vérellátása megfelelő legyen (Smith és mtsai 2009). A placenta vérkeringése preeclampsiaiban az élettani értékhez képest jelentősen alulmarad a spirális artériák elégtelen átalakulása miatt. Az érfalak mediája bizonyos fokban megtartott marad és így vazokonstrikció jöhet létre. Preeclampsia következtében elhunyt nők boncolása során számos patológiai elváltozást leírtak. A körülírt szöveti nekrozisok, infarktuszok, bevérzés és vizenyő mellett a placentán számos anémiás és hemorrágiás infarktust, a kis arteriolákban fibrinoid nekrozist és habos citoplazmájú makrofágok jelenlétét (Morgan és mtsai 1998) igazolták. A fentiekén túl a lepény korai öregedését, a bolyhok kötőszövetes átalakulását és a bazális membrán megvastagodását észlelték (Young és mtsai 2010). A kóros vaszkuláris remodelling lehet a magyarázata annak is, hogy a kórkép gyakrabban alakul ki extrém fiatal, tizenéves várandósok körében, feltételezhetően a méh érhalózatának viszonylagos fejletlensége miatt, illetve többes terhesség vagy mola hydatidosa esetén a méhfal fokozott mértékű feszülésének következtében (Young és mtsai 2010).

A lepényi perfúziós zavar és a kialakuló anyai szindróma között számos összekapcsoló elemet feltételeznek. Ezeket korábban „toxinoknak” nevezték. Ma bizonyítékok vannak arra, hogy az oxidatív stressz, citokinek, antiangiogenetikus faktorok (Powers és mtsai 2010), szinciciotrophoblast-mikropartikulumok és az intervillusus térben aktivált leukocyták lehetnek a hiányzó láncszemek (Redman és Sargent 2005, Alasztics és mtsai, 2012).

A szinciciotrofoblaszt mikrofragmentumok (STBM) egészséges terhes nők plazmájában is jelen vannak. Az STBM lényegében a placenta felszínéről exfoliálódott apoptotikus és nekrotikus törmelék. Preeclampszában az STBM emelkedett plazmaszintje mérhető (Knight és mtsai 1998). Igazolódott, hogy a STBM-ok direkt módon is képesek károsítani az endotéliumot, valamint az anyai immunrendszer proinflammatorikus irányú eltolódását segítik elő. (Redman és mtsai 2003). Feltételezhető, hogy az anyai vérkeringésben olyan anyagok vannak jelen, melyek a szinciciotrofoblaszt réteg fokozott apoptózisával állhatnak összefüggésben (Ishihara és mtsai 2002).

Az angiogenetikus faktorok közül a sVEGFR vagy másik nevén sFLT-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase) az utóbbi időszak egyik legélénkebben kutatott molekulája preeclampszában. A VEGF és receptora az embrionális fejlődés folyamán már méhen belüli állapotban is nélkülözhetetlen, fontos szerepet tölt be a placenta angiogenezisében és a magzat fejlődésében. A humán placenta a VEGF-család több elemét termeli (VEGF-A, VEGF-B, PlGF). A VEGF aktiválja az Akt kinázt, ami foszforilálja az eNOS Ser1177-et. A foszforiláció következtében kialakuló NOS aktivitás fokozódás következtében a vérnyomás csökken (Sandrim és mtsai 2008). Fiziológiás terhességet kihordott nők és súlyos preeclampszában szenvedő gravidák placenta biopsziás mintáinak immunhisztokémiai vizsgálata során a preeclampsziás terhes nők eseteiben a VEGF és a VEGF-receptor (VEGFR, Flt-1) gyengébb, a VEGFR-1 membránhoz nem kötött alternatív hasítási terméke, az sFlt-1/sVEGFR-1 erősebb festődését igazolták (Zhou és mtsai 2002) Az sVEGFR-1 (sFlt-1) preeclampsziás nők méhlepényében a fiziológiához képest tehát nagyobb mennyiségben termelődik, az érintett anyák perifériás vérkeringésében az egészséges kontrollokhöz viszonyítva magasabb koncentrációban mérhető. Az VEGFR-1 a VEGF A és B alcsoportját,

valamint a PIGF-et egyaránt megköti és így endogén inhibitorként funkcionálva csökkenti biológiai hatékonyságukat, ezáltal endotél diszfunkciót eredményez.

Az oxidatív stressz az egyik legfontosabb eleme a preeclampsia kétféle modelljében a két szakasz közötti kapcsolatnak. A szabad gyökök élettani körülmények között másodlagos hírvivő funkcióval bírnak a sejtek működését szabályozó intracelluláris jelátviteli rendszerekben. Magasabb koncentrációban azonban kárt tehetnek a legtöbb biológiai molekulában, ami funkcióvesztéshez vagy sejthalálhoz vezethet. Az emberi szervezet állandóan ki van téve a reaktív oxigéngyökök támadásának, melynek ellensúlyozására összetett antioxidáns-rendszerek jöttek létre. (Burton és mtsai 2011). A fetomaternalis határfelületen koraterhességtől jelentkező oxidatív stressz fontos élettani szerepet tölt be a placenta normális fejlődésében. Ugyanakkor az oxidatív stressz meghatározó kórélettani tényező is több terhességi kórképben: spontán vetélésben, preeclampsziában, méhen belüli sorvadásban (IUGR) és a korai burokrepedésben. (Burton és mtsai 2011).

A placentából felszabaduló proinflammatorikus anyagok következtében tehát fiziológiás terhességben is felerősödik az oxidatív stressz, amit a nem terhes állapothoz képest magasabb oxidált LDL-, malondialdehyd- és 4-hidroxinonenal-szint jelez. Preeclampsia esetében az oxidatív stressz még fokozottabban jelentkezik, a kórképben szenvedő várandósok szérumában a proinflammatorikus citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák koncentrációja jelentősen magasabbnak bizonyult. (Molvarec és mtsai 2012) A baktericid hatású granulocytáeredetű mieloperoxidáz (MPO) vérben és placentában mért aktivitását is szignifikánsan magasabbnak találták preeclampsziában. Az enzim által termelt szabad gyökök közvetlenül hatástalanítják a nitrogén-monoxidot, és hozzájárulnak az oxLDL képződéséhez (Gandley és mtsai 2008). Az irreguláris véráramlás (ischaemia-reperfúzió) eredményeként fokozódik a placentában az oxidatív stressz és a ROS képződése, ami a placentán áthaladó monocytákat és makrofágokat aktiválja. Az oxidatív stressz úgynevezett feed-forward mechanizmusaival egy önmagát fenntartó és öngerjesztő folyamat. (Alasztics és mtsai, 2012) Az oxidatív stressz fokozza az inflammatorikus citokinek, antiangiogenetikus faktorok és trofoblaszt-mikropartikulumok keletkezését, amelyek a szisztémás keringésbe jutva az egész szervezet oxidatív stresszének fokozódásáért felelősek (Redman 1991). A placentából

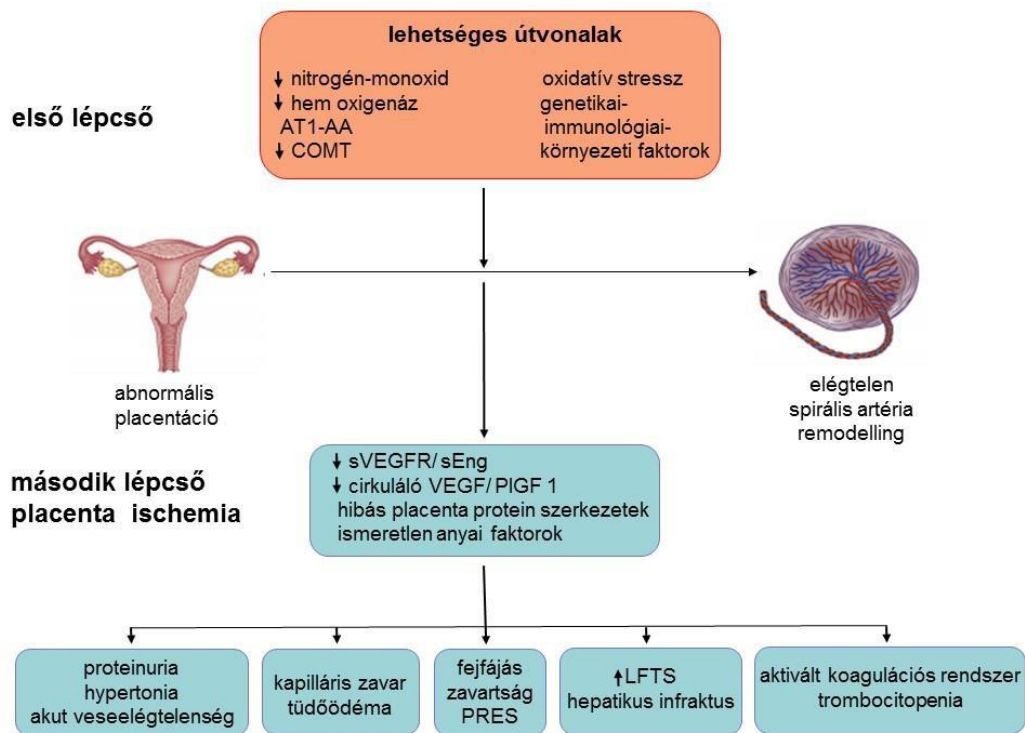


az anyai keringésbe jutó faktorok az endotél-diszfunkción keresztül váltják ki a szisztémás tüneteket (Roberts és Hubel 2009).

Számos akutfázis-fehérje szintjének emelkedését is kimutatták: CRP, angiotenzinogén, fibrinogén, plazminogén, komplement C3,  $\alpha$ -1-antitripszin, cöruoloplazmin, szolubilis foszfolipáz A2,  $\alpha$ -1-acidikus glikoprotein. Ezzel szemben a negatív akutfázis-fehérje albumin plazmaszintjét preeclampsziában csökkentenek találták. (Redman és mtsa 2009) Ismert, hogy obes betegekben a zsírszövet proinflammatorikus hatása miatt a gyulladáshoz vezető reakciók felerősödhetnek. A zsírszövet TNF- $\alpha$ -t, IL-6-ot és PAI-1-et szekretálnak és a leptin fő forrásai. A leptin gyulladáshoz vezető reakciót képes indukálni illetve fokozhatja azt. A TNF- $\alpha$  inzulinrezisztenciát okoz, gátolja a lipidszintézist és fokozza a lipolízist, ami a szabad zsírsavak (FFA) felszabadulásához vezet. Preeclampsziás nők vérében emelkedett FFA szintet találtak az egészséges terhesek értékeihez képest. Az FFA szintje élettani terhességben is jellegzetesen emelkedik, szerepet játszik a magzat tápanyagellátásában és fejlődésében (Villa és mtsai, 2009) A szabad zsírsav a mitokondrium oxidatív foszforilációjának szétkapcsolószereként viselkedhet, ezáltal fokozott reaktív oxigénradikálok (ROS) termelését okozza. A szuperoxid a nitrogén-monoxidot azonnal peroxinitritté (ONOO<sup>-</sup>) alakítja, ami csökkenti a NO-molekulák biológiai hozzáférhetőségét. Az FFA gátolja az Akt-ot, így közvetve az eNOS-t is. A magas FFA-szint miatt fokozottan keletkező ceramid csökkenti az eNOS transzkripcióját és apoptotikus induktorként is működhet (Kukor és mtsa 2010).

Az első szakasz markerei jelzik az abnormális placentációt, azonban nem specifikusak preeclampsziára. A kóros arteria uterina Doppler-ultrahanglelettel rendelkező terhesek 50%-ában preeclampsia, koraszülés vagy intrauterin retardáció alakul ki. A másik 50%-ban a terhesség élettani lefolyású marad. A csökkent plazma aszkorbát szint (oxidatív stressz), emelkedett aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) és angiotenzinreceptor-agonista antitest (AT1-AA) szintek mellett preeclampsia, normotenzív IUGR és élettani terhesség is kialakulhat. Ez alátámasztja azt, hogy az abnormális placentáció és a károsodott méhlepényi keringés (első szakasz) mellett az anya alkati, genetikai, magatartási és környezeti tényezői is hozzájárulnak a

preeclampsia kialakulásához (Redman 1991, Roberts és Hubel 1999). Ezzel szemben a normotenzív IUGR-ben nem találtak emelkedettnek az sVEGF/sFlt, leptin és a szinciotrophoblast-mikropartikulumok szintjét, amelyek preeclampszában bizonyítottan magasabbak, így a preeclampsia tüneteinek (második szakasz) kialakításában ezen molekuláknak közvetlen jelentőségük lehet 2. ábra (Redman 1991, Bramham 2016).

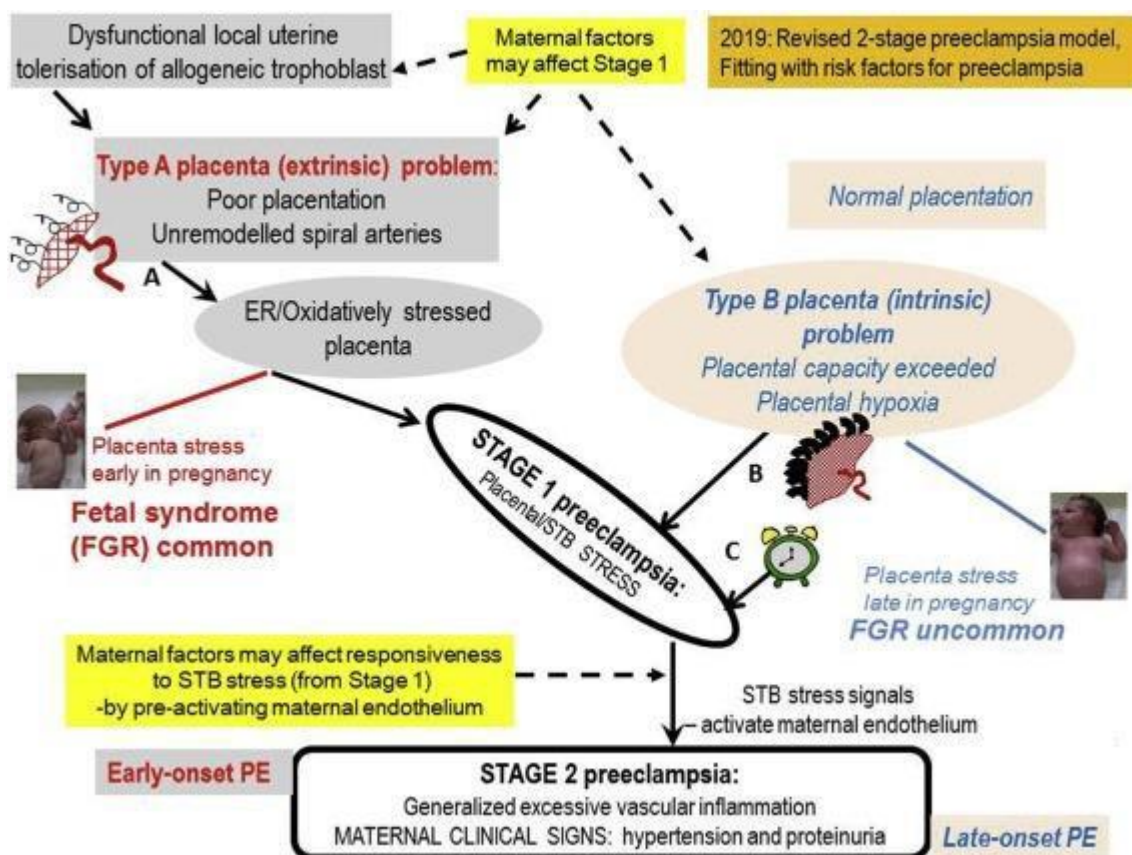


## 2. ábra

### *A preeclampsia pathomechanizmusának kétlépcsős modellje*

AT1-AA: angiotenzin receptor 1 autoantitestek; COMT: katekol-O- metiltranszferáz; PlGF1: placental growth factor 1; PRES: posterior reversible encephalopathy syndrome; sEng: soluble endoglin; sVEGFR1: soluble vascular endothelial growth factor receptor 1; VEGF: vascular endothelial growth factor. Az ábra (Bramham 2016) képe alapján készült.

Az eredeti kétlépcsős modell nem foglalta magába az anyai kockázati tényezőket. A 2019-ben frissített modell (Staff 2019) már számításba veszi ezeket is (3. ábra). A frissített modell lehetséges magyarázatot kínál arra, hogy az anyai kockázati tényezők hogyan vezethetnek rendellenes uteroplacentalis keringéshez a terhesség késői szakaszában is. A módosított modell szerint a késői preeclampsia hátterében nem a terhesség korai szakaszában kórosan végbemenő placentáció, a kóros remodelling áll, hanem olyankor jelentkezhet, amikor a méhlepény annyira túlnövi a méh kapacitását, hogy a bolyhok mechanikus kompresszió alá kerülnek, perfúziójuk romlik és végső soron ez vezet a szinciotrofoblasztok hypoxiájához. Ez a 'stressz' a korai preeclampsziában leírt folyamatokhoz hasonlóan eredményezi a jellemző tünetek megjelenését. Hasonló folyamatok zajlanak le például többes terhességben illetve terminustúllépés esetén is.



### 3. ábra

#### A 2019-ben módosított kétlépcsős modell

Az előző modellekhez képest figyelembe veszi az anyai kockázati tényezőket is. (túlsúly, primiparitás, 40 év feletti kor, pregesztációs diabetes mellitus, vesebetegség, autoimmun betegségek, mint a szisztémás lupus erythematosus és az antifoszfolipid szindróma, afrikai rassz, preeclampsia korábbi terhességnél és/vagy testvérnél/anyánál, hypertónia (Egeland és mtsai 2016). A kockázati tényezők erősíthetik is egymást. A túlsúly (BMI > 28) egyenesen arányos a preeclampsia kockázatával, hypertóniát okozhat, növeli a diabetes mellitus előfordulását. Ez a modell magyarázza a korai és késői preeclampsziát is. Az „A” út a spirális artériák elégtelen átalakulására és elégtelen placentációra, a „B” út elégtelen, pl. hypoxia miatt kialakuló csökkent placenta kapacitásra, a „C” útvonal a placenta túlzott öregedésére vezethető vissza. A három út mindegyike trofoblaszt stresszt okoz, ami a második lépcső, a klinikai tünetek megjelenését eredményezi. FGR fetális növekedési retardáció, STB syncytiotrophoblast. Az ábra a (Staff 2019) ábrája.

## 1.5. Genetikai háttér

Alapvető, régi megfigyelés a preeclampsia családi halmozódása, ami egyes polimorfizmusok és a preeclampsia kapcsolatára hívja fel a figyelmet (Cudihy és Lee 2009). Az úgynevezett kandidáns géneket a patogenezisben betöltött lehetséges szerepük alapján, illetve populációgenetikai szűréssel választják ki. Az V. faktor Leiden-mutációja (thrombophilia), az angiotenzinogén M235T variánsa (fokozott expressziója), az eNOS Glu298Asp mutációja vagy D7S505 mikroszatellita amplifikációja (funkciócsökkenéssel jár), a metilén-tetrahidrofolátreduktáz (MTHFR) C667T polimorfizmusa (hyperhomocysteinaemiát okoz), az epoxid-hidroláz Tyr113His mutációja (a szabad gyökök és lipidperoxidációs termékek detoxikáló enzimének funkciócsökkenéséhez vezet) mind ismert (Pridjian és Puschett 2002). Az eNOS a vérnyomás szabályozásában és a placenta kialakulásában betöltött szerepe miatt szintén a kandidáns gének közé tartozik. Polimorfizmusainak asszociációját a preeclampsziával metaanalízisek is alátámasztják. A G894T polimorfizmus preeclampsziában gyakoribb, de a G894T polimorfizmus preeclampsziával való asszociációja függ az etnikai hovatartozástól is. Az asszociáció kaukázusi és kevert csoportokban figyelhető meg, míg afrikai és ázsiai csoportokban nem (Abbasi és mtsai 2020).

Magyarországi kutatási eredmények is igazolták a genetikai prediszpozíció szerepét a preeclampsia kialakulásában. A Leiden-mutáció előfordulása az egészséges, nem terhesek között 5%, az egészséges terhesek között 7%, a preeclampsziás terhesek között 17% volt (Nagy és mtsai 1998).

Egy másik hazai tanulmányban a preeclampsziások csoportjában az V. faktor Leiden-mutációjának előfordulása 6,17-szorosnak bizonyult az egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva (18,33% vs. 2,97%) (Rigó és mtsai 2000). Érdekes, hogy preeclampsia ellen védő polimorfizmust azonosítottak a VEGF génben (VEGF(+405)G). Ugyanebben a tanulmányban azt tapasztalták, hogy egy másik VEGF polimorfizmus (VEGF (-2578)A) módosíthatja a preeclampsia progresszióját (Bányász és mtsai 2006). Az apoptotikus szignáltranszdukcióban résztvevő Fas gén (TNFRSF6) -670 A/G polimorfizmusának vizsgálatának eredménye az volt, hogy a terhesség 37. hete előtt kialakuló preeclampsziás betegekben a homozigóta -670 GG típus gyakoribb, míg a normotenzív kontroll csoportban a -670 AA homozigóták gyakorisága volt magasabb.

A G-polimorfizmus jelenléte a Fas csökkent expresszióját eredményezi. Az intrauterin retardáció szintén összefüggésben áll a -670 GG homozigotással (Sziller és mtsai 2005). Egy olasz vizsgálat a TNFRSF6 -670 G allél kapcsolatát igazolta preeclampsziával (Ciarmela és mtsai 2010). Hazai kutatásban a Hsp70 egyes polimorfizmusainak lehetséges kapcsolatát vizsgálták a kórképpel. Eredményeik alapján preeclampsziában gyakoribb a Hsp70 HSPA1B (1267)GG és HSPA1L (2437)CC genotípusok előfordulása (Fekete és mtsai 2006, Alasztics és mtsai, 2012).

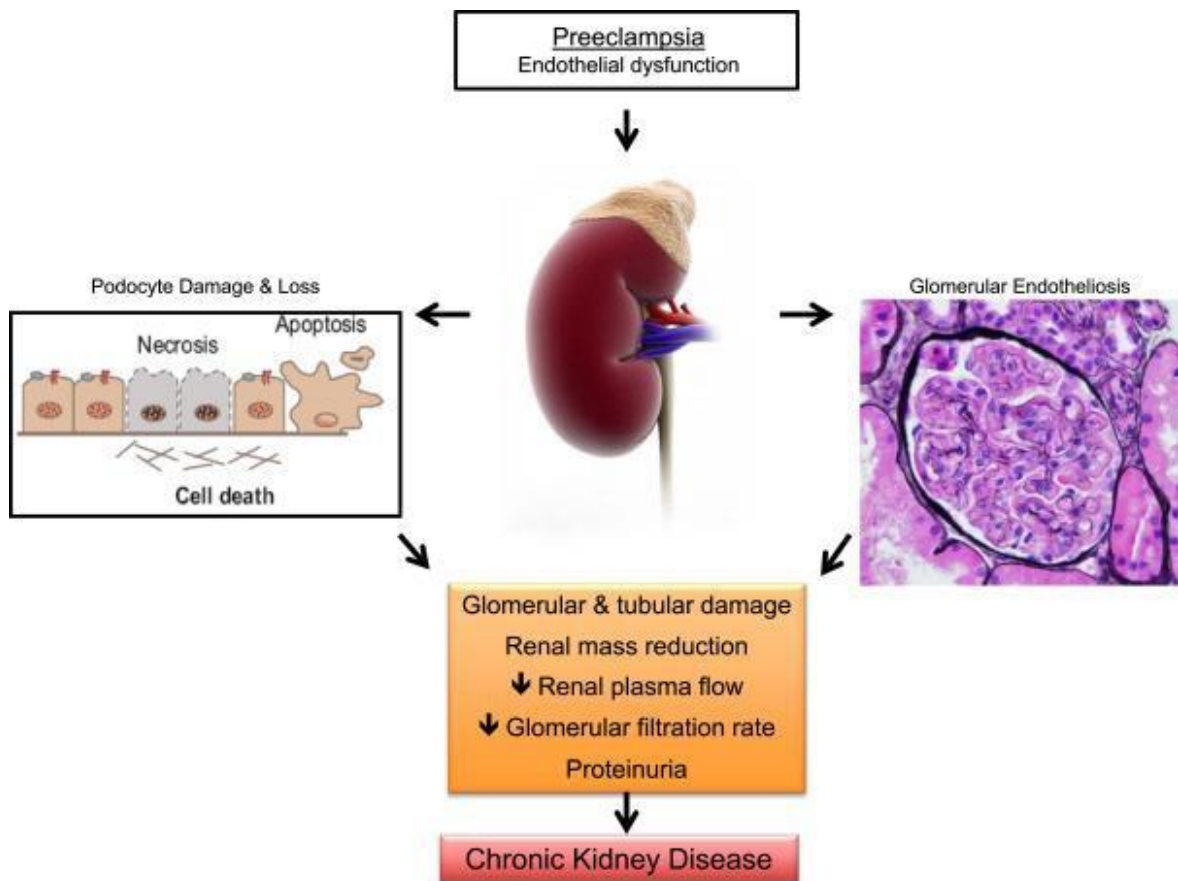
## 1.6. A preeclampsia immunológiai vonatkozásai

A magzat az anya számára félig 'idegen', hiszen félig anyai és félig apai eredetű antigéneket hordoz, az anya szervezete fiziológiai esetben mégsem indít a terhesség ellen kilökődési reakciót. A magzattal szembeni anyai immuntolerancia kifejlődése érdekében szükséges, hogy a terhesség során megváltozzon az anyai immunrendszer működése (Aagaard és mtsai 2006). A terhességet megvédi az immuneredetű kilökődéstől a trophoblastsejtek csökkent MHC I-expressziója, mely elrejti a placentát az anya immunrendszere elől (Davies 2007). A HLA-fehérjék egyedi konstellációja expresszálódik a trofoblasztsejtek felszínén (HLA-C, HLA-G és HLA-E), ami aktív védelmet biztosít az immuntámadás ellen (James és mtsai, 2010). A HLA-G csökkenti a citotoxikus T-sejtek és NK-sejtek lízist okozó hatását (Hofmeister és mtsai, 2003). A decidua leukocytáinak körülbelül 70%-a dNK-sejt. A deciduális NK-sejtek (dNK) jelentősen különböznek a keringő NK sejtektől, nem jellemző rájuk a citotoxikus aktivitás. Fontos szerepet játszanak a decidualizációban és a terhesség sikeres kialakulásában. Elősegítik a spirális artériák átalakítását, a trofoblasztmigrációt, az immuntolerancia létrejöttét, VEGF-et, PlGF-et és angiopoetin2-t termelnek.

Az immunológiai tényezők szerepét veti fel a patogenezisben, hogy a preeclampsia primiparákban tízszer gyakoribb, mint többes szülőkben, továbbá gyakrabban jelentkezik mola hydatidosa esetén, kollagénbetegségben szenvedőknél és többes terhességben; illetve, ha többedik terhesség új apától fogan, vagy, ha a várandósság heterológ inszemináció útján jött létre. A kórkép incidenciája magasabb immunszuppresszív terápiában részesülő terhesek körében is (English és mtsai, 2015).

## 1.7. A vese érintettsége

Fiziológias terhességben a vese véráramlása és a GFR is emelkedett a nem terhes állapothoz képest. Ezzel szemben preeclampsziában a veseperfúzió és a GFR csökkenését írták le. A húgysav clearance-e csökken, a tubuláris reabszorpciója nő, és a vérben található koncentrációja magasabb lesz. A szérumban húgysavszint emelkedése ( $>350 \mu\text{mol/l}$ ) egyenesen arányos az intravasculáris volumendeplicióval és a betegség súlyosságával (Pridjian 2002). A preeclampsziában észlelt általános perifériás perfúziós zavar az elsők között érinti az ischaemiára érzékeny veséket. Preeclampsziában az antiangiogenetikus faktorok túlsúlya a veseglomerulus barrierjének károsodását okozza. Károsodik a glomerulus endotélje és a podocyta közötti összehangolt működés, nem szelektív proteinuria lép fel. Mivel a fehérjevizelés csak a betegség későbbi szakaszában jelentkezik, a hypertonia jelentkezik önmagában, proteinuria nélkül is (Cornelis 2011). A fokozott oedemahajlam részben a csökkent glomerularis filtráció mellett fokozott víz- és nátriumreabszorpció miatt alakul ki. A preeclampsia hajlamosít a terhesség utáni krónikus vesebetegségre, melynek oka a terhesség alatt kialakuló endothel károsodás lehet (4. ábra) (Kattah 2018).



#### 4. ábra

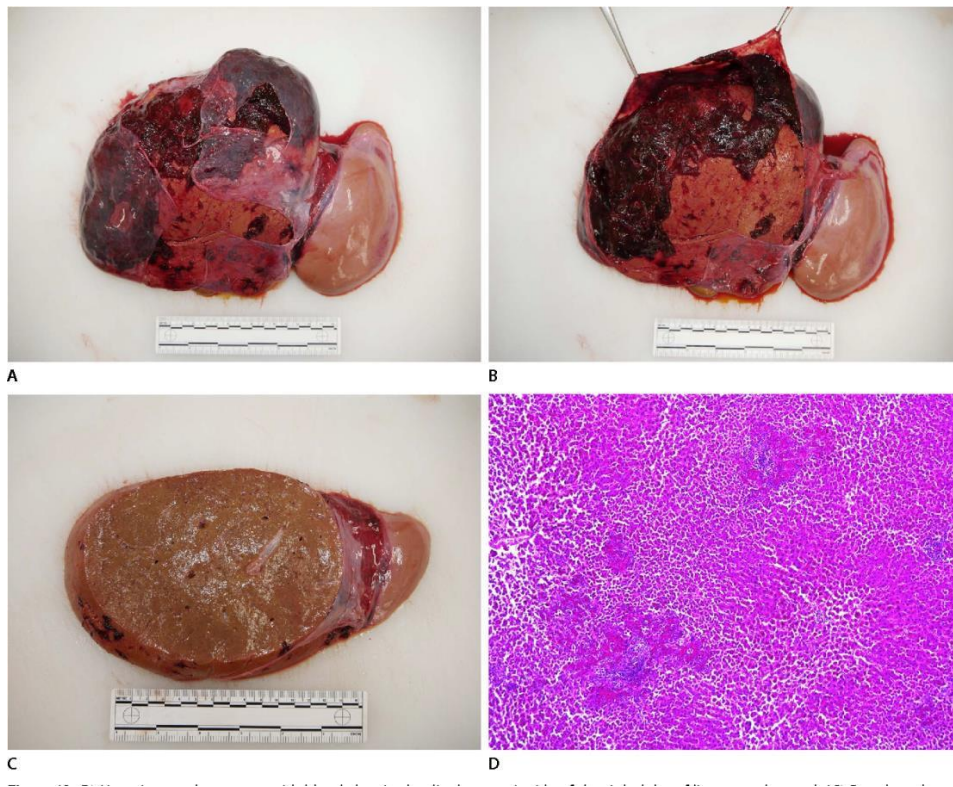
##### *A preeclampsia és a krónikus vesebetegség lehetséges kapcsolata.*

A preeclampsia szisztémás endothel rendellenesség, amely a vesében proteinuria formájában nyilvánul meg. A preeclampsia endotheliosist és podocyhuriát is kiválthat. Ezek a sérülési mechanizmusok károsíthatják a vesefunkciókat és csökkenthetik a nefron tömegét. Albuminuria alakulhat ki, és az érintett terhesség után krónikus vesebetegséghez vezethet. A (Kattah 2018) hivatkozás változtatás nélkül átvett ábrája.



## 1.8. A máj érintettsége

Súlyos preeclamsiában a hipoperfúziós hepatocytakárosodás következtében gyakran emelkedettek a májenzimértékek (GOT, GPT, LDH). A máj parenchymája oedemára hajlamossá válik. Az intrahepaticus nyomásfokozódás és a Glisson-tok feszülése miatt epigastriális fájdalom jelentkezhet. Ritka komplikáció a subcapsularis májhaematoma, amely általában thrombocytopenia mellett alakul ki. Spontán rupturája rendkívül rossz prognózisú. Szövettani vizsgálattal fokális vérzések és nekrozisok láthatóak (5. ábra) (Park és mtsai 2017, Roberts és mtsai 1999).



### 5. ábra

#### *Preeclamsiás máj rupturája*

A máj jobb oldali lebenyének rupturája (A, B). A parenchyma nem mutatott specifikus rendellenességet (C). A szövettani képen a máj multifokális nekrozisa figyelhető meg (D).

Az ábra a (Park és mtsai 2017) közlemény változtatás nélkül átvett ábrája.

## 1.9. HELLP-szindróma

Az ISSHP 2018-as ajánlása szerint a HELLP-szindróma a preeclampsia egyik – igen súlyos- manifesztációja, mely a várandósságok 2-8 ezrelékében jelentkezik. A kórképet 1982-ben írta le Louis Weinstein. Neve egy betűszó, a jellemző eltérések kezdőbetűinek összeolvasásából: hemolízis (hemolysis), emelkedett májenzim szint (elevated liver enzyme levels) és alacsony vérlemezke szám (low platelet count) jellemzi a kórképet. (Dusse és mtsai 2015). Az esetek 10–20%-ában hiányozhat a hypertonia és proteinuria. A betegek több mint 50%-ában nagyfokú súlygyarapodás (látens oedema) vagy generalizált oedema alakul ki (Sibai 2004). A hemolízis oka a károsodott endotéllel borított kapillárisokon áthaladó vörösvértestek fragmentálódása, amit mikroangiopátiás hemolítikus anaemiának nevezünk. A perifériás vérkenetben töredezett vörösvértestdarabok (fragmentocyták vagy schistocyták) és kontrahált, spiculumokkal rendelkező vörösvértestek (Burr-sejtek vagy echinocyták) láthatóak. A perifériás vérkenet lelete jellemző MAHA-ra. A laboratóriumi eredményekben a hemoglobinszint csökkenése, szérum-LDH-aktivitás emelkedése, indirekt hyperbilirubinaemia látható. A csontvelői kompenzáció következtében reticulocytosis alakul ki. A haptoglobin plazmaszintjének csökkenése (vagy eltűnése) a hemolízis korai, érzékeny és specifikus mutatója (Haram és mtsai 2009). Az LDH emelkedése együttesen utal a májérintettségre és a hemolízisre, a transzaminázok emelkedett aktivitása (GOT, GPT) specifikusabban utal a májsejtek károsodására. A legspecifikusabb eredményt a plazma-glutation-S-transzferáz aktivitása adja, azonban ez a rutindiagnosztikában még nem terjedt el. A 100 G/l alatti thrombocytopenia viszonylag ritka gesztációs thrombocytopeniában és preeclampsziában, gyakori viszont ITP-ben és HELLP-szindrómában. A HELLP szindróma súlyosságát a thrombocytaszám-csökkenés alapján állapítjuk meg (Mississippi beosztás).

## 1.10. Eclampsia

Az eclampsia (görögül: villámlás) a preeclampsia talaján kialakuló, tónusos-clonusos görcsroham. Eszméletvesztéssel járó állapot, mely a terhesség akut, életet veszélyeztető komplikációja. Előfordulása 0,05 % az összes várandós nő körében

(Douglas és Redman 1994). A súlyos preeclampsziás esetek körülbelül 5%-ában alakul ki (Paulin és Pajor 2009). Az esetek 25%-ában a szülés előtt, 50%-ában a szülés alatt, 25%-ában a szülés után lép fel (Ross <http://emedicine.medscape.com/article/253960-overview>). Konvulzív állapot, postictalis neurológiai tünetek, kóma jellemzi. A kórkép kialakulása nem köthető megelőző neurológiai, organikus agyi károsodáshoz. Az ismétlődő rohamokat status eclampticusnak nevezzük. A konvulziók és neurológiai tünetek kialakulásáért a hipertenzív encephalopathiát, az agyi regionális vazospazmust, petechiás vérzéseket és agyoedemát teszik felelőssé (Bányász és mtsai 2006). Hipertenzív encephalopathiában a koponya MR-vizsgálatakor az occipitalis lebeny fokális oedemája (T2-jelintenzitás-fokozódás) figyelhető meg, a klinikai-radiológiai kép posterior reverzibilis encephalopathia szindrómának felel meg. Az eclampsia kialakulását a fenyegető eclampsia tünetei előzik meg. A tenziókiugrás, hányinger, hányás, epigastriális fájdalom mellett a neurológiai tünetek (látászavar, szikralátás, corticalis vakság, hiperreflexia, fejfájás) alkothatják a prodroma jeleit. Az eclampsziás roham négy stádiumból áll. Az első szakasz az invázió, melyben a száj körüli izmok rángatózása figyelhető meg. A második szakaszban a vázizomzatban tónusos kontrakciók jelentkeznek, ez körülbelül 15–20 másodpercig tart. A harmadik szakaszban erőteljes akaratlan izomrángások jelentkeznek, a beteg a nyelvét elharaphatja, a szájban habgomba jelenik meg, légzése leáll, cianotikussá válik (kb. egy perc). A negyedik stádium változó időtartamú, reverzibilis kóma. A beteg a kómából való felébredés után amnéziás az eseményekre, átmeneti vakság is felléphet (Chesley 1971). Az eclampsia anyai halálózása az Egyesült Királyságbeli adatok alapján 1,8%, és a túlélők 35%-ában súlyos komplikációk léptek fel. A halvaszületés 2.2%, a neonatalis halálózás 3,4% volt (Nagy és mtsai 1998).

### **1.11. Posztembrionális és késői anyai szövődmények**

A preeclampsia legsúlyosabb formái illetve szövődményei a HELLP-szindróma, az eclampsia, a lepényleválás (abruptio placentae), a DIC és a tüdőödéma. A fenti akut szövődményeken túl a kórképnek hosszútávú kedvezőtlen következményei is lehetnek. Mind az újszülött, mind az anya esetében előfordulhat tartós egészségkárosodás (neurológiai-, mentális- és szemészeti problémák, késői kardiovaszkuláris és metabolikus eltérések). Tekintettel arra, hogy a preeclampsia egy viszonylag gyakori

körkép, a szövődményei nemcsak a család, hanem a társadalom egésze számára is jelentős terhet jelenthetnek, mind pszichés, mind anyagi téren (Black 2007). A neonatológia jelentős fejlődésének ellenére a koraszülöttség következményei továbbra is súlyosak. A rendkívül koraszülött gyermekek közel ötöde 18 hónapos korban cerebrális bénulásban szenved, tizedük hallás- és/vagy látáskárosodott (Powers és mtsai 2010). A koraszülöttség következményei felnőttkorban is fennmaradnak, a túlélők csaknem 40%-a 18 éves korban rokkant, valamilyen fogyatékkal él. Az oktatás és az orvosi ellátás súlyos pénzügyi költségeket jelentenek. Ez Nagy-Britanniában kb. 95000 font 18 éves korig rendkívül koraszülött gyermek esetében. Ha a terhesség vége kitolódik 28-33 hétre, a költségek jelentősen csökkennek, kb. 30000 fonttal kell számolni (Mangham és mtsai 2009).

Célszerű a preeclampsziás nők nyomonkövetése a terhesség után is, hiszen esetükben a kardiovaszkuláris rizikó mellett a metabolikus szindróma rizikója és a diabetes rizikó is fokozott. A súlyos preeclampsia a 2. típusú diabetes kockázatát 3,68-szorásra növeli (Lykke és mtsai 2009). 14 évvel preeclampsia után a krónikus hypertónia előfordulása 3,7-szeresre nő (Bellamy és mtsai 2007). A krónikus kardiovaszkuláris betegségek kockázata 11 évvel preeclampsziát követően kb. kétszeresére növekszik [Bellamy és mtsai 2007]. A stroke kockázata gyakorlatilag megegyezik a krónikus kardiovaszkuláris betegségekével (McDonald és mtsai 2008). A vese is érintett maradhat. A végstádiumú veseelégtelenség kockázata egy preeclampsziás terhesség esetén 4,7-szeresre növekszik, 2-3 preeclampsziás terhességet követően a kockázat még magasabb, 15,5-szörösre nő (Vikse és mtsai 2008).

## **1.12. Szűrés, előrejelzés, prevenció**

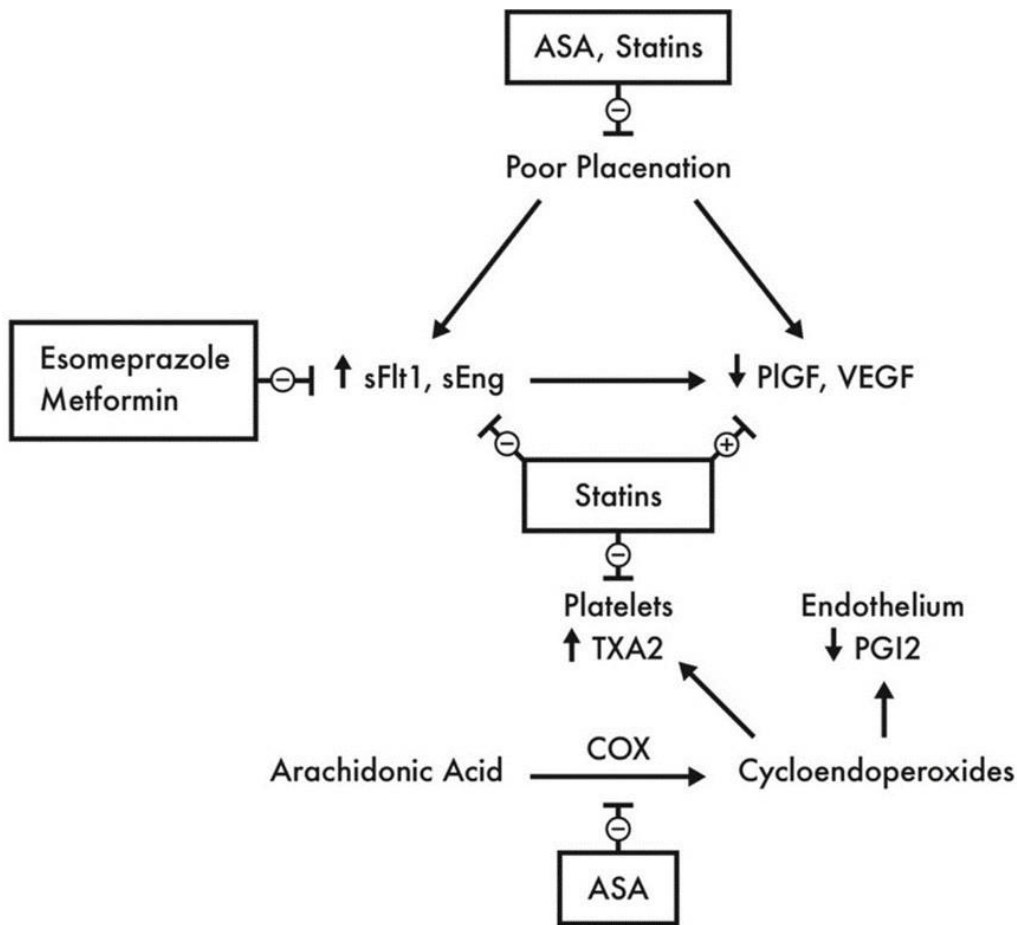
Egy londoni munkacsoport a közelmúltban kidolgozott egy algoritmust a preeclampsia szűrésére/előrejelzésére. A módszer az anyai anamnesztikus adatok, anyai vérnyomás (középnomás), az arteria uterina pulzatilitási indexe, a szérum PAPP-A és a PlGF szintek felhasználásával emeli ki a preeclampsia szempontjából rizikós várandósokat. (Rolnik és mtsai, 2017; O'Gorman és mtsai, 2016).

A terhesség utolsó két hónapjában a normál terhességet viselő gravidák

keringésében az sVEGFR-1 plazmaszintje szignifikánsan emelkedett és a PlGF plazmaszintje szignifikánsan csökkent. Azon terhes nők körében, akiknél később preeclampsia fejlődött ki, a plazmaszint változásai korábban következtek be és jóval kifejezettebbek voltak. A sVEGFR-1(sFlt-1) plazmaszintjének emelkedése és a PlGF szintjének csökkenése átlagosan 2-5 héttel megelőzi a preeclampsia tüneteinek első megjelenését. (Chaiworapongsa és mtsai, 2005) Egy tanulmány alapján már igen korán, a terhesség első felében, a 13-16. terhességi hét között szignifikánsan alacsonyabb volt a PlGF plazmaszintje azon várandós nők vérkeringésében, akiknél később preeclampsia fejlődött ki. A patológiás és fiziológiás terhességet viselő várandósok PlGF-értékei között a legnagyobb különbség közvetlenül a betegség kialakulása előtti időszakban mutatkozott, párhuzamosan a későbbiekben preeclampsias terhesek esetében a sVEGFR-1 plazmaszintjének emelkedésével. Kifejezettebb volt a különbség súlyos, korai kezdetű és méhen belüli növekedési retardációval szövődött preeclampsia esetén. (Levine és mtsai, 2004). Mindezek alapján ígéretes módszer lehet a preeclampsia előrejelzésére a sFlt-1(sVEGFR-1)/PlGF hányados meghatározása, melynek hatékonysága fokozható további tényezők mérésével (szolubilis endoglin, PAPP-A, ADMA, placentalis protein-13, AT1-AA, inhibin A) (Block és mtsai, 2010).

Számos, a preeclampsia megelőzésének lehetőségeit vizsgáló tanulmány született, ezek között jól felépített, nagyméretű, véletlenszerű kiválasztást alkalmazó vizsgálatok is voltak, az eredményeket metaanalízisek is feldolgozták (Knuist és mtsai 1998, Churchill és mtsai 2007, Hofmeyr és mtsai 2014, Dodd és mtsai 2010, Bujold és mtsai 2010, Rodger és mtsai 2014, Pulido és mtsai 2016). Az adatok szerint összességében elmondható, hogy egyértelműen hatékony módszer jelenleg nincs a preeclampsia megelőzésére.

A prevenció terápiaira használt és esetleg használható gyógyszerek hatásmechanizmusát preeclampsiaiban a 6. ábra foglalja össze.



### 6. ábra

#### *Preeclamsziára jellemző patológiás változások és a prevencióra javasolt gyógyszerek hatásai*

ASA aszpirin, COX ciklooxygenáz, sFlt soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sVEGFR-1), sEng szolubilis endoglin, PlGF placentális növekedési faktor, VEGF vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, TXA2 tromboxán A<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> prosztaciklin. (Ma'ayeh és mtsai 2020) közlemény módosítás nélkül átvett ábrája.

Preeclamsziában emelkedik az sFlt-1(sVEGFR-1) és a szolubilis endoglin (sEng) szintje, amik anyai vasoconstrictiót és hypertenziót okoznak. Az emelkedett sFlt-1 és sEng szintek és a placentális ischemia csökkentheti a PlGF és VEGF szintet, ami szintén jellemző a preeclamsziás betegekre.

A gyulladásra adott válaszként preeclampszában aktiválódik a ciklooxygenáz (COX), ami a TxA<sub>2</sub> szint emelkedését és az endoteliális sejtek prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) termelésének csökkenését eredményezi (Walsh 2004). Az aszpirin a COX - már tankönyvekben is példaként szereplő - irreverzibilis gátlószere (Ádám és mtsai 2006), így thrombocyta- és gyulladásgátló hatást fejt ki. Az arachidonsavnak mind TxA<sub>2</sub>-ná, mind PGI<sub>2</sub>-né történő átalakulását akadályozza. A PGI<sub>2</sub> a TxA<sub>2</sub>-vel ellentétben gyorsan pótlódik, így az aszpirin a kórosan megemelkedett TxA<sub>2</sub> szintet fogja csökkenteni. Az aszpirin nemszelektív COX gátló, így a COX-1 gátlásán keresztül a hypoxia által kiváltott sFlt-1 overexpressziót is mérsékli, ezzel is erősítve preventív hatását (Ma'ayeh és Costantine 2020). Az aszpirin jelenleg az egyetlen preeclampszia megelőzésére javasolt gyógyszer. Több, mint 40 éve használják preventív céllal, napi 50–150 mg dózisokat alkalmazva. Számos tanulmány szerint a prosztaglandin-anyagcsere befolyásolásán keresztül a kis dózisú aszpirin terápia mérsékelten képes csökkenteni a preeclampszia kialakulásának kockázatát (Pereira és mtsai 2006). Az aszpirinnel végzett vizsgálatok nem minden esetben erősítették meg jótékony hatását. Ez többek között annak köszönhető, hogy eltérő kockázati csoportba tartozókat és gesztációs korban lévőket vontak be a tanulmányokba (Roberge és mtsai 2018), eltérő dózisokat alkalmazva. A legfrissebb szisztematikus áttekintések és metaanalízisek az aszpirin preventív tulajdonságát megerősítik, és azt mutatják, hogy a legkedvezőbb hatások akkor fordulnak elő, ha az aszpirinkezelés a terhesség 16. hete előtt, optimális esetben a 12. hét előtt kezdődik (Roberge és mtsai 2017, Mangham és mtsai 2009, Subtil és mtsai 2003).

A közelmúlt egyik kutatása volt a fent már említett az ASPRE-study, melynek kapcsán a hatékony első trimeszteri preeclampszia szűrővizsgálati módszer kidolgozása mellett sor került egy igen nagy esetszámú kettős vak vizsgálatra is, mely az aszpirin preventív hatását vizsgálta preeclampszában. Eredményei alapján a 12. héttől (11-14. hét) megkezdett kis dózisú (150 mg este, szájon át) aszpirin kezelés nagy rizikójú várandósok esetében a korai (34. gesztációs hét előtti) preeclampszia előfordulását 82%-kal csökkentette a placebo szedő csoporthoz képest, míg a késői (34. gesztációs hét utáni) preeclampsziára nem volt hatással (Rolnik és mtsai, 2017).

Jelenleg az U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF) és az American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) abban az esetben javasolja az aszpirin alkalmazását, ha a terhes nő nagy kockázati csoportba tartozik (krónikus hypertónia, pregesztációs diabetes mellitus, ikerterhesség, vesebetegség, autoimmun betegség) (LeFevre 2014, Espinoza 2019). Nagyon fontos szempont, hogy az aszpirint biztonságosan lehet alkalmazni terhesség alatt és hosszú idejű követéses vizsgálatok szerint sem növeli az egészségügyi problémák kockázatát (Henderson és mtsai 2014, LeFevre 2014).

Preeclampsziában az inzulinrezisztencia fokozódása figyelhető meg. Felmerült, hogy a II. típusú diabetes kezelésére használt metformin (biguanid, dimetil-biguanid-hidroklorid) akadályozhatja a preeclampsia kialakulását. A metformin antidiabetikus, inzulinérzékenyítő hatását a máj glükoneogenezisének közvetlen és inzulinnal közvetített gátlásával, valamint a gastrointestinalis glükóz felszívódásának csökkentésével és a perifériás szövetek glükózfelvételének fokozásával fejt ki (Foretz és mtsai 2014). A metformin csökkenti az inzulinrezisztenciát, emellett javítja a szív-érrendszeri funkciókat és mérsékli a terhességi súlynövekedést (Genest és mtsai 2012). A metformin dózisfüggően csökkenti a preeclampsziában megemelkedett sVEGFR-1(sFlt-1) és sEng szinteket is. Ezekkel a hatásokkal ellensúlyozni lehetne a placenta rossz perfúzióját és javítani lehetne az angiogén/antiangiogén egyensúlyhiányon (Brownfoot és mtsai 2016). A metforminnal végzett vizsgálatok változatos eredménnyel zárultak. Egy metformin/placebo kezelést alkalmazó, túlsúlyos (BMI>35), nem diabeteses terhes nőket vizsgáló tanulmány a preeclampsia 75 %-os csökkenéséről számolt be (Syngelaki és mtsai 2016). Ezzel szemben egy nemrég elvégzett metaanalízis, amiben szintén metformin/placebo kezeléseket elemeztek, nem mutatta ki, hogy a metformin csökkentené a preeclampsia kockázatát (Alqudah és mtsai 2018). A metformin használatát akadályozhatják a gyakori mellékhatások is. A betegek akár 25%-ánál átmeneti gyomor-bél tünetek (émelygés, hányás, hasmenés, fémes íz érzet) jelenhetnek meg. A metformin hosszú távú alkalmazása B12-vitamin hiányt eredményezhet. Rendkívül ritkán, de előfordulhat súlyos laktacidózis is (Lautatzis és mtsai 2013).



esomeprazolal végzett vizsgálatok kimutatták, hogy gátolhatja a sVEGFR-1(sFlt-1) és az sEng termelődését, vazodilatáló hatást gyakorolhat, és csökkentheti az endotél rendellenességeket. Ezek a hatások az esomeprazol potenciális szerepét vetették fel a preeclampsia prevenciójában. Az esomeprazol protonpumpa-gátló, általában gastro-oesophagealis reflux és peptikus fekély betegség kezelésére használják (Teng és mtsai 2015). Az esomeprazol képes volt ellensúlyozni az állati modellekben kiváltott sVEGFR-1(sFlt-1) túlzott expresszióból származó preeclampsia tüneteket is (Saleh és mtsai 2017, Onda és mtsai 2017). A preklinikai vizsgálatok során a sVEGFR-1(sFlt-1) gátló hatása fokozódott, amikor a metformint adták az esomeprazolhoz (Kaitu'u-Linu 2018). A jelenlegi adatok nem támasztják alá az esomeprazolhoz fűzött reményeket. Egy randomizált (119 bevont fő), placebo-kontrollos vizsgálatban napi 40 mg esomeprazol alkalmazása nem hosszabbította meg a terhességet, és nem csökkentette az sFlt-1 szintet (Cluver és mtsai 2018). Ennek oka lehetett az alkalmazott esomeprazol alacsony dózisa. A vizsgálatba bevont nők emellett randomizáláskor 26–31 hetes terhességi korban voltak, így az esomeprazol prevenció hatásához valószínűleg nem állt rendelkezésre elegendő idő. A megalapozott következtetések levonásához további vizsgálatokra van szükség. Elsősorban az esomeprazol magasabb dózisának hatékonyságát és biztonságosságának értékelését kellene elvégezni a preeclampsia kezelésében. A protonpumpa-gátlók általában nagyon biztonságosak. A használatukkal járó káros hatások általában inkább a hosszú távú fogyasztáshoz kapcsolódnak. Ide tartoznak az akut és krónikus vesebetegség, hypomagnezémia, a közösségben szerzett tüdőgyulladás, csonttörések és Clostridium difficile fertőzések. A protonpumpa-gátlók terhesség alatti alkalmazása biztonságos, nem kapcsolódnak hozzájuk teratogén hatások, nem növelik a vetelési kockázatot és a koraszülés előfordulását (Pasternak és Hviid 2010, Gill és mtsai 2009).

Több száz eset alapján előző placenta károsodás esetén alacsony molekulásúlyú heparin/LMWH (low-molecular-weight heparin) terápia javíthatja a következő terhesség kimenetelét (Dodd és mtsai 2010, Rodger és mtsai 2014).

A Ca szupplementációt, mint lehetséges vérnyomáscsökkentőt, intenzíven vizsgálták. Több ezer esetet tanulmányozva azt állapították meg, hogy napi 2 gramm Ca-nak védő hatása preeclampsia ellen alacsony Ca bevitelnél lehet (Hofmeyr és mtsai

2014).

Az arginin szupplementáció (jellemzően napi 3 gramm) ígéretesnek tűnik preventív célból. Egy több száz esetszámú vizsgálat eredményei alapján nagy kockázatú nőknél csökkentheti a preeclampsia előfordulását, növelheti a terhesség időtartamát és a magzat súlyát. Az eredmények nem egyértelműek, statisztikai alátámasztásához még további vizsgálatokra lesz szükség (Dorniak-Wall és mtsai 2014, Pulido és mtsai 2016).

Az alacsony sótartalmú diétának (kb. 400 eset) és az antioxidánsoknak (több ezer esetszám) nincs kimutatható hatása (Knuist és mtsai 1998, Poston és mtsai 2006, Rumbold és mtsai 2006, Spinnato és mtsai 2007, Villar és mtsai 2009). Antidiuretikummal (7000 eset) előnyös hatást nem sikerült igazolni, a hányinger és hányás előfordulása viszont nőtt (Churchill és mtsai 2007).

Az omega3 zsírsavak jelenlétében a tromboxán A2 helyett a kevésbé aktív tromboxán A3 nagyobb koncentrációban képződik, mely gyengébb vazokonstriktív hatást eredményez. (Knapp és mtsai 1986) Ennek okán felmerülhet, hogy a várandósoknak adott halolaj készítmények is csökkenthetik a kórkép előfordulását. Egy patkányokon végzett kutatás során felvetődött, hogy az omega3 zsírsavak és az E vitamin szupplementációjának a placenta angiogenezisére kifejtett hatása eltérő a preeclampsia altípusaiban, ez a pozitív hatás csak késői preeclampsziában igazolódott (Vaishali és mtsai 2019).

### **1.13. A preeclampsia kezelése**

A minden terhes nőnek rutinszerűen javasolt multivitamin és folsav kiegészítésben, valamint a második trimeszertől alkalmazott vaspótlásban természetesen a későbbiekben preeclampsziában szenvedők is általában részesülnek. A nagy kockázati csoportba tartozóknak preventív céllal kis mennyiségű (150 mg/nap) aspirin, kórelőzményekre alapozva LMWH adható. Ambuláns kezelés enyhe hypertónia esetében, fiatal nulliparák kivételével alkalmazható. Kórházi kezelés akkor válik szükségessé, ha a systolés vérnyomás tartósan 150 Hgmm vagy magasabb, a diastolés

vérnyomás tartósan 90 Hgmm vagy magasabb, proteinuria lép fel vagy, ha a preeclampsia szubjektív tünetei jelentkeznek. Preeclampszában a vérnyomáscsökkentő kezelés mellett a konvulziók megelőzése is kulcsfontosságú. Preeclampszában alkalmazható vérnyomáscsökkentők: alfa-metildopa, nifedipin, verapamil, metoprolol, urapidil, hydralazin, labetalol. Konvulziók megelőzésére Mg adható. Mivel a preeclampsia egyetlen definitív kezelését a lepényszövet eltávolítása, azaz a terhesség befejezése jelenti, így koraszülött tartományban mindenképpen számításba kell venni a fenyegető koraszülés tényét, és haladéktanul meg kell kezdeni a szteroidprofilaxist. Konzervatív kezelésre nem reagáló, súlyos preeclampsia, eclampsia, HELLP-szindróma, valamint magzati disztressz, súlyos oligohydramnion (magzatvíz index < 2 cm) , IUGR (magzat becsült súlya < 5 percentil), kóros Doppler vizsgálati eredmény esetén a terhesség császármetszéssel történő befejezése javasolt. Alacsony thrombocytaszámnál műtétet megelőzően thrombocyta pótlás is szükséges lehet. Jelentős fehérjevesztés esetén humán albumin pótlás is szóbajön.

Eclampsia (görcsroham) jelentkezésekor elsődleges a szabad légutak biztosítása, a páciens sérülésektől való védelme illetve az antikonvulzív - (diazepam, MgSO<sub>4</sub>) és a vérnyomáscsökkentő kezelés. Fontos továbbá az esetleges kísérő kórállapotok (agy- illetve tüdőödéma, agyvérzés, veseelégtelenség, HELLP-szindróma, lepényleválás) felismerése, kezelése valamint azok megelőzése is.

A HELLP-szindróma kezelésének kulcsa a gyors diagnózis, a laboreltérések mértékének tisztázása, a haemostatus rendezése valamint a preeclampsia kezelésének mielőbbi megkezdése. A HELLP szindróma diagnosztikus kritériumainak teljesülése esetén haladéktalanul be kell fejezni a terhességet és a szülést követően a decidua minél tökéletesebb eltávolítása érdekében abrasio elvégzése is szükséges. A szülést követően indokolt a páciens intenzív megfigyelése, esetenként plazmapheresis is szükségessé válhat (Paulin 2007).

## 1.14. Gyógyszerfejlesztések

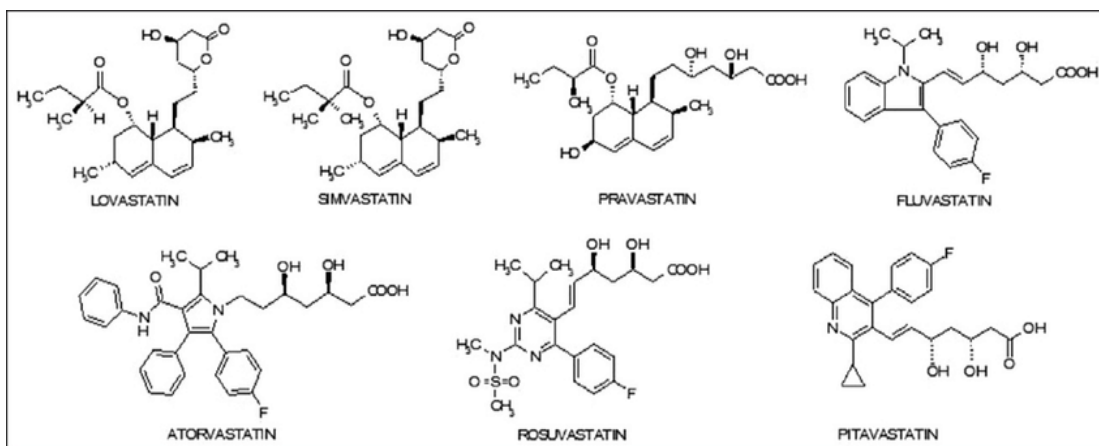
A preeclampsia jelenleg is a legveszélyesebb terhességi kórképek közé tartozik, aki kezelése és hatékony megelőzése kielégítően a mai napig sem megoldott. A gyógyszerfejlesztésnek a betegség súlyosságát, gyakoriságát, a hatékony gyógyszer hiányát tekintve nagyon intenzívnek kellene lennie. Ennek ellenére a többi kardiovaszkuláris betegség terápiáját célzó gyógyszerfejlesztések, vizsgálatok száma több, mint 40-szerese a terhesség alatti hasonlókénak. A jelenleg futó és lezárult amerikai gyógyszervizsgálatokat az International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations (IFPMA) Clinical Trials Portal és a National Institutes of Health's Clinical Trials Database, az európaiakat a <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2009-012968-13/GB> adatbázisokban lehet tanulmányozni. A terhesség (pregnancy) keresőszót használva a találatok többsége a terhességet mint kizáró okot említi. A preeclampsia keresőszót használva az európai adatbázisban a vizsgálatok száma összesen 42, ebből kettő azonos (egyét nem kezdtek el), így 41 vizsgálatról van szó. Jelenleg 34 vizsgálatnak még nincs hozzáférhető eredménye, 7 vizsgálat eredményei az adatbázisban hozzáférhetőek, tehát befejezettek tekinthetők. Ha figyelembe vesszük, hogy a befejezett vizsgálatoknál kb. 2 évig tartott az adatok felvétele (az első és utolsó bevontak tényleges vizsgálata) és 2-3 év alatt dolgozták fel és tették közzé az eredményeket, akkor árnyaltabb képet kapunk. A lezárt vizsgálatok adatai szerint 2020-ban a 2015. előtt kezdett vizsgálatoknak az eredményei már hozzáférhetőnek kellene lennie. Eszerint a kapott adatok hozzáférhetősége sajnos korlátozott, mert 19, 2015. előtt kezdett vizsgálat adatai nem hozzáférhetőek. A vizsgálatokba leggyakrabban bevont gyógyszerek: heparinok (7 eset), aszpirin (5 eset), statinok (4 eset), ebből a pravastint 3 alkalommal vontak be vizsgálatokba. A preeclampsia megelőzést és/vagy kezelést elsőrendű célnak tekintve jelenleg a statinok tekinthetők elsődleges potenciális szernek.

### 1.14.1. Statinok

A statinok (3-hidroxi-3-metil-glutaril-KoA reduktáz inhibitorok) a leggyakrabban használt koleszterinszint csökkentő gyógyszerek. Gazdasági jelentőségüket mutatja, hogy a világ legnagyobb forgalmú gyógyszerei közé tartoznak. Jelenleg a statinok hat

típusát használják; a természetes csoportba tartozó lovastatint, pravastatint és simvastatint és a szintetikus csoportba tartozó atorvastatint, fluvastatint és rosuvastatint. A mesterséges-szintetikus osztályozás mellett vízdékonyságuk szerint csoportosítják őket. A hidrofíli statinok közé a pravastatin és a rosuvastatin, a lipofíli statinok közé a simvastatin, lovastatin, atorvastatin, fluvastatin tartozik. A hidrofíli statinok szöveti felszívódása -a máj kivételével- a lipofíli statinoknál rosszabb és kevesebb mellékhatást mutatnak, mivel alacsonyabb a citokróm p450 enzimtől való függőségük. A statinok szerkezeti különbségük (7. ábra) miatt eltérő farmakokinetikai tulajdonsággal rendelkeznek (Kim és mtsai 2007). Habár a különféle típusú statinok hatékonysága kissé eltér, a klinikai körülmények között nem létezik szabvány a statinok kiválasztására. Elsődleges hatásukon kívül a statinok pleiotróp hatásokkal is rendelkeznek. A pleiotróp hatásaik közé proangiogén, antiinflammatorikus, antioxidáns, neuroprotektív és antitrombotikus tulajdonságok is tartoznak, beleértve az endotélium védelmét is. A statinok fokozzák az eNOS expresszióját az eNOSmRNS féléletidejének meghosszabbításával. A simvastatin és lovastatin fokozza az eNOS expresszióját humán endotélsejt-kultúrában, és kivédi az enzim mRNS-ének oxidált LDL okozta funkcióvesztését. (Laufs és mtsai 1998) A statinok csökkentik a kaveolin-1 fehérje expresszióját, és így annak az eNOS-t gátló hatását. A statinok aktiválhatják a foszfatidil-inozitol-3-foszfát (PI3K)/Akt útvonalat és elősegítik az eNOS működését Ser1177 foszforilációval és Thr495 defoszforilációval (Kureishi és mtsai 2000).

A preeclampsia endotél károsodást is okoz, így a statinok potenciális terápiás használata preeclampsziás betegeknél régen felmerült. A statinok potenciális teratogén hatása miatt terhesség alatt nem alkalmazhatóak. Néhány bevezető tanulmány arra utal, hogy használatuk nagy kockázatú csoportban előnyös lehet. Egy pilot munkában 20 magas kockázatú beteget véletlenszerűen két csoportra osztottak, az egyik csoportot pravastatinnal, a másikat placeboval kezeltek. A placebo csoport 40 %-ánál preeclampsia alakult ki, míg a pravastatinos csoportban nem volt preeclampsziás eset (Costantine és mtsai 2016).



## 7. ábra

### A statinok szerkezeti képlete

A preeclampsia kialakulásában a placentának kulcsszerepe van, ezért súlyosabb esetben a terhességet terminálni kell, a placenta eltávolításával a tünetek gyorsan enyhülnek. A hatékony kezelést az is akadályozza, hogy a betegség multifaktoriális, elégtelen táplálkozás, környezeti-, genetikai tényezők egyaránt befolyásolják a kialakulását (Peraçoli és mtsai 2019).

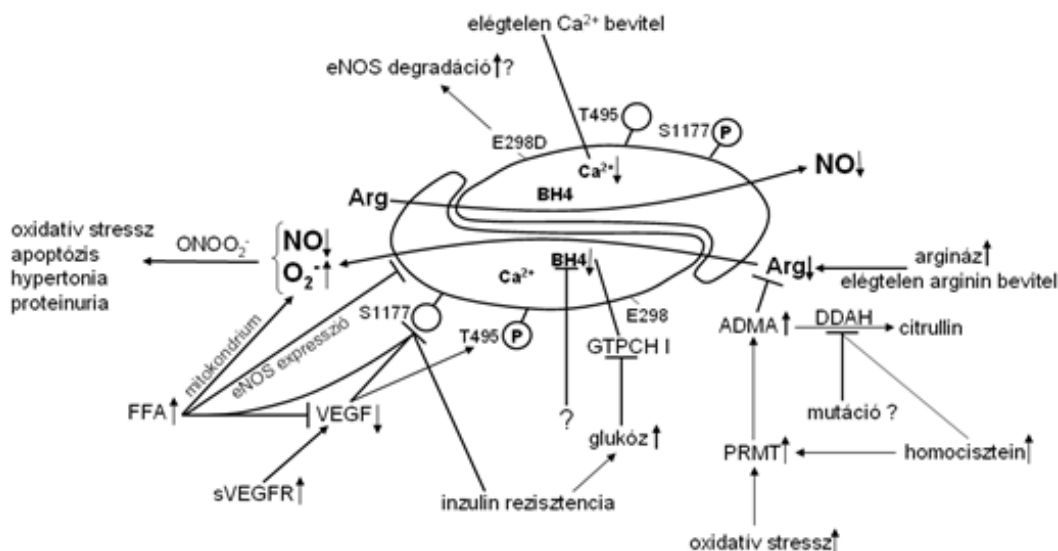
A statinok közül preeclampsia kezelésére a leggyakrabban a pravastatint (7. ábra) alkalmazzák. A pravastatinra azért esett a választás, mert előnyös hatásai mellett a megfigyelt káros mellékhatások száma ennél a statinnál volt a legkevesebb. Az is fontos szempont, hogy a preeclampsziára jellemző endotél károsodást a rosuvastatin és simvastatin fokozhatja (de Alwisha és mtsai 2020).

### 1.15. A NO szerepe preeclampszában

A NO, mint hatékony fiziológiás vérnyomáscsökkentő szer már több, mint húsz éve ismert (Moncada 1994). A NO-t NO szintáz izoenzimek szintetizálják argininból. A preeclampsia egyik kritériuma a terhesség alatt kialakuló hypertónia (Brown és mtsai 2018). Emiatt régen felmerült és igazolódott, hogy az elégtelen NO termelés hozzájárulhat a preeclampsia kialakulásához.

A placenta elsősorban endotelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) izoenzimet expresszál, mely az erek intimájában termelődik. A nitrogén-monoxid szabadon diffundál a sejtek között, az endotélből átjut az érfal simaizomsejtekben gazdag médiájába. A NO a placenta ereinek vasodilatációját okozza, parakrin úton átjut a myometriumba is, és hozzájárul a méhizomzat relaxációjának fenntartásához a terhesség alatt. Az eNOS a citotrofoblasztokban is kimutatható, szerepet játszik a trofoblasztok endovaszkuláris inváziójában, amely az élettani placentáció elengedhetetlen része (Vatish és mtsai, 2006). A NO hatásának legfőbb közvetítője a cGMP-molekula, a hatás lecsengéséért a foszfodiészteráz V (PDE5) izoenzim felelős, amely specifikusan átalakítja a cGMP-t 5'GMP-vé. A foszfodiészterázok nem specifikus gátlója a teofillin, a PDE5 specifikus gátlója a sildenafil és a tadalafil.

A preeclampszában megfigyelhető csökkent NOS aktivitás okait a 8. ábra foglalja össze.



## 8. ábra

### Az eNOS és a preeclampsia kapcsolata

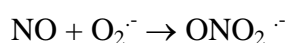
A Ca<sup>2+</sup> elégtelenség az enzimaktivitást csökkenti. Az argináz indukciója, elégtelen arginin bevitel a szubsztrátellátottságot csökkenti. A sVEGFR, FFA mennyiségének emelkedése, az inzulinrezisztencia az aktiváló Ser1177 foszforilációt gátolja, az inaktíváló Thr495 foszforilációt segíti. A BH4 affinitás csökkenése, a GTPCH I degradációja BH4 elégtelenséget okoz és az enzim szuperoxidot termel. Az ADMA kompetitív gátlószere az eNOS-nak, a DDAH elégtelen működése a szintjét emelheti. Az eNOS elégtelen mennyisége (FFA szint emelkedés, mutáció miatt) a potenciálisan termelhető NO mennyiségét is csökkenti.

**ADMA** aszimmetrikus dimetil-arginin, **DDAH** dimetilarginin dimetilaminohidroláz, **FFA** nem észteressített szabad zsírsav, **GTPCH I** GTP ciklohidroláz I, **PRMT** protein-arginin-metiltransferáz, **sVEGFR** szolubilis vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor. Az ábra a (Kukor és Valent 2010) változtatás nélkül átvett ábrája



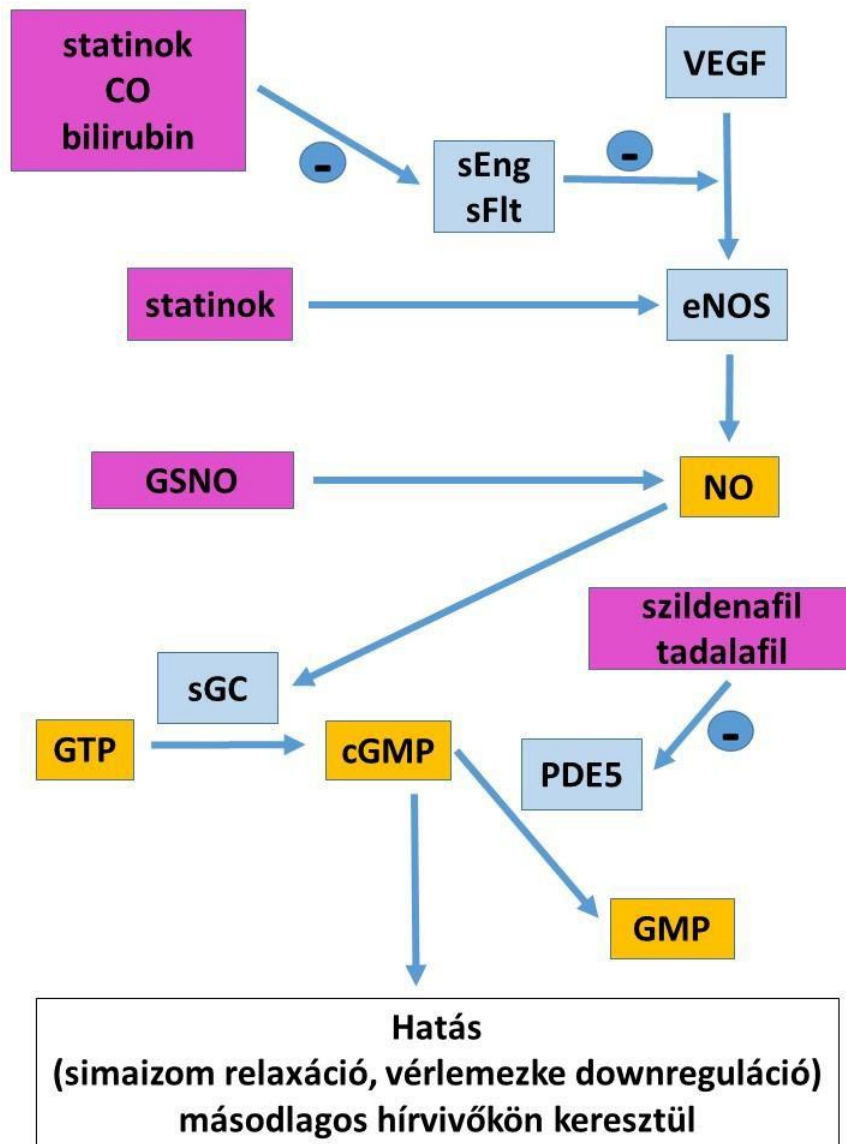
A NO fontosságát mutatja az is, hogy preeclampsia állatmodellt lehet létrehozni a NOS gátlásával terhes patkányokban vagy egerekben. Preeclampsia modellekhez már harminc éve alkalmazott és jelenleg is a leggyakrabban használt NOS inhibitor a N-omega-nitro-L-arginin-metil-észter (NAME) (Molnár és mtsai 1994, Sekimoto és mtsai 2020, Yang és mtsai 2019, Zou és mtsai 2019). Terhes patkányokban sVEGFR (szolubilis VEGF-receptor) adásával preeclampsia tüneteket váltottak ki, és ebben az esetben is csökkent NOS aktivitást figyeltek meg. A preeclampsia tüneteit tehát nem a NOS közvetlen gátlásával érték el. Érdekes, hogy a NOS szubsztrát L-arginin bevitellel a vérnyomást sikerült csökkenteni ebben az esetben is (Murphy és mtsai 2012).

A csökkent hatékony NO szint kialakulásának több oka lehet. Hozzájárul a preeclampsias nők oxidatív stressze. A NO és szuperoxid azonnal reaktív peroxinitritté alakul:



A NO átalakulása mellett a peroxinitrit is a patológiás folyamatokat erősíti. Oxidáló hatásán túl fehérjéket nitrálhat, működésüket rontva (Kukor és Valent 2010). A placentában elsősorban az endoteliális NO szintáz (eNOS) izoforma található. A NOS működése tetrahydrobiopterint (BH4) igényel. A placenta BH4 koncentrációja a féltelítési tartományban (0,11  $\mu\text{M}$ ) található, így a BH4 szintje jelentősen módosíthatja az enzimaktivitást. Az első trimeszterben a trofoblaszt átlagos BH4 koncentrációja körülbelül  $0,20 \pm 0,09 \mu\text{M}$ , a terhesség terminusa után átlagosan  $0,057 \pm 0,023 \mu\text{M}$  (Kukor és mtsai 1996, Kukor és mtsai 2000). A terhesség végén csökkent NOS aktivitás tapasztalható, ehhez hozzájárulhat a BH4 szint csökkenése is. Preeclampsias placenták eNOS aktivitását mérve azt tapasztaltuk néhány esetben, hogy preeclampsias placenták eNOS aktivitása nem emelkedik fiziológiás BH4 szintnél, a maximális aktivitás eléréséhez nagyon magas BH4 koncentráció szükséges. Ezeket a mintákat BH4 rezisztenseknek neveztük (Kukor és mtsai 2000).

A NOS aktivitás növelésével a NO szint emelkedik, így a preeclampsia kezelésének egyik lehetséges módja a NOS aktivitásának, a NO szintjének növelése. Néhány potenciális hatóanyagot a 9. ábra mutat be. Eszerint a pravastatin hatékony lehet a NO szint normalizálásában is.



9. ábra

### *Statinok, sildenafil, tadalafil és a GSNO hatása az endoteliális diszfunkcióra*

CO: szén-monoxid, VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, GSNO: S-nitroso-glutation, eNOS: endotheliális NO szintáz, sFlt: soluble Fms like tyrosine kinase-1, sEng: szolubilis endoglin, cGMP: ciklikus-guanozin-monofoszfát, GTP: guanosine triphosphate, sGC: szolubilis guanilil cikláz, PDE5: foszfodiészteráz 5. Az ábra az (Everett és mtsai 2012) hivatkozás összefoglaló ábrájának módosításával készült.

## 2. Célkitűzések

### 2.1. Célok

A gyógyszeripar az egyik legjövödelmezőbb iparág, emiatt az új hatóanyagok kifejlesztése mellett számos innovációs megoldás is születik. Ennek egyik módszere a már engedélyezett és használatban lévő gyógyszerkészítmények jótékony pleiotróp hatásán alapuló új célcsoport keresése, és a hatásmechanizmus minél pontosabb felderítése. Egészséges terhes nőt nem szabad preventív céllal kezelni, ezért potenciális terapiás szereket megfelelő gondossággal kiválasztott, preeclamsiára nagy kockázatú csoportokban érdemes használni. A terhesség alatt alkalmazott készítmények hatásmechanizmusa a csoport (várandos nők) érzékenysége miatt korlátozottan tanulmányozható. Állatokban a főemlősök kivételével nem alakul ki preeclamsia, ezért a mesterségesen kiváltott preeclamsia modellek eredményei fenntartásokkal fogadhatóak el.

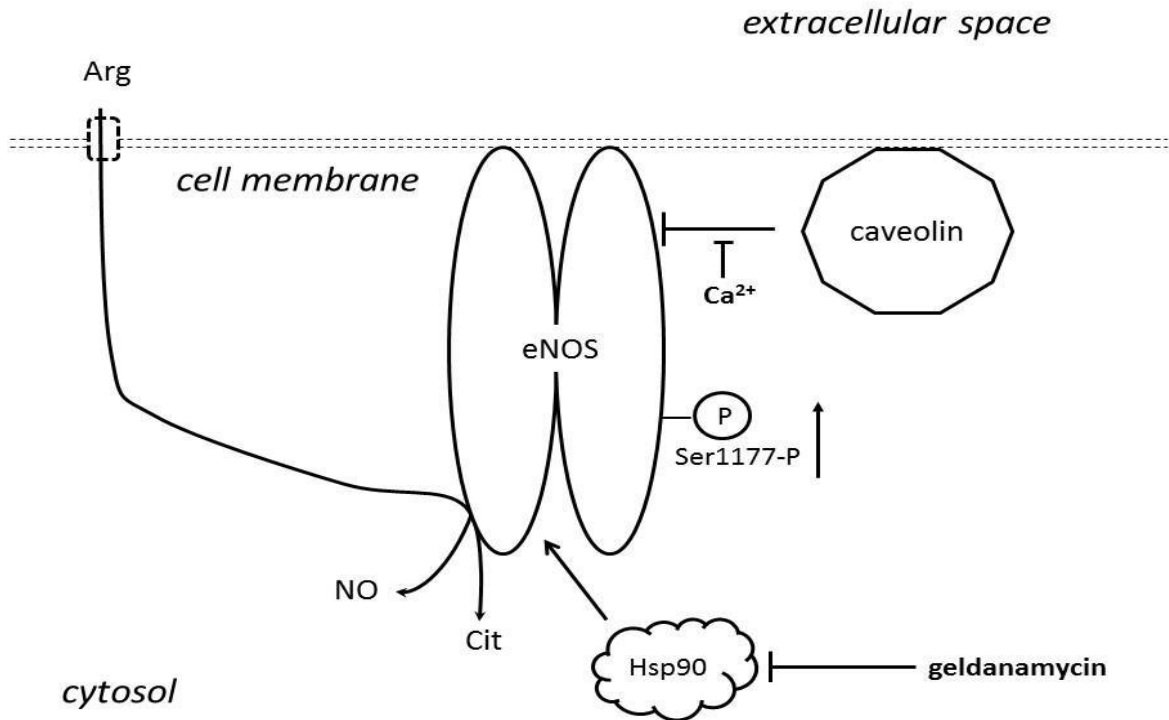
Preeclamsiában a patológias folyamatok jelentős része a placentához köthető. Az egyik markáns patológias eltérés az elégtelen NO termelés. Az eddigi eredményesnek mondható preeclamsia kezelést célzó pilot vizsgálatok közé tartoznak a pravastatin terapiák. Munkám során pravastatin hatását vizsgáltam preeclamsiás placenták NOS aktivitására, ennek során mind a hatásmechanizmus pontosításához, mind a lehetséges célcsoport minél specifikusabb kiválasztásához igyekeztem alapkutatásban használni biokémiai módszerekkel hozzájárulni. A fő célkitűzések a következők voltak:

- A pravastatin gyors hatásmechanizmusának vizsgálata egészséges és preeclamsiás placenták NOS aktivitására.
- Új metodikai módszer kidolgozása preeclamsiás placenták NOS-ának tetrahydrobiopterin érzékenységének megállapításához.
- Annak vizsgálata, hogy a pravastatin alkalmas lehet-e tetrahydrobiopterin rezisztens preeclamsiás placenták NOS aktivitását fiziológias mértékűre emelni.

## 2.2. Elméleti megfontolások

Az eNOS aktivitását gyorsan több módon is lehet módosítani (10. ábra). Egyrészt a plazmamembránhoz, ezen belül a caveolákhoz kötött eNOS szubsztrátellátottságát arginin transzporterekkel lehet biztosítani. Az enzim aktivitását fokozza az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  és tetrahidrobiopterin- ( $\text{BH}_4$ -) koncentráció emelkedése és csökkenti az enzim endogén kompetitív inhibitora, az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA).

Az eNOS-t aktiváló Ser1177 aktiváló foszforiláció és Tyr495 defoszforiláció a két legjelentősebb foszforilációhoz köthető szabályozási mód. A Ser1177 foszforilációját és a Thr495 defoszforilációját a fellépő nyíróerők, VEGF, inzulin, bradikinin és  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimulálja (Harris és mtsai 2001). A VEGF és Akt kináz-függő szignáltranszdukció a Ser1177 foszforilációját és a Thr495 defoszforilációját váltja ki. (Sandrim és mtsai 2008) Az eNOS aktivitását fehérje-fehérje kapcsolatok is módosítják. A Hsp90 kötődése aktiválja, a caveolin gátolja az eNOS-t. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedése a caveolin disszociációját okozza, ezzel aktiválja az eNOS-t (Kukor és mtsai 2010).



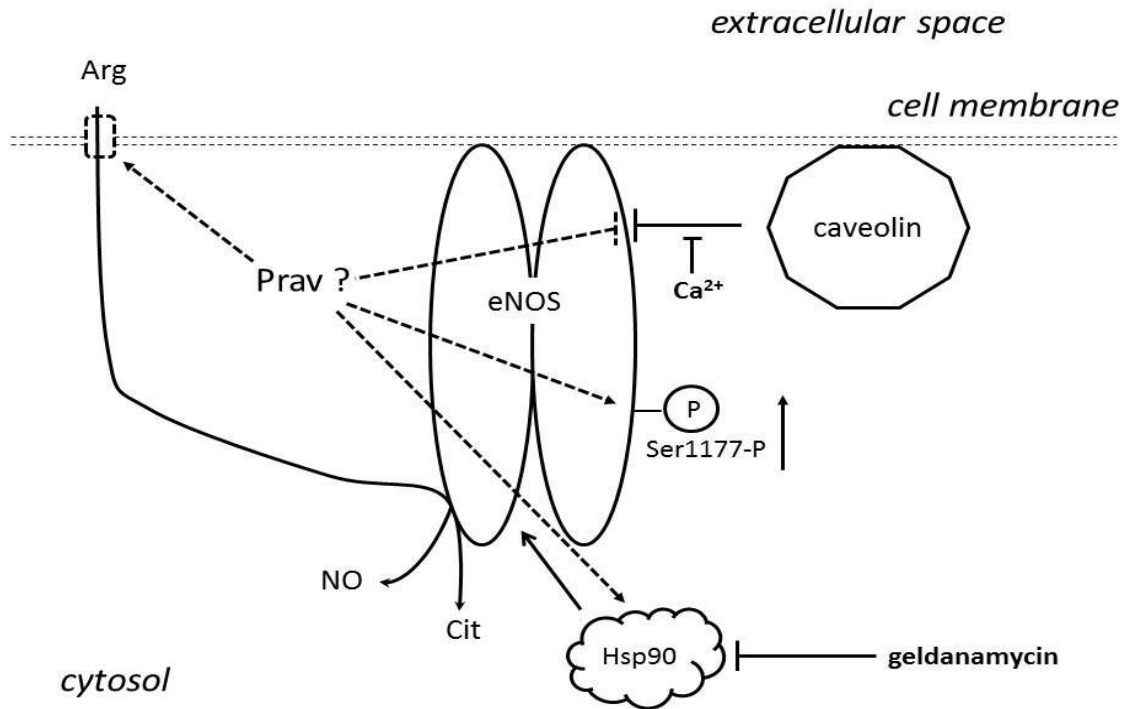
### 10. ábra

#### Az eNOS aktivitás szabályozása

A pravastatin pleiotróp hatásainak mechanizmusa molekuláris szinten még felderítésre vár. A statinok nagy affinitással a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-KoA reduktázhoz kötődnek, de pleiotróp hatásaik a koleszterinszinttől függetlenek, ezért feltételezhető, hogy más fehérjékkel kapcsolódva fejtik ki hatásukat.

A pravastatin és eNOS kapcsolatának vizsgálatánál azt a stratégiát követtük, hogy megvizsgáltuk, hogy pravastatinnal módosítható-e az eNOS-caveolin, eNOS-Hsp90 kapcsolata, változik-e a mikroszóma arginin felvétele, illetve változik-e az eNOS Ser1177 foszforilációja (11. ábra)? Az eNOS Ser1177 és Tyr495 foszforilációs állapota reciprok módon változik, együttes változásuk hatásosabban módosítja az eNOS aktivitását. Az eNOS foszforilációs állapotának vizsgálatához elegendő vagy a Ser1177 vagy a Tyr495 foszforilációs állapotát vizsgálni. Előkísérleteink során a Ser1177 foszforilációjának vizsgálata kedvezőbb volt a Tyr495-énél, ezért a Ser1177 foszforilációját választottuk.

A caveolin és Hsp90 pravastatinnal történő feltételezett kapcsolatát gátlószerek (caveolin-Ca és Hsp90-geldanamycin) jelenlétében vizsgáltuk.



### 11. ábra

*A pravastatin az eNOS aktivitást módosító feltételezett támadáspontjai (Pánczél és mtsai, 2019)*

A preeclampsziás placenták NOS aktivitásának esetleges BH4 inszenzitivitása 2000 óta ismert (Kukor és mtsai 2000). A vizsgálatban kb. 70 %-os volt a preeclampsziás minták BH4 inszenzitivitása. A NOS aktivitásmérés redukálószer (ditiotreitól) jelenlétében történik, ami védi a BH4-t az oxidációtól. A BH4 nagyon érzékeny oxidációra, dihidrobiopterinné alakul (BH2) (Tóth és mtsai 2002, Valent és Tóth 2004), ami már nem kötődik az eNOS-hoz, így aktivitása csökken. A preeclampsziás placenták fokozott oxidatív stressze a védelem ellenére hatástalaníthatja a mérés során alkalmazott fiziológiás koncentrációjú BH4-t, emiatt a valós BH4 inszenzitivitás megállapításához a használt metodikai módszert módosítani kellett.

## 3. Módszerek

### 3.1. Résztevők kiválasztása és klinikai adatainak felvétele

A vizsgálatba olyan egészséges és preeclampsias terhes nőket vontunk be, akiknek gondozása a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának 2. telephelyén (korábban: Semmelweis Egyetem II. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján, Budapest, Üllői út 78/A) zajlott. A vizsgálathoz az etikai engedélyt az ETT TUKÉB adta meg (engedély száma: 208/2006 (hosszabbítva) és 48995-2016/EKU). A betegek a preeclampsia diagnosztikai kritériumát az International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) 2018-as közleménye (Brown és mtsai 2018) szerint minden esetben kimerítették, a preeclampsias nőknek a terhesség 20. hetét követően a vérnyomása 140/90 Hgmm-nél magasabb volt, és a vizelettel ürített fehérje mennyisége meghaladta a 300 mg/nap-ot vagy a vizelet fehérjetartalma gyorsteszttel legalább ++ volt. A klinikai adatokat a résztvevő páciensek kórlapjaiból, a MedSol rendszerből gyűjtöttük.

### 3.2. Placenta mikroszóma preparálás

Közvetlenül szülés után jég között a placentából a klinikán ollóval különböző helyekről legalább 30 gramm mintát vettünk és haladéktalanul átszállítottuk a biokémiai laboratóriumba. A humán placenta mikroszóma frakciójának van a legmagasabb specifikus NOS aktivitása (Sahin-Tóth és mtsai 1993), emiatt késlekedés nélkül mikroszómát preparáltunk belőle (Pánczél és mtsai 2019). Makroszkópikus izolációt követően a szövetet ollóval daraboltuk, majd kétszeres térfogatú jéghideg homogenizáló oldatban (0,3 M szacharóz; 40 mM HEPES/Na, pH = 7,4; 0,1 mM EDTA; 1 mM dithiothreitol; 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor és 0;2 µg/ml aprotinin) UltraTurrax késes homogenizátorral (IKA Werk, Staufen, Germany)  $\frac{3}{4}$ -es fordulatszámom 60 másodpercig homogenizáltuk. A homogenizátumot nejloniszűrővel történő előtisztítást követően 2 percig 4 °C-on Janetzky K-24 centrifugával 600 g-vel centrifugáltuk, a további preparáláshoz a felülúszót használtuk. A mitokondriumot és nagyobb sejtalkotókat Beckman J2-HS



centrifugával, 15000 g-vel, 30 perces centrifugálással ülepitettük le, a citoszól és a mikroszóma frakció a felülúszóban maradt. A felülúszót 100000 g-vel 60 percig centrifugáltuk 4 °C-on Beckman Optima™ LE-80 K ultracentrifugával. A felülúszó a citoszól, az üledék a mikroszóma frakció. Az üledéket a citoszól tökéletesebb eltávolítása érdekében 2 cm<sup>3</sup> homogenizáló oldattal óvatosan öblítettük, majd homogenizáló oldatban reszuszpendáltuk. A kísérletekhez ezt a mikroszóma frakciót (MS) használtuk. A mikroszóma frakcióból fehérje meghatározásra mintákat különítettünk el, majd azonnal meghatároztuk a NOS aktivitását, a maradék mintákat több részre osztva -80 °C-on tároltuk a NOS BH4 szenzitivitás megállapításához és Western blot analízishez való felhasználásig. Az arginin felvétel vizsgálatához a mintákat folyékony nitrogénben tároltuk.

### 3.3. Fehérje meghatározása

A mikroszóma fehérjetartalmát Lowry módszerével határoztuk meg (Lowry és mtsai 1951). A fehérje meghatározáshoz fagyasztott mikroszóma mintákat 500-szoros térfogatra hígítottuk vízzel, kétszer fél perces wortexelés után használtuk fel. Kalibrációs görbét marha szérum albuminnal készítettünk (0,005-0,2 mg/ml tartományban). 2-2 ml standard vagy minta oldatot 2 ml 4 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 M NaOH, 0,04 % Na-K-tartarát, 0,02 % CuSO<sub>4</sub>-oldattal összekevertünk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután 0,4 ml 1 N Folin-reagenssel kevertük össze és 30 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 750 nm-en extinkciót mértünk.

### 3.4. NO-szintáz aktivitás mérése

A NO-szintáz aktivitását maximális enzimaktivitást biztosító körülmények között (40 mM Na/HEPES pH=7,4; 1 mM Ca<sup>2+</sup>; 1 mM Mg<sup>2+</sup>; 1 mM NADPH, 3 U/cm<sup>3</sup> kalmodulin, 1 mM ditiotritol) határoztuk meg különböző tetrahidrobiopterin koncentrációknál, 37 °C-on, 10 percig inkubálva. A NOS aktivitását placenta mikroszómában mértük C14 arginin szubsztráttal egészséges (n=6-9) és preeclampsziás (n=6-9) minták felhasználásával. Az aktivitást jéghideg 2 ml 50 mM HEPES (pH=5,0), 1 mM NAME-oldattal állítottuk le. A C14 arginint az enzimreakció végtermék C14 citrullintól Dowex 50-W kationcserélő Na<sup>+</sup> ciklusú gyantán választottuk el. A

végterméket 0,5 ml gyantán eluáltuk, 2\*5 ml desztillált vízzel mostuk. Az arginin az eluátummal távozott. A gyantához kötött citrullint 5 ml 1 M NaOH-oldattal eluáltuk. 3\*1 ml eluátum radioaktivitását mértük meg, miután 5-5 ml szcintillációs folyadékkal (66 v/v% toluol, 33 v/v% Triton X100, 0,05% PPO, 0,02% POPOP) összekevertük. Háttérként 1 mM NAME tartalmú mintát használtunk.

A placenta NOS BH4 inszenzitivitás detektálásához a módszert módosítottuk. A mikroszóma preparálásakor a vízdékony, kis molekulatömegű anyagok nagy része a citoszól frakcióban marad, így a BH4 is. A BH4 érzékeny oxidációra, dihidrobiopterinné alakul (BH2) (Tóth és mtsai 2002, Valent és Tóth 2004). A BH2 már nem kötődik az enzimhez, aktivitását nem emeli. Az oxidáció sebessége pH- és hőmérsékletfüggő, a tároláshoz használt enyhén savas (pH=5,0) közegben, -80 °C-on az oxidáció lassú, fiziológias környezetben (pH=7,4; 37 °C) felgyorsul. Az aktivitás meghatározását az oxidáció okozta artefaktum elkerülése végett mindig BH4 érzékeny, egészséges szülésből származó standard mikroszóma minta használata mellett végeztük. Az enzimaktivitást az alapaktivitást biztosító 20 nM, fiziológias 200 nM és farmakológias 50 µM BH4 mellett mértük. A BH4-oxidáció minimalizálása érdekében azt közvetlenül a reakció elindítása előtt mértük a reakcióelegybe. A pravastatin hatását 10 µM koncentrációnál vizsgáltuk.

### **3.5. Az eNOS Ser1177 foszforilációjának vizsgálata Western blot módszerrel**

A mikroszóma minták fehérje koncentrációját 5 mg/ml-re állítottuk be mintapufferrel (2 % nátrium-dodecil-szulfát, 10 mM ditiotritol, 50 mM Tris/HCl, pH=7,4). Ezt követően 5 percig forraltuk, majd 100 µg proteint elektroforetizáltunk 12%-os SDS-poliakrilamid gélben, 29 mA áramerősség mellett, Miniprotean II készüléket és jégfürdőt használva. A fehérjéket polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra transzferáltuk (290 mA, 3 óra). A membránt +4 °C-on éjszaka TBST oldatban (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 2 % marhaszérum albumin) blokkoltuk. Ezt követően anti eNOS-sal (1:1000 hígítás) inkubáltuk 2 órán át 25 °C-on, majd peroxidáz-konjugált második antitesttel (1:5000 hígításban) 1 órán át 25

°C-on. A jelet 1 perces West-one chemiluminescent substrate inkubálást követően röntgenfilmen rögzítettük. A teljes eNOS és Ser1177-en foszforilált eNOS western blot analizisét ugyanazon a membránon végeztük el. Az első vizsgálatot követően az antitesteket 20 ml strippelő oldatban (50 mM Tris/HCl, pH=7,4; 2% nátrium-dodecilszulfát, 50 mM ditiotritol) történő 30 perces, 50 °C-on végzett inkubálással távolítottuk el. Ezután a membránt háromszor 10 ml TBST oldatban mostuk, majd ismét blokkoltuk. Blokkolás után Ser 1177-en foszforilált eNOS antitesttel (anti eNOS Ser1177-P, 1:1000 hígítás) inkubáltuk 2 órán át 25 °C-on, majd az eljárást a második antitesttel való inkubálással a fentiekben leírtak szerint folytattuk. Az eredményeket ImageJ programmal számszerűsítettük.

### **3.6. Placenta mikroszóma arginin felvételének meghatározása rapid filtrációs metodikával**

A placenta mikroszóma arginin felvételét rapid filtrációs metodikával végeztük. Az irodalomban megismert módszert (Bánhegyi és mtsai 2003) arginin felvételre optimalizáltuk. A mikroszómát (1 mg protein/ml) 37 °C-on inkubáltuk mikroszómális homogenizáló pufferben (0,3 M szacharóz, 40 mM HEPES (pH=7.4), 1 mM EDTA, 1 mM ditiotritol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml soytrypsin inhibitor, 5µg/ml leupeptin) 10 µM pravastatinnal vagy anélkül, 10 p ercig. Ekkor 0,5 µCi C14 arginint adtunk a mintákhoz és inkubáltuk 1 percig. Meghatározott időnként (10s) 100 µl mintát vettünk, filtráltuk cellulose acetate/nitrate filter membránon (0,22 µm) és azonnal átmostuk kétszer 3 ml jéghideg 10 mM ornitint tartalmazó homogenizáló pufferrel. A filter radioaktivitását megmértük, miután a filtert feloldottuk szcintillációs folyadékban (66 v/v% toluol, 33 v/v% Triton X100, 0,05% PPO, 0,02% POPOP). A mérést elvégeztük alamethicin (50 µg/mg protein) jelenlétében is, hogy az intravezikulárisan membránhoz kötött radioaktivitást meghatározhassuk. A mikroszóma arginin felvételét az alamethicin nélküli és az alamethicines minták radioaktivitásának különbségéből számoltuk.

### 3.7. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analíziséhez Excel Data analízis szoftvert használtunk. Szignifikancia vizsgálatot t-tesztel végeztünk. Statisztikailag szignifikánsnak abban az esetben fogadtuk el a különbséget, ha  $p < 0,05$ . Az adatokat középérték $\pm$ SD formában adtuk meg, kísérletenként általában 3-6 különböző mintát használtunk.

### 3.8. Anyagok

Az L-[U-14C] arginint (348 mCi/mmol; 12.9 GBq/mmol) az ICN-től szereztük be (Costa Mesa, CA, USA). A (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH<sub>4</sub>) a Research Biochemicals International-től származott (Natick, MA, USA). A L-NG-nitroarginine methylester, NADPH, Dowex 50X8-400, dithiothreitol, L-citrullin, L-arginin, L-ornitin, calmodulin, leupeptin, alamethicin a Sigma-Aldrich Kft-től származott. (Budapest, Hungary). A pravastatin, phenylmethylsulphonylfluoride-ot és HEPES-t a Calbiochem-től (La Jolla, CA, USA) rendeltük meg, és az aprotinint a Bayer Co.-tól (Leverkusen, Germany). Az anti-eNOS, anti-phospho-eNOS/NOS III (Ser1177) és donkey anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated a Millipore-től (Boston, MA, USA) rendeltük. A többi anyag a Reanal-tól (Budapest, Hungary) származik.

## 4.Eredmények

### 4.1. A pravastatin eNOS aktivitásra kifejtett hatásmechanizmusának vizsgálata

A vizsgálathoz 6 preeclampsias és 6 egészséges placentát gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján (Budapest, Üllői út, 78/A részleg). A klinikai adatokat az 1. táblázatban foglaltam össze. Kísérleteinkhez a 6 egészséges mintát kontrollként és a 6 preeclampsias placentából preparált mikroszómát használtuk fel.

#### 1. táblázat

*A pravastatin hatásmechanizmusának vizsgálatában részt vevők klinikai adatai*

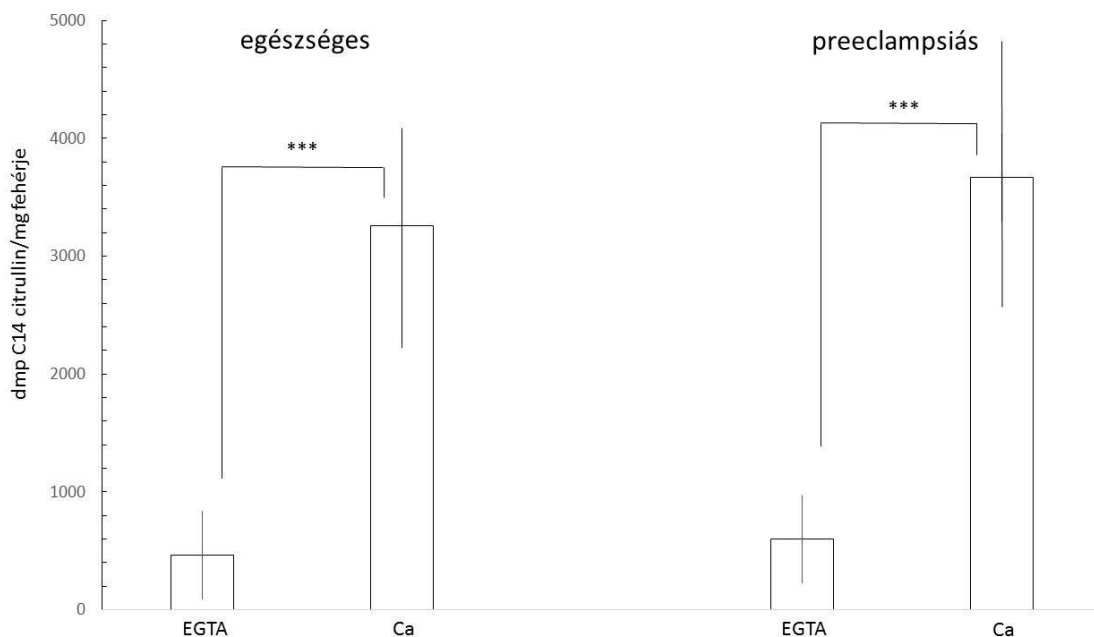
n.s. nem szignifikáns, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

	<b>kontroll terhesség n=6</b>	<b>preeclampsias terhesség n=6</b>
<b>anya kora (év)</b>	29,0±3,3	31,2±2,3 n.s.
<b>szülés (hét)</b>	39,8±0,4	33,5±3,0 ***
<b>systolés vérnyomás (Hgmm)</b>	109,2±8,6	163,3±19,7 **
<b>diastolés vérnyomás (Hgmm)</b>	74,0±7,9	103,3±8,2 ***
<b>proteinuria</b>	0	++
<b>születési súly (g)</b>	3435±149	1993±784 **

Az anyák kora nem tért el szignifikánsan a kontroll (29,3±3,3 év) és a beteg (31,2±2,3 év) csoportban. A preeclampsia definíciójának megfelelően a preeclampsziás csoport systolés és diastolés vérnyomása (163,3±19,7 vs. 109,2±8,6 és 103,3±8,2 vs. 74,0±7,9 Hgmm) emelkedett, és proteinuria is csak ebben a csoportban volt jelen. A beteg csoportban a terhesség befejeződése (33,5±3,0 hét) szignifikánsan ( $p<0,001$ ) korábban történt a kontroll csoporttal (39,8±0,4 hét) összehasonlítva. Ennek megfelelően az újszülöttek születési súlya is szignifikánsan alacsonyabb volt a preeclampsziás csoportban (1993±784 gramm) a kontrollhoz képest (3435±149 gramm). Intrauterin növekedési retardáció (IUGR) egyik csoportban (kontroll és preeclampsziás) sem fordult elő.

## **4.2. A placenta mikroszóma NOS aktivitásának vizsgálata**

A humán placentában a három NOS izoenzimből (eNOS, nNOS, iNOS) az eNOS és iNOS expresszió és aktivitás figyelhető meg (Smith-Jackson és mtsai 2013, Kukor és Tóth 1994). Az iNOS aktivitása hozzáadott  $\text{Ca}^{2+}$  nélkül,  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor (1 mM EGTA) mellett is maximális, arginin, NADPH és  $\text{BH}_4$  mellett. Az eNOS  $\text{Ca}^{2+}$  dependens, így aktivitása az arginin, NADPH,  $\text{BH}_4$  mellett 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadásával határozható meg. A Ca-dependens (eNOS) aktivitás az 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  mellett mérhető NOS aktivitás és 1 mM EGTA mellett mérhető NOS aktivitás különbségéből számítható. A NOS aktivitás nagy része (kb. 85 %) Ca-dependens eNOS aktivitás (12. ábra), ezért a placenta NOS aktivitását ez az izoforma határozza meg.



## 12. ábra

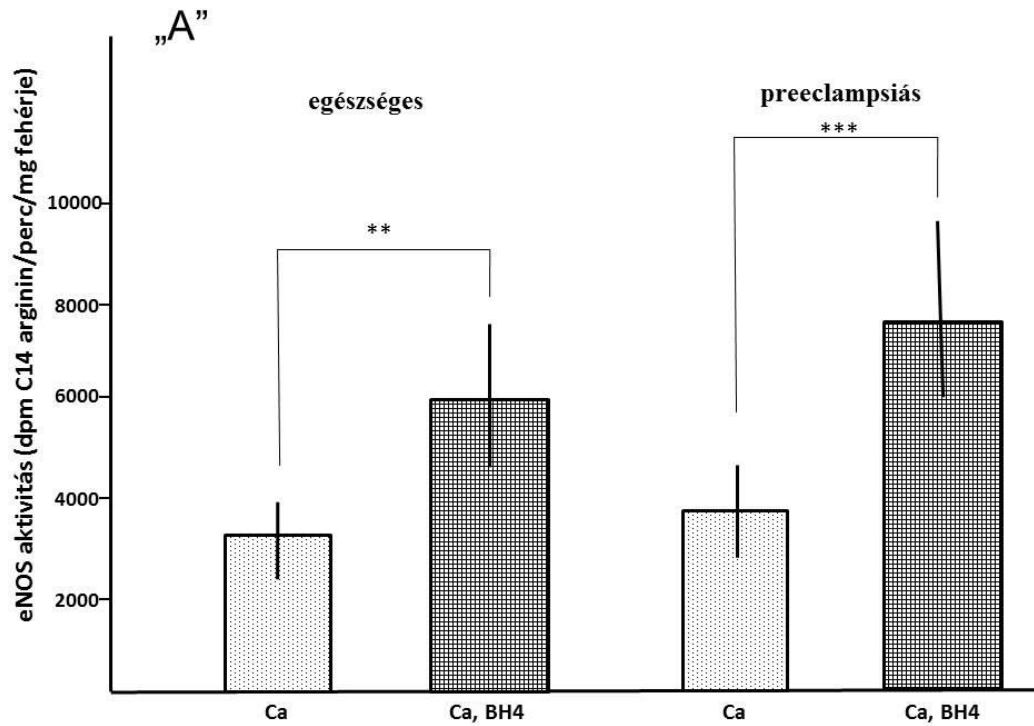
### *Egészséges és preeclampsias placenták iNOS és NOS specifikus aktivitása*

Az iNOS aktivitás meghatározása 1 mM EGTA (EGTA), a NOS aktivitások meghatározása 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Ca) mellett történt egészséges kontroll ( $n=6\pm\text{SD}$ ) és preeclampsias ( $n=6\pm\text{SD}$ ) minták felhasználásával.

Az iNOS aktivitását az expressziója határozza meg. Az eNOS aktivitása az expresszió mellett függ az aktuális  $\text{Ca}^{2+}$  és BH4 szinttől, foszforilációs állapottól, protein-protein kölcsönhatásoktól is. A preeclampsiasra jellemző gyulladós állapot miatt felmerült, hogy preeclampsiasban indukálódik az iNOS. Pár éve kimutatták, hogy az iNOS indukció mellett jelentősen emelkedik az eNOS mRNS szintje is (Hentschke és mtsai 2013, Henderson és mtsai 2014), emiatt preeclampsias állapotban is az eNOS határozza meg a placenta NO szintézisét. Az expressziós szintek növekedését kompenzatórikus válaszként értelmezik, mert a NO termelés az emelkedett expressziós szintje ellenére elégtelen preeclampsiasban (Osol és mtsai 2017). Ezt erősíti az is, hogy az eNOS inhibitor caveolin-1 mRNS szint csökkenését figyelték meg preeclampsias

placentákban (Espinoza és mtsai 2019). Az eNOS aktivitását 50  $\mu$ M BH4 2,0-2,5-szeresére növelte a kontroll és a preeclampsias mintákban is a 20 nM BH4 mellett mért alapaktivitáshoz képest (13. A. ábra). A maximális eNOS aktivitást 10  $\mu$ M pravastatin tovább növelte az egészséges ( $28 \pm 12$  %,  $p < 0,05$ ) és preeclampsias ( $32 \pm 10$  %,  $p < 0,05$ ) mintákban is (13. B. ábra). A pravastatin hatása az egészséges és preeclampsias mintákban hasonlóan bizonyult ( $p > 0,05$ ), (10. B. ábra), pravastatinnal a placenta mikroszóma aktivitását kb. 30 %-kal lehet növelni. Megfigyelhető, hogy 50  $\mu$ M BH4 jelenlétében a pravastatin hatás kifejezettebb, mint 20 nM BH4 mellett. Ez a hatás a kontroll és a beteg csoportban is jelentkezett, de egyiknél sem volt szignifikáns. Ennek a minimális hatásnak a magyarázata lehet a BH4 oxidációja. Az inkubáció alatt a 20 nM BH4 egy része oxidálódhat, így a NOS aktivitása csökken, mert a kiindulási BH4 koncentráció a  $K_M$  érték (100 nM) alatt van. Az 50  $\mu$ M BH4 koncentráció a  $K_M$  érték 500-szorosa, így a mérés ideje alatt a NOS aktivitás maximális maradhat abban az esetben is, ha a BH4 oxidálódik. A pravastatin hatása koncentrációfüggő (ábra nem mutatja). A maximális pravastatin hatás 10  $\mu$ M koncentráció mellett mérhető 1 mM  $Ca^{2+}$  és 50  $\mu$ M BH4 mellett. Ez a már említett kb. 30 %-os enzimaktivitás növekedés. 100 és 500  $\mu$ M pravastatinnak már gátló hatása van. Az eNOS-t gátló kaveolin 1 mM  $Ca^{2+}$  mellett disszociál az eNOS-ról, ezért a pravastatin hatását a kaveolintól függetlennek tételezhetjük fel.

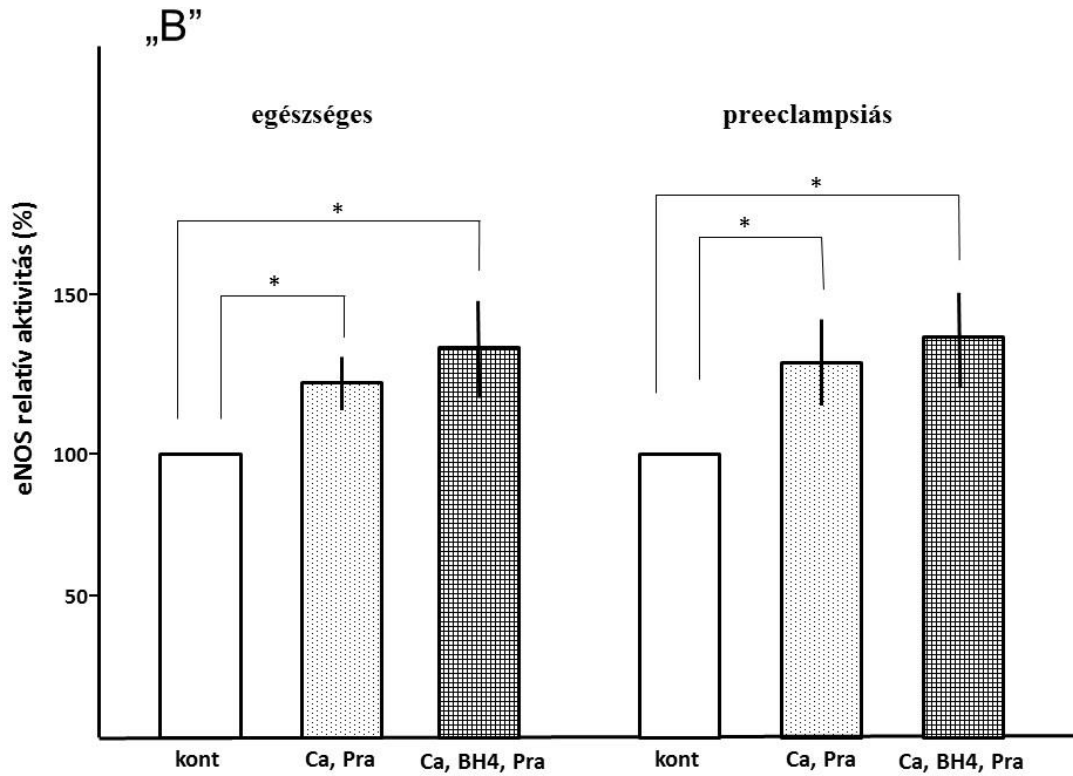




### 13. A. ábra

#### *BH4 hatása placenta mikroszóma eNOS aktivitására*

Az eNOS aktivitása 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (**Ca**) és 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 50  $\mu\text{M}$  BH4 (**Ca, BH4**) mellett egészséges kontroll ( $n=6\pm\text{SD}$ ) és preeclampsziás ( $n=6\pm\text{SD}$ ) mintákban.



### 13. B. ábra

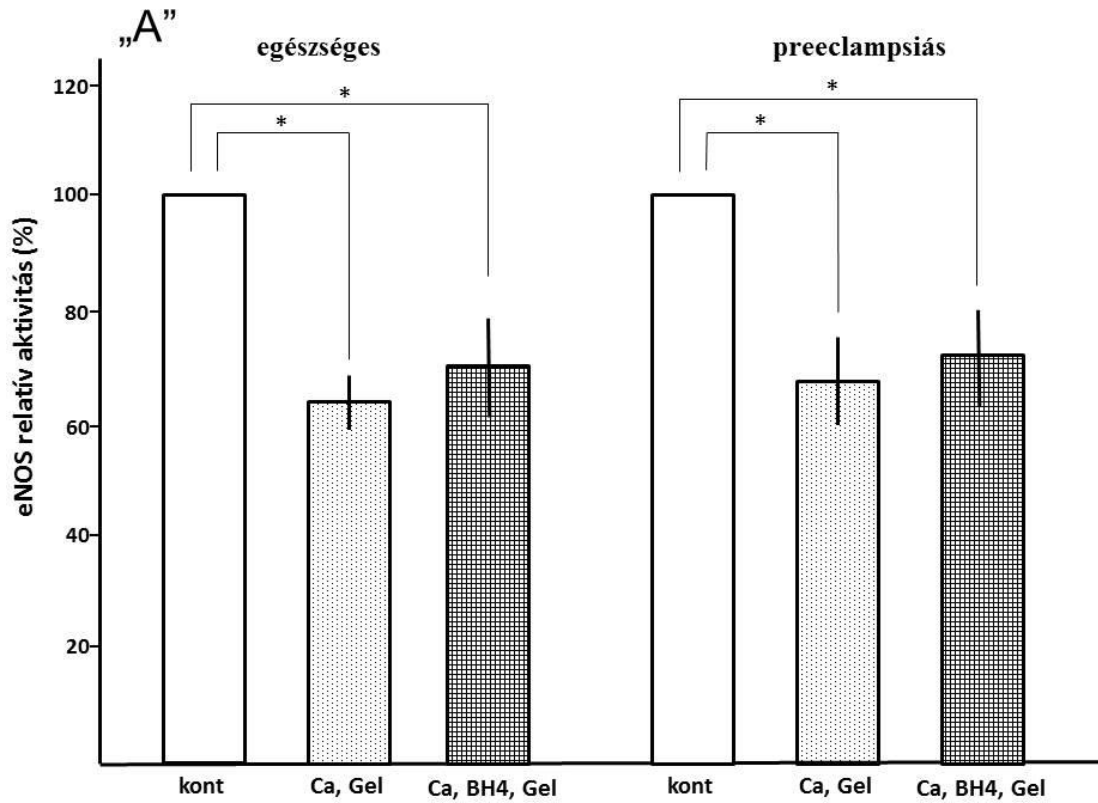
#### *Pravastatin hatása mikroszomális eNOS aktivitásra*

Az aktivitásokat a pravastatin nélküli aktivitásra (13. A. ábra) vonatkoztatva (100 %) adtuk meg. Az eNOS aktivitást 10  $\mu$ M pravastatin 30-40 %-kal növelte mind 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , mind 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 50  $\mu$ M BH4 mellett ( $p < 0,05$ ) egészséges kontroll ( $n=6 \pm \text{SD}$ ) és preeclampsias ( $n=6 \pm \text{SD}$ ) mintákban is.

### 4.3. Pravastatin hatás és Hsp90

Az eNOS aktivitását a Hsp90 hőszokk fehérje növeli. A Hsp90 a hatását több úton fejti ki. Közvetett Hsp90 hatás az, hogy elősegíti az eNOS aktiváló foszforilációját (Su 2014). Közvetett hatásnak felel meg az is, hogy a Hsp90 növeli az eNOS proteáz rezisztenciáját, fokozva a stabilitását (Averna és mtsai 2008). A Hsp90 közvetlen hatással is rendelkezik, az eNOS affinitását növeli a NADPH-hoz, argininhez és kalmodulinhoz, ami az enzimaktivitás növekedéséhez vezethet (Chen és mtsai 2017). A Hsp90 geldanamycinnel gátolható. Az eNOS aktivitást 100 nM geldanamycin gátolja a kontroll és a preeclampsziás mintákban egyaránt (14. A. ábra). Az alapaktivitást néhány százalékkal nagyobb mértékben gátolja a geldanamycin, mint az 50  $\mu$ M BH4 mellett vizsgált mintákét (a különbség nem szignifikáns, de megfigyelhető mind a kontroll, mind a preeclampsziás csoportban). A Hsp90 BH4 affinitást növelő hatása alacsony, 20 nM BH4 koncentráció mellett nagyobb mértékűnek kell lennie, mint a  $K_M$  értéket több százszorosán meghaladó, 50  $\mu$ M BH4 koncentráció mellett, mert ekkora BH4 koncentráció mellett az enzim telített BH4-re. A pravastatin Hsp90-től független hatását 100 nM geldanamycin jelenlétében vizsgáltuk. Az eNOS aktivitása 10  $\mu$ M pravastatin hatására geldanamycin jelenlétében is nő (14. B. ábra). Ha a geldanamycin jelenlétében mért eNOS aktivitás a viszonyítási alap (100 %), akkor az egészséges placenta mikroszóma átlagos eNOS aktivitását 10  $\mu$ M pravastatin 30 %-kal emelte 1 mM  $Ca^{2+}$ , 20 nM BH4 (alapaktivitás); 25 %-kal 1 mM  $Ca^{2+}$ , 50  $\mu$ M BH4 mellett ( $p < 0,05$ ). Preeclampsziás mintákat vizsgálva hasonló pravastatin hatást tapasztalunk. A NOS alapaktivitását 37 %-kal; a BH4-stimulált aktivitást 28 %-kal emelte.

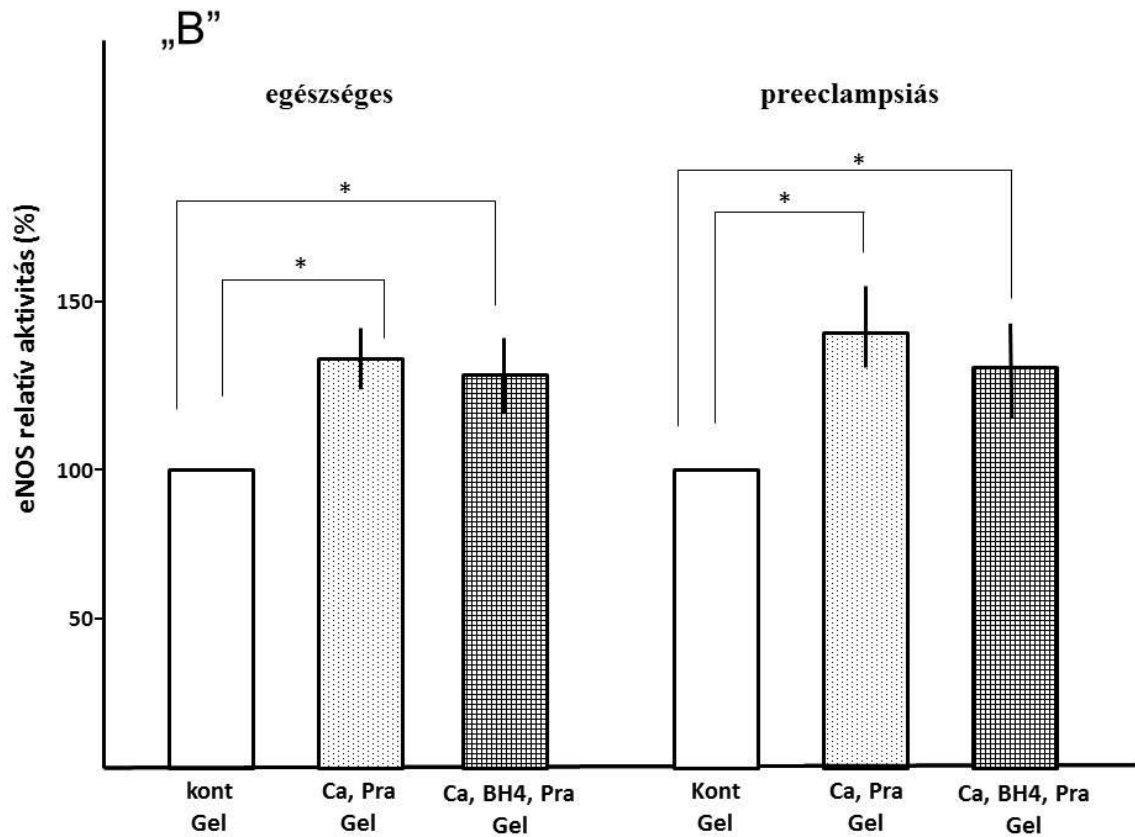
Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a pravastatin hatás a Hsp90 hatásától független lehet.



#### 14. A. ábra

##### *Geldanamycin hatása placenta mikroszóma eNOS relatív aktivitására*

100 %-os aktivitásnak a geldanamycin nélkül mért enzimaktivitás felel meg. Az eNOS aktivitást 100 nM geldanamycin átlagosan 25-35 %-kal csökkentette egészséges ( $n=4 \pm SD$ ) és preeclampsias ( $n=4 \pm SD$ ) mintákban is.



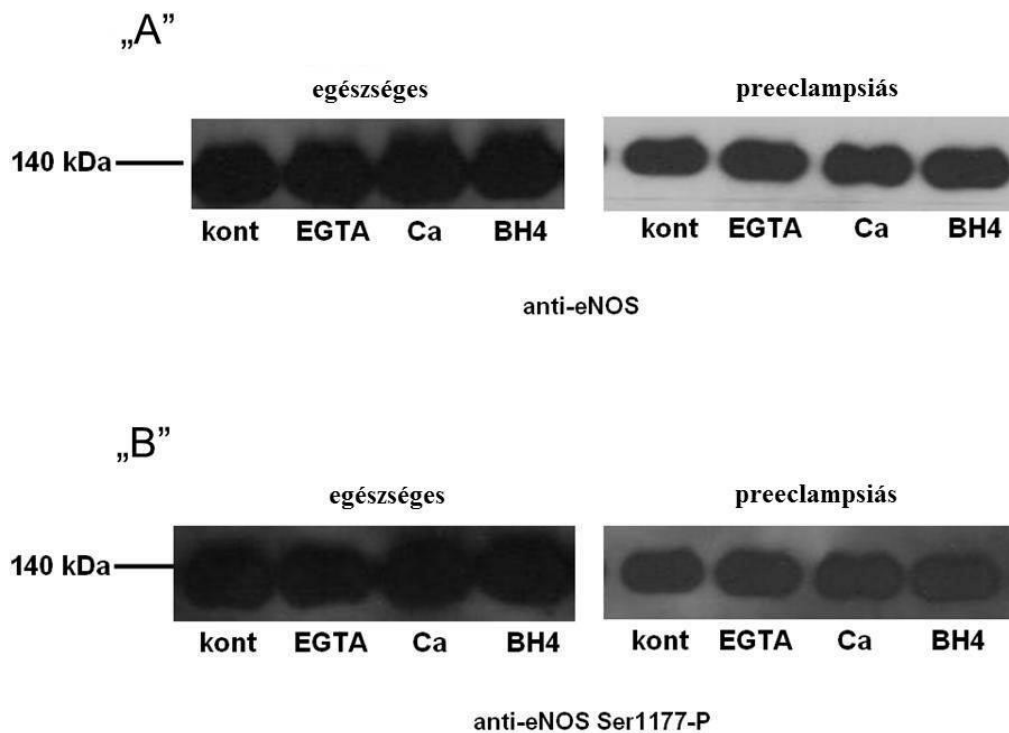
14. B. ábra

*Pravastatin hatása geldanamycinnel kezelt placenta mikroszóma eNOS aktivitására*

A 100 nM geldanamycin mellett mért eNOS aktivitás 100 %. Egészséges placenta mikroszóma (n=4±SD) átlagos eNOS aktivitását 10 μM pravastatin 30 %-kal emelte 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 20 nM BH4 mellett; 25 %-kal 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 50 μM BH4 mellett (p<0,05). Preeclampsziás placenta mikroszóma (n=4±SD) átlagos eNOS aktivitását 10 μM pravastatin 37 %-kal emelte 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 20 nM BH4 mellett; 28 %-kal 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 50 μM BH4 mellett (p<0,05).

#### 4.4. A pravastatin hatása az eNOS Ser1177 foszforilációjára

A mintákat az eNOS aktivitás mérésénél használt azonos körülmények között inkubáltuk C14 arginin használata nélkül. A minták eNOS Ser1177 foszforiláltságát Western blot analízissel vizsgáltuk. Mérésünk szerint a mérési körülmények között 10 perces inkubálás alatt 10  $\mu$ M pravastatin nem változtatta meg az eNOS Ser1177 foszforiláltsági állapotát (15. ábra).



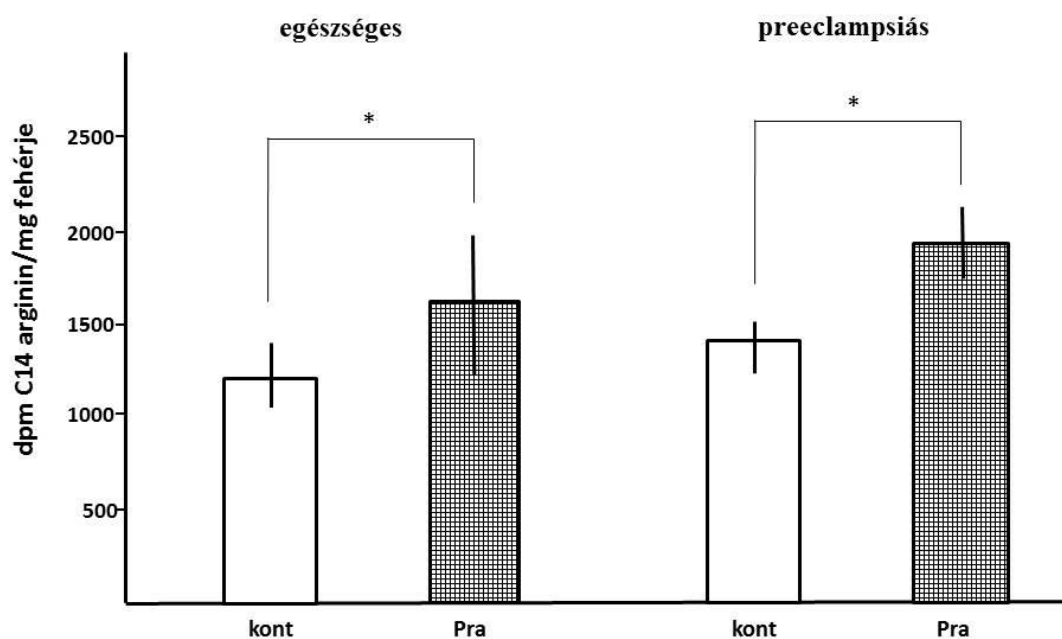
#### 15. ábra

##### *Pravastatin hatása eNOS Ser1177 foszforilációjára placenta mikroszómában*

A kontroll mintát pravastatin nélkül, a többi 10  $\mu$ M pravastatinnal 10 percig 37 °C-on inkubáltuk 1 mM EGTA (EGTA); 1 mM Ca<sup>2+</sup> (Ca); és 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 50  $\mu$ M BH4 (BH4) mellett. Az „A” ábrán a totál eNOS, a „B” ábrán a Ser1177-en foszforilált eNOS antitesttel végzett western blot reprezentatív eredménye látható. A pravastatin nem eredményezett változást az eNOS Ser1177 foszforiláltságán.

## 4.5. A pravastatin hatása a placenta mikroszóma arginin felvételére

Az eNOS a sejtmembránban kapcsolatban van pozitív töltésű aminosav transzporterekkel ( $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $B^{0+}$ ) is (Grillo és mtsai 2008). Így az eNOS arginin ellátottsága az extracelluláris térből, a vérből is biztosított. Preeclampsziás esetekben megfigyelték a vérszérum arginin szintjének csökkenését, ami hozzájárulhat a vérnyomás emelkedéséhez. Az eNOS elégtelen arginin ellátottságát súlyosbíthatja a preeclampsziában megfigyelt emelkedett ADMA szint is. Az ADMA ugyanis nem csak a NOS kompetív inhibitora, hanem az aminosav transzporter kötőhelyéért az argininnel kompetál, gátolva az arginin felvételét is (Strobel és mtsai 2012). A placenta mikroszóma arginin felvétele az első percben az idővel lineárisan változik. Az arginin felvételt  $10 \mu\text{M}$  pravastatin egészséges ( $38 \pm 9 \%$ ,  $p < 0,05$ ) és preeclampsziás ( $34 \pm 11 \%$ ,  $p < 0,05$ ) placenta mikroszómákban is növelte. A hatás azonosnak bizonyult az egészséges és preeclampsziás mintákban (16. ábra).



16. ábra

### *Pravastatin hatása placenta mikroszóma arginin felvételére*

$10 \mu\text{M}$  pravastatin a mikroszóma arginin felvételét egészséges ( $n=3 \pm \text{SD}$ ) mintákban 32% -kal, preeclampsziás ( $n=3 \pm \text{SD}$ ) mintákban 38 %-kal emeli meg ( $p < 0,05$ ).

## 4.6. Preeclamsiás placenták BH4 rezisztenciájának vizsgálata

A placenták BH4 rezisztenciájának meghatározásához 9 egészséges és 9 preeclamsiás terhességből származó placenta eNOS aktivitását vizsgáltuk. A vizsgálatba bevont páciensek klinikai adatait a 2. táblázat tartalmazza.

### 2. táblázat

#### *BH4 rezisztencia vizsgálatban résztvevők klinikai adatai*

Az értékek átlagot  $\pm$  SD jelentenek.

n.s. nem szignifikáns, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

	<b>kontroll terhesség n=9</b>	<b>preeclamsiás terhesség n=9</b>
<b>anya kora (év)</b>	30,4 $\pm$ 3,9	31,8 $\pm$ 8,2 n.s.
<b>szülés (hét)</b>	39,8 $\pm$ 0,4	33,6 $\pm$ 2,6 **
<b>systolés vérnyomás (Hgmm)</b>	108,9 $\pm$ 7,8	163,3 $\pm$ 17,3 ***
<b>diastolés vérnyomás (Hgmm)</b>	74,6 $\pm$ 6,7	103,3 $\pm$ 7,1 ***
<b>proteinuria</b>	0	++ vagy > 300 mg/nap
<b>terhesség alatti súlygyarapodás (kg)</b>	12,0 $\pm$ 2,4	9,8 $\pm$ 7,9 n.s.
<b>születési súly (g)</b>	3449 $\pm$ 132	1983 $\pm$ 641 ***

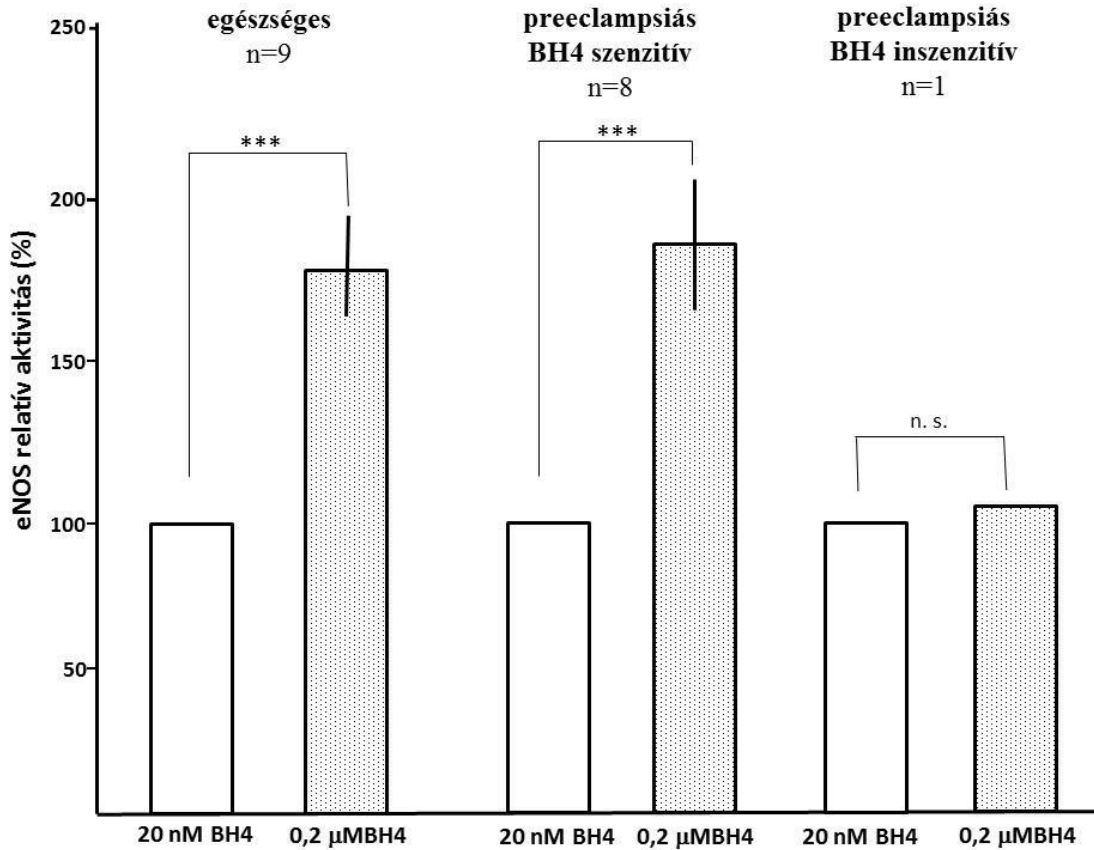
Ebbe a vizsgálatba 9 egészséges kontroll és 9 preeclamsiás résztvevőt vontunk be. Az anyák kora nem tért el szignifikánsan a kontroll (30,4 $\pm$ 3,9 év) és a preeclamsiás (31,8 $\pm$ 8,2 év) csoportban. A preeclamsiás csoport systolés és diastolés vérnyomása (163,3 $\pm$ 17,3 vs. 108,9 $\pm$ 7,8 és 103,3 $\pm$ 7,1 vs. 74,6 $\pm$ 6,7 Hgmm) szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) emelkedett, és proteinuria is csak ebben a csoportban volt jelen. A preeclamsiás csoportban a terhesség befejeződése (33,6 $\pm$ 2,6 hét) szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) korábban történt a kontroll csoporttal (39,8 $\pm$ 0,4 hét) összehasonlítva. A születési súly szignifikánsan alacsonyabb volt a preeclamsiás csoportban (1983 $\pm$ 641 gramm) a



kontrollhoz képest ( $3449 \pm 132$ ) gramm). A kontroll csoportba került várandósok terhesség alatti átlagos súlygyarapodása ( $12,0 \pm 2,4$  kg) nem tért el szignifikánsan a beteg csoporttól ( $9,8 \pm 7,9$  kg).

A BH4 rezisztencia vizsgálatához a 3.4. fejezetben ismertetett eNOS aktivitás mérési módszert használtuk.

A 9 preeclampsziás minta NOS aktivitásából egy volt BH4 rezisztens. A BH4 rezisztens páciens klinikai képe nem tért el a vizsgált preeclampsziás esetektől. Legmagasabb mért vérnyomása 160/110 Hgmm (többi preeclampsziásé 150-200/90-110 Hgmm) volt; vizelet fehérjetartalma ++; terhessége 31 hétig (többi preeclampsziásé 30-37 hétig) tartott, az újszülött méhen belüli növekedési elmaradásban (IUGR) szenvedett, súlya 1450 g (a többi patológiás eset között egy IUGR eset fordult elő, az újszülöttek születési súlya 1210-3360 g); a terhesség alatti súlygyarapodása 8 kg (a többi preeclampsziásé – 8-18 kg). Ennek a mintának fiziológiás,  $0,20 \mu\text{M}$  BH4 koncentráció nem növelte szignifikánsan a NOS aktivitását, míg az egészséges placenta mikroszómák aktivitását átlagosan 60 %-kal ( $p < 0,01$ ), a BH4 szenzitív preeclampsziás minták NOS aktivitását 67 %-kal ( $p < 0,01$ ) növelte a  $0,02 \mu\text{M}$  BH4 mellett mért alapaktivitáshoz képest (17. ábra).

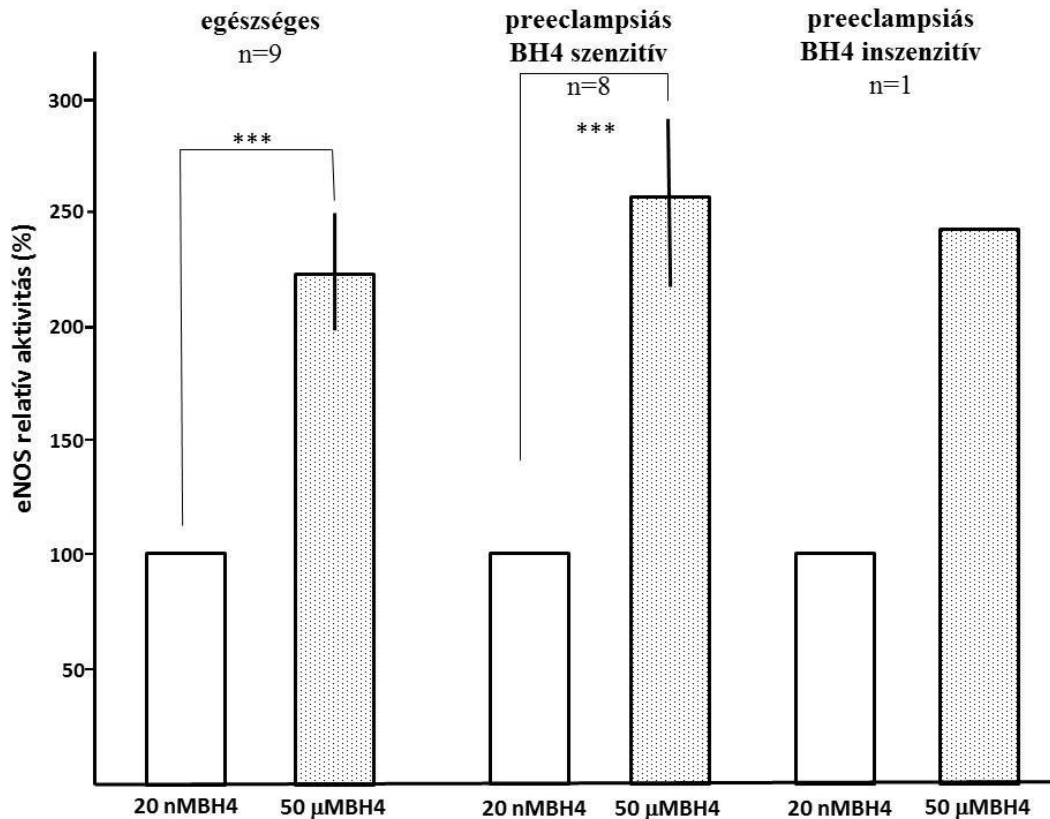


17. ábra

***Placenta mikroszómák relatív NOS aktivitása fiziológias BH4 koncentráció mellett***

A 100 %-os (alap) aktivitás 20 nM BH4 mellett mért enzimaktivitás (**20 nM BH4**). A fiziológias, 0,2 μM BH4 mellett mért aktivitások (**0,2 μM BH4**) az egészséges és a BH4 szenzitív mintáknál átlag±SD értéket jelentenek. \*\*\*= p<0,001

50  $\mu\text{M}$  BH4 mindhárom csoport (egészséges, BH4 szenzitív és BH4 inszenzitív preeclamsziás) NOS aktivitását több, mint kétszeresre növelte (18. ábra).

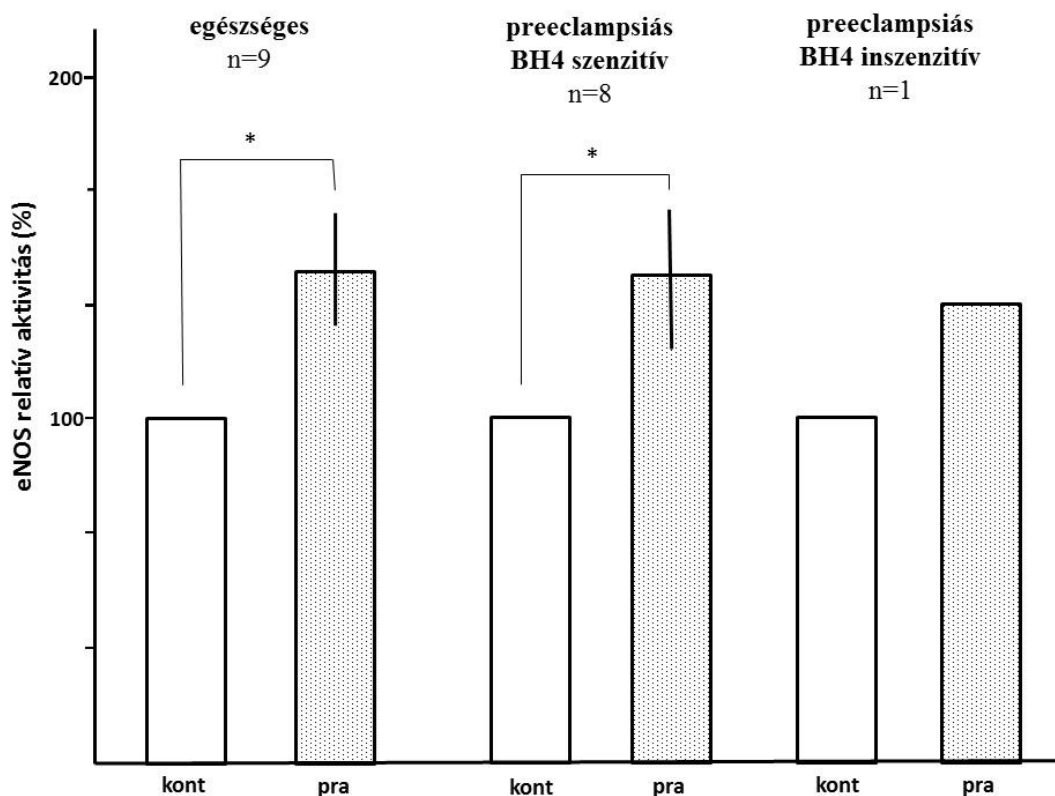


18. ábra

***Placenta mikroszómák relatív NOS aktivitása 50  $\mu\text{M}$  BH4 koncentráció mellett***

A 100 %-os (alap) aktivitás 0,020  $\mu\text{M}$  BH4 mellett mért enzimaktivitás (20 nM BH4). Az 50  $\mu\text{M}$  BH4 mellett mért aktivitások (50  $\mu\text{M}$  BH4) az egészséges és a BH4 szenzitív mintáknál átlag $\pm$ SD értéket jelentenek. \*\*\*= p<0,001

10  $\mu\text{M}$  pravastatin 32-38 %-kal növelte a NOS aktivitását mind az egészséges, mind a BH4 szenzitív és BH4 inszenzitív mintákban. A hatás hasonló volt mindhárom BH4 koncentráció mellett, a 19. ábra a fiziológiás, 0,20  $\mu\text{M}$  BH4 koncentrációnál mért pravastatin hatást mutatja.

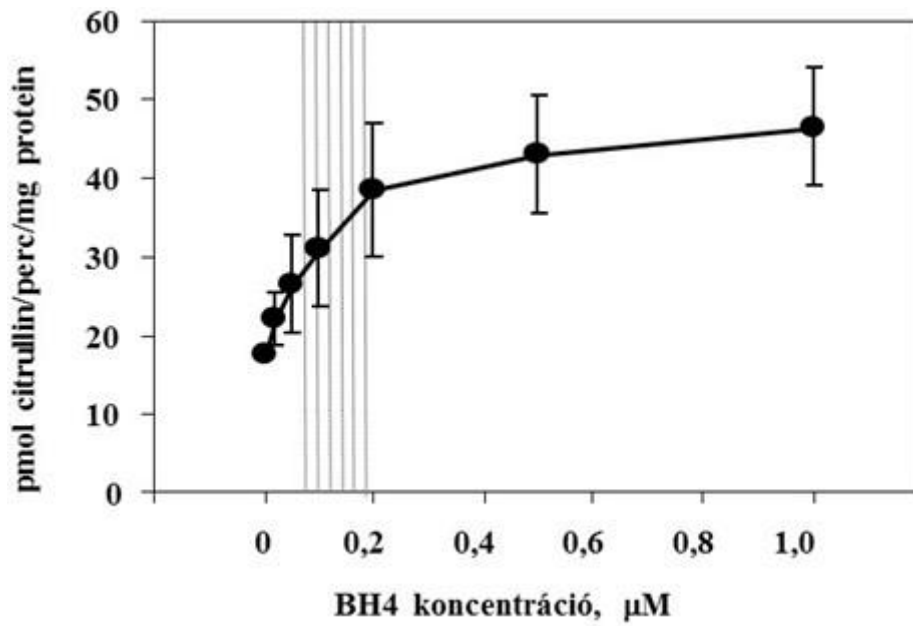


19. ábra

#### *Pravastatin hatása placenta mikroszóma relatív NOS aktivitására*

A NOS aktivitás minden pontban fiziológias, 0,2  $\mu\text{M}$  BH4 mellett mérve. A 100 %-os (**kont**) aktivitás pravastatin nélkül, 0,2  $\mu\text{M}$  BH4 jelenlétében mért enzimaktivitás. A 10  $\mu\text{M}$  pravastatin (**pra**) mellett mért aktivitások az egészséges és a BH4 szenzitív mintáknál  $\text{átlag} \pm \text{SD}$  értéket jelentenek. \* =  $p < 0,05$

Vizsgált esetünkben a BH4 inszenzitív placentának van NOS alapaktivitása, az enzim tehát képes megkötni a BH4-t. Az alapaktivitás nem emelhető fiziológias koncentrációjú (60-180 nM) BH4-nel, az egészséges placentákban mért  $K_M$  értéknél (100 nM) jóval magasabb, 50  $\mu\text{M}$  BH4 viszont megemeli. Ez arra utal, hogy az enzim BH4 affinitása csökkent ebben az esetben. A pravastatin viszonylag enyhe (34 %-os) NOS aktivitást növelő hatása elegendő ahhoz, hogy az enzim aktivitását fiziológias tartományba emelje (20. ábra).



20. ábra

*Egészséges placenta mikroszóma NOS aktivitásának BH4 koncentráció függése*

A vonalkézással jelölt rész az egészséges primordiális és érett placenták átlagos BH4 koncentrációját jelzi.

n=9±SD

## 5. Megbeszélés

A pravastatin a humán placenta eNOS aktivitását stimulálja. Az adatok azt mutatják, hogy a pravastatinnak gyors és lassú hatása egyaránt van (Kaesemeyer és mtsai 1999, Datar és mtsai 2010, Fox és mtsai 2011). Az eNOS expresszióját növeli 100 nM pravastatin humán köldökszinór véna endotél sejt kultúrában (Ota és mtsai 2010). Az expressziós szint növekedését megfigyelték 200 nM pravastatin mellett humán placenta tenyészetben is (Balan és mtsai 2017). Megfigyelte több munkacsoport is az aktiváló hatású eNOS Ser1177 foszforilációt pravastatin hatására (Ohkawara és mtsai 2010, Izumi és mtsai 2009). Pravastatin hatására bekövetkező eNOS Ser1177 foszforilációt nem minden esetben sikerült kimutatni (Bellamy és mtsai 2017), sőt, II-es típusú diabeteses modell patkányokban (OLETF) a pravastatinnal 8 hétig kezelt állatokban az aorta eNOS Ser1177 foszforiláció csökkent. Sajnos ebben a kísérletben az enzimaktivitást nem mérték (Kikuchi és mtsai 2014). Az enzimaktivitás és Ser1177-es foszforiláció együttes mérése azt mutatja, hogy az eNOS aktivitás növelése független is lehet a foszforilációtól.

Mi a kísérleti körülményeket úgy választottuk meg, hogy a pravastatin hosszú távú hatásai (expresszió, foszforiláltság) ne érvényülhessenek. Ebben az esetben a pravastatin-protein; protein-protein kölcsönhatások szerepe vizsgálható. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a pravastatin hatása az eNOS aktivitására a kaveolintól független. Az eNOS aktivitás szabályozásában részt vevő másik fehérje a Hsp90, ami kötődve az eNOS-hoz emeli az aktivitását. A Hsp90 inhibitor geldanamycin a Hsp90 ATP kötőhelyével lép interakcióba, így az ADP-ATP cserét gátolva megakadályozza a Hsp90 hatását (Chatterjee és Catravas 2008). Eredményeink azt mutatják, hogy a pravastatin hatás a Hsp90-től függetlenül megy végbe.

Vizsgálataink új eredménye az, hogy a pravastatin növeli a placenta mikroszóma arginin felvételét. Ez a hatás kiegészíthet az irodalomból ismert statin hatásokat is. Böger és mtsai simvastatinnal végeztek vizsgálatokat egészséges önkéntesek endothel-dependens brachiális artéria vasodilatációjára. Az arginin és simvastatin együttes adása hatásosabbnak bizonyult, mint a csak arginin vagy csak simvastatin kezelés magas szérum ADMA szintnél. A simvastatinnak egyedül nem volt szignifikáns hatása az

endotél-dependens vazodilatációra. A simvastatin, arginin, valamint a kettő együttes adása szignifikánsan emelte az endotél-dependens vazodilatációt az alacsony ADMA szérumszintű csoportban is (Böger és mtsai 2007). Az ADMA kompetitív inhibitora az eNOS-nak, így a simvastatin hatása magyarázható az általunk megfigyelt arginin felvétel növelésével is.

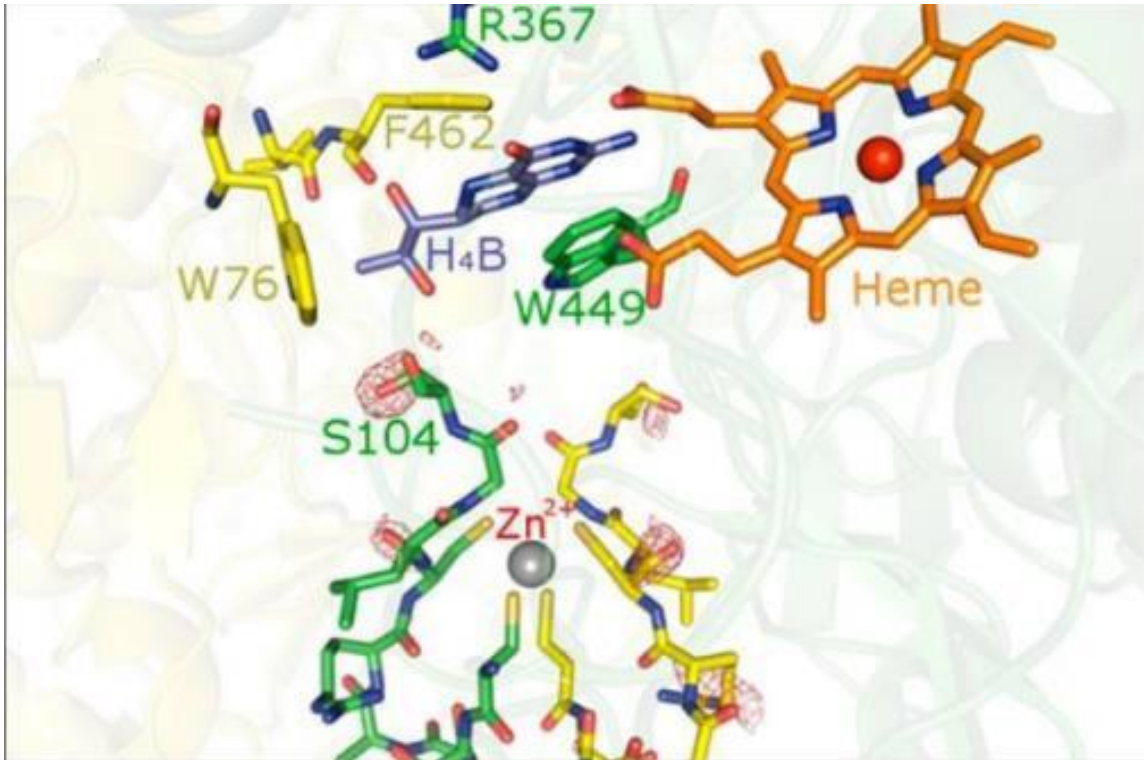
A pravastatin hatása az arginin transzportra magyarázhat más megfigyeléseket is. Farmakológiásan magas (a fiziológiásnál legalább ötször nagyobb) arginin koncentrációnál nem figyeltek meg pravastatin hatást a NO termelésre (Balan és mtsai 2017). Alacsony szérumszintű arginin koncentrációnál (ca. 50  $\mu\text{M}$ ) (Kim és mtsai 2006) vagy redukált arginin transzportnál (Pimentel és mtsai 2013) a pravastatin növelheti az arginin felvételt, így növelve az eNOS aktivitását. Preeclampsziában sérül a NO termelése (Dymara-Konopka és mtsai 2019, Phipps és mtsai 2019). Azt is megfigyelték, hogy preeclampsziás terhességben csökken a szérumszintű arginin koncentrációja (Maruta és mtsai 2017, Terán és mtsai 2012, Noris és mtsai 2004), nőhet az ADMA szérumszintje (Zheng és mtsai 2016, Gumus és mtsai 2016, Bian és mtsai 2015, Garg és mtsai 2018, Maruta és mtsai 2017). Fenti eredményeket figyelembe véve megfontolandónak tűnik indokolt esetekben a pravastatin és az arginin kezelés preeclampsziában.

A humán placenta BH4 koncentrációja az eNOS  $K_M$  értékének (110 nM) tartományában található. Az első trimeszterben a placenta átlagos BH4 koncentrációja ennek körülbelül duplája (200 nM), ami a terhesség végére harmadára (60 nM) csökken. A NOS aktivitása a placentában tehát jelentősen függ a BH4 koncentrációtól. Az eNOS dimer szerkezetű, két BH4-t köthet antikooperatív módon (Tóth 2002). Az első BH4 kötése nagy affinitással történik, fiziológiás BH4 koncentrációk telítik, ez eredményezi az eNOS alapaktivitását. A második BH4-t kis affinitással ( $K_M=0,11 \mu\text{M}$ ) köti az eNOS, így a terhesség végére a placenta NOS aktivitása a maximális enzimaktivitáshoz képest csökken. A korábbi vizsgálatok során 10 preeclampsziás placenta homogenizátumból 7 BH4 inszenzitívnek bizonyult (Kukor és mtsai 1996). Későbbi tanulmányok során kiderült, hogy a BH4 igen érzékeny a spontán oxidációra. Emiatt a placenta eNOS BH4 szenzitivitását kimutató metodikán változtattunk. A placenta homogenizátumot mikroszómára cseréltük, ezzel a homogenizátumban lévő reaktív oxigén származékokat eltávolítottuk. A módosított módszerrel mérve a BH4 inszenzitív placenta aránya

jelentősen csökkent, 9 mintából egy mutatott inszenzitivitást. Ez arra utal, hogy preeclampszában előfordulhat BH4 inszenzitivitás, de a preeclampsziás eseteknek csak kis részét érintheti. Az általunk vizsgált kis esetszám miatt nem határozható meg, hogy a preeclampszában szenvedők hány százalékát érintheti a NOS BH4 érzéketlensége.

A BH4 inszenzitivitás többféleképpen is magyarázható. Egyrészt a preeclampsziára jellemző oxidatív stressz eliminálhatja a BH4-t, csökkentheti a NO termelést (Hesthammer és mtsai 2019), látszólagos inszenzitivitást okozva. Ezt alátámasztja, hogy placenta homogenizátumot vizsgálva az oxidatív stressz alatt álló preeclampsziás minták jelentős része BH4 inszenzitivnek bizonyult, míg az egészséges minták BH4 szenzitivéek voltak, ezzel ellentétben mikroszómát használva a preeclampsziás 9 minta közül egy mutatott inszenzitivitást. A humán placenta mikroszóma NADPH jelenlétében termelhet reaktív oxigén gyököket (Milczarek és mtsai 2007). A NOS működése NADPH igényes, ezért elképzelhető, hogy a megfigyelt esetünkben a BH4 inszenzitivitást a túltermelt oxidatív gyökök okozták. Az oxidatív stressz okozta BH4 szint csökkenés ellen antioxidáns kezelés segíthetne a betegeken. Egy korábbi vizsgálat adatai alapján az aszkorbinsav védi a BH4-t az oxidációtól (Tóth és mtsai 2002). Több munkacsoport is vizsgálta az antioxidánsok (többek között C- és E-vitamin) preventív szerepét preeclampszia ellen, de egy friss metaanalízis nem támasztotta alá a felvetést (Conde-Agudelo és mtsai 2011). A BH4 inszenzitivitás másik oka lehet a NOS BH4 affinitásának csökkenése akár fehérjeszerkezetet érintő mutáció, akár poszttranszlációs módosítás, akár környezeti tényező miatt. Környezeti tényező lehet a terhesség alatti cinkellátottság. Az eNOS BH4 kötő doménje közel található a  $Zn^{2+}$  kötő doménjéhez, és a  $Zn^{2+}$  segíti az enzim BH4 kötését (21. ábra).





### 21. ábra

#### *Szarvasmarha eNOS tetrahidrobiopterin (H4B), Zn<sup>2+</sup> (Zn<sup>2+</sup>) és hem (Heme) kötése*

A (Chreifi és mtsai 2014) hivatkozás 4. A. ábrája alapján

A cinkhiány így csökkentheti az enzim affinitását a BH<sub>4</sub>-hez (Chreifi és mtsai 2014). A cinkpótlás lehetséges jótékony hatását alátámaszthatja, hogy csökkent Zn<sup>2+</sup> tartalmat figyelt meg egy török munkacsoport preeclampsziás nők placentájában (Acigkoz és mtsai 2006). Gyakorlati szempontból a kivitelezhetőbb szérumban cink koncentráció mérés hasznosabb lenne, de az eddigi mérések eredményei ellentmondásosak. Pár éve elvégzett metaanalízisek szerint preeclampsziás terhes nők szérumban cink szintje alacsonyabb, mint az egészséges terhes nőké (Ma és mtsai 2015, ZHu és mtsai 2016). A cink antioxidáns hatású, több mint 100 enzim működéséhez szükséges (Hovdenak és Haram 2012), emiatt nehéz kielégítő pontossággal magyarázni a cink kezelések hatásmechanizmusát, és azt, hogy a cinkpótlás előnyös hatásaihoz milyen mértékben járulhat hozzá a NOS. Az értelmezést az is nehezíti, hogy a cinket étrend kiegészítőként

nem önállóan, hanem egyéb ásványi anyagokkal, vitaminokkal együtt alkalmazzák. A cink mellett adott anyagok szintén befolyásolhatják a terhesség kimenetelét, ráadásul az orálisan alkalmazott cink felszívódását, hasznosulását is módosítják (Azami és mtsai 2017, Sorouri és mtsai 2017, Rumiris és mtsai 2017).

A statinok lehetséges kedvező hatását preeclampsziában állatkísérletekben és humán vizsgálatokban is nyomon követték. Patkányokban sVEGFR overexpresszióval és CBA/J x DBA/2 egerekben kiváltott kísérletes preeclampsziát sikeresen kezeltek pravastatinnal (Kumasawa és mtsai 2011). Preeclampsziára nagy kockázatú (pl. magas testtömeg index, dislipidaemia, hypertónia) terhes nőket pravastatinnal kezelve csökkent a preeclampsziás esetek aránya a kontroll csoporthoz képest (Costantine és mtsai 2016). A statinok hatásmechanizmusa preeclampsziás esetekben jelenleg intenzíven kutatott terület. Régóta ismert, hogy preeclampsziában elégtelen a NO termelés, ami a vérnyomás emelkedésén túl a placenta elégtelen vaszkularizációjához, tápanyagellátásához is hozzájárulhat. Humán vizsgálatokban igazolták, hogy a pravastatin növelheti umbilikális véna endotél sejtekben a NOS expressziót, tehát az enzimaktivitás emelkedés viszonylag lassan, órák, napok alatt zajlódik le (Ota és mtsai 2010). Munkánkban kimutattuk, hogy a pravastatin gyorsan is képes expressziótól és foszforilációtól függetlenül a humán placenta NOS aktivitását növelni. A hatás azon alapszik, hogy a pravastatin növeli a NOS szubsztrátjának, az argininnak a felvételi sebességét, így az enzim arginin ellátottsága javul (Pánczél és mtsai 2019). Preeclampsziás terhességben megfigyelték, hogy csökkenhet a szérum arginin szintje, ami hozzájárulhat a NOS aktivitás csökkenéséhez és emelheti az oxidatív stresszt (Kim és mtsai 2006). A pravastatin arginin felvételt növelő hatása így csökkentheti a placenta arginin hiányát. Humán umbilikális véna endotél sejteket argininnal kezelve sikerült az oxidatív stresszt is mérsékelni (Acigkoz és mtsai 2006). Preeclampsziában fokozott oxidatív stressz figyelhető meg. Az oxidatív stressz endotél károsodást, gyulladásoz reakciót, vérnyomás emelkedést okozhat. A placenta oxidatív stresszét növelheti a szuperoxid a BH4 oxidációjával. Az oxidálódott BH4 az eNOS szétkapcsolását eredményezheti, aminek során elektron kerülhet a molekuláris oxigénre, de az arginin már nem oxidálódik, a reakció végén szuperoxid képződik (Aouache és mtsai 2018). Az élettani terhességekben a placenta trofoblasztsejtjei mélyen behatolnak a méh állományába és az arteria spiralisokat átalakítják (remodeling). A remodelinget is

károsíthatja az oxidatív stressz. Az ok-okozati viszonyok helyes értelmezése jelenleg részleteiben nem tisztázott. Fiziológiás terhességekben a citotrofoblaszt hypoxiás környezetben van, a hypoxia oxidatív stresszhez vezet, így a fokozott oxidatív stressz normálisnak tekinthető. Az abnormális remodeling elégtelen oxigénellátottságot eredményez, így a trofoblasztinvázió akadályoztatottsága is vezethet oxidatív stresszhez. A „kétlépcsős modell” szerint az abnormális implantáció, csökkent lepényi perfúzió – következtében (első lépcső) a keringésbe olyan faktorok kerülnek (sVEGFR, szolubilis endoglin), amelyek az anyai tünetek megjelenéséért (második lépcső) felelősek (Ahmed és mtsai 2017, Alasztics és mtsai 2012).

A placenta fiziológiás BH4 koncentrációja  $K_M$  körüli érték, a NOS nem éri el a maximális aktivitását. A pravastatin enyhe NOS aktivitást növelő hatása előnyös lehet, mert az aktivitás ilyen mértékű emelésével az fiziológiás tartományba kerül. Az emelkedett NO termelés csökkentheti a vérnyomást, enyhítheti a preeclampsziában is megfigyelt fokozott vaszkuláris rezisztenciát (Osol és mtsai 2019, Valent és mtsai 2011). Megfigyelésünk egy esetre korlátozódik, így további vizsgálatokra lesz szükség ahhoz, hogy az esetleges terápiás hasznot megállapíthassuk. A minimális esetszám ellenére biztató, hogy sikerült kimutatni, hogy pravastatinnal a placenta NOS aktivitása fiziológiás szintre emelhető.

A statin terápia jelenleg kontraindikált terhesség alatt. A vizsgálatok eddigi eredményei ellentmondásosak. Néhány, kis esetszámú humán vizsgálat történt eddig. Van, ami nem támasztotta alá a pravastatin feltételezett toxicitását, de volt olyan vizsgálat is, amelyben súlyos születési rendellenesség fordult elő a pravastatinnal kezelt csoportban. Korai, önkéntes bejelentéseken alapuló beszámolóban idegrendszeri károsodást, végtag rendellenességet írtak le. A vizsgált esetszám növelésével a súlyos rendellenességek előfordulásának aránya közeledett a statinnal kezelt és kezeletlen csoportok között. Enyhe következménynek számító korábbi terminust (38,4 vs. 39,3 hét;  $p < 0,04$ ) és kisebb születési súlyt (3,14 vs. 3,45;  $p = 0,01$ ) figyeltek meg nagyobb számú esetet vizsgálva. A súlyos események, mint halvaszületés (1-1 eset kezelt és kezeletlen csoportban), spontán abortusz (14 vs. 11) kis száma miatt statisztikai adatokkal alátámasztott következtetéseket még nem lehet levonni (Taguchi és mtsai

2008, Winterfeld és mtsai 2013). A sikeres vizsgálatok ellenére a kedvező eredményeket is fenntartással kell fogadni. A vizsgálatok között van olyan, aminek a minősége nem megfelelő. Volt olyan kis esetszámú felmérés (Ahmed és mtsai 2020), amelyben a véletlen beosztásnál a placeboval kezelt csoportnak a kezelés előtt is alacsonyabb volt az átlagos sVEGFR szérumszintje, mint a pravastatinnal kezelté. A vizsgálat végére mindkét csoportban csökkent a sVEGFR szintje. Kérdéses, hogy a hatásért a pravastatin milyen szinten felelős. Mint az előző példa is mutatja, nagy esetszámú felmérésre lenne szükség a terhesség alatt történő pravastatin kezelés kockázatainak megállapításához. Az eddigi eredmények szerint a pravastatin védhet preeclamsiával szemben, mérséklődhet az intrauterin növekedési retardáció mértéke is (Putra és mtsai 2008, Chimini és mtsai 2019, Redecha és mtsai 2009, Taguchi és mtsai 2008).

## 6. Következtetések

A preeclampsia kezelése jelenleg még nem megoldott. Az intenzív kutatómunkák egyik eredménye, hogy a pravastatin kezelés nagy kockázatú egyéneknél eredményes lehet. Ahhoz, hogy terápiás céllal használni lehessen, még számos vizsgálatot kell elvégezni, beleértve a hatásmechanizmust, a terápia előnyeinek és hátrányainak nagy betegszámon történő felmérését, a kezelés indikációját.

- A vizsgálat célja volt annak megállapítása, hogy a pravastatin milyen mechanizmussal tudja humán placenták NOS aktivitását gyorsan emelni. Ennek eredményeként a pravastatin eddig nem ismert tulajdonságát sikerült leírni, miszerint a pravastatin növelheti a placenta arginin felvételét.
- Kidolgozásra került egy új metodikai módszer preeclampsziás placenták NOS-ának tetrahidrobiopterin érzékenységének megállapításához.
- A vizsgált tetrahidrobiopterin rezisztens esetben megállapítást nyert, hogy a pravastatin alkalmas lehet a placenta NOS aktivitását fiziológiás mértékűre emelni.

A fenti eredmények alapkutatás szintűek, de megalapozhatják a későbbiekben a pravastatin terápiába bevonható személyek kiválasztását (BH4 rezisztens preeclampsziások), illetve a terápia pontosítását (pravastatin kezelés + arginin szupplementáció).

## 7. Összefoglalás

„**Bevezetés**” A terhességek 3-8 %-ában megjelenő preeclampsia kezelése jelenleg nem megoldott. A pravastatin potenciális preventív hatását megfigyelték preeclampsziában. A pravastatin egyik ismert pleiotróp hatása az, hogy emeli a NO-szintáz (NOS) aktivitását. Preeclampsziában elégtelen a NO szintézise, ami hozzájárulhat az emelkedett vérnyomáshoz, proteinuriához, a placenta kóros vaszkularizációjához is. Preeclampsziás placentában a csökkent NO szintézisnek az is oka lehet, hogy a NOS affinitása csökken a tetrahydrobioterinhez (BH4), ezzel BH4 rezisztencia alakul ki. „**Cél**” - A pravastatin gyors hatásmechanizmusának vizsgálata egészséges és preeclampsziás placenták NOS aktivitására - Új metodikai módszer kidolgozása preeclampsziás placenták NOS-ának BH4 érzékenységének megállapításához. - Annak vizsgálata, hogy a pravastatin alkalmas lehet-e BH4 rezisztens preeclampsziás placenták NOS aktivitását fiziológias mértékűre emelni. „**Metodika**” A NOS aktivitását placenta mikroszómában mértük C14 arginin szubsztráttal, változó BH4 szintek mellett. Az eNOS (Ser1177) foszforilációt Western blot analízissel vizsgáltuk. A placenta mikroszómális arginin felvételét rapid filtrációs metodikával határoztuk meg. „**Eredmények**” A pravastatin növeli az eNOS aktivitását mind egészséges, mind preeclampsziás mintákban (28% és 32%) 1 mM Ca<sup>2+</sup> mellett. A hatás független a NOS-t gátló caveolintól, a NOS-t aktiváló hősokk protein 90-től (hsp90) valamint a NOS foszforilációtól is. Pravastatin hatására a humán placenta mikroszóma arginin felvétele nő egészséges (38%) és preeclampsziás mintákban (34%) is. A BH4 rezisztencia vizsgálatához új metodikát alkalmaztunk, ennek lényege, hogy a BH4-t védtük az oxidációtól. Az új metodikával 9 preeclampsziás mintából egy volt BH4 rezisztens: fiziológias BH4 koncentráció nem növelte szignifikánsan a NOS aktivitását. 10 µM pravastatin 32-38 %-kal növelte a NOS aktivitását mindegyik BH4 koncentrációnál az egészséges, a BH4 szenzitív és a BH4 rezisztens preeclampsziás mintákban is, utóbbi esetben hasonló mértékben növelte, mint a placenta fiziológias BH4 koncentrációja a BH4 érzékeny NOS aktivitását. „**Megbeszélés**” A pravastatin pleiotróp hatásaihoz hozzájárulhat az eddig nem ismert arginin transzport fokozás. Eredményeink új mechanizmussal egészítik ki a pravastatin hatását a humán placenta NO termelésére. Vizsgálatunkkal tehát kimutattuk, hogy a pravastatin a tetrahydrobioterin rezisztens preeclampsziás placenta NOS aktivitását fiziológias szintre emeli.

## 8. Summary

**„Introduction"** Preeclampsia occurs in 3-8% of pregnancies. Its treatment is not yet resolved. Pravastatin has been shown to potentially prevent preeclampsia. As one of the known pleiotropic effects, pravastatin increases NO synthase (NOS) activity. In preeclampsia, NO synthesis is insufficient resulting in hypertension, proteinuria and abnormal vascularization of the placenta. Decreased affinity of NOS for tetrahydrobiopterin (BH4) (BH4 resistance) might be a reason of decreased NO synthesis in the preeclamptic placenta. **„Purpose"** - To investigate the rapid mechanism of action of pravastatin for NOS activity in healthy and preeclamptic placentas. - Development of a new methodological approach to determine BH4 sensitivity of preeclamptic placental NOS. Investigate the potential of pravastatin to raise the NOS activity of BH4 resistant preeclamptic placentas to physiological levels. **„Methods"** NO synthase activity in the placental microsome was measured using C14 arginine substrate at various BH4 levels. Phosphorylation of eNOS (Ser1177) was investigated by Western blot. Microsomal arginine uptake was measured by rapid filtration method. **"Results"** Pravastatin significantly increased total eNOS activity in healthy (28%) and preeclamptic placentas (32%). This effect was independent of caveolin, Hsp90 and Ser1177 phosphorylation. Pravastatin induced arginine uptake of placental microsomes in both healthy (38%) and preeclamptic pregnancies (34%). To test for BH4 resistance, we changed the known methodology to protect BH4 from oxidation. The new methodology reduced the number of BH4-resistant samples. One of the 9 preeclamptic patients was BH4 resistant, physiologic BH4 concentration did not significantly increase NOS activity. 10  $\mu$ M pravastatin increased NOS activity by 32-38% at all BH4 concentration in healthy, BH4 sensitive and BH4 resistant preeclamptic samples. **"Conclusions"** The previously unknown increase in arginine transport may contribute to the effects of pravastatin. Our results complement the effect of pravastatin on human placental NO production with a new mechanism. 10  $\mu$ M pravastatin increased BH4-resistant placental NOS activity to a similar extent as placental physiological BH4 concentration increased BH4-sensitive NOS activity. Thus, our study showed that pravastatin raises BH4-resistant preeclamptic placental NOS activity to physiological levels. These new findings may contribute to better understanding of preeclampsia and may also have a clinical relevance.

## 9. Irodalomjegyzék

Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. (2006) Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*, 5:279-95

Abbasi H, Dastgheib SA, Hadadan A, Karimi-Zarchi M, Javaheri A, Meibodi B, Zambagh L, Tabatabaei RS, Neamatzadeh H. (2020) Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase 894G > T Polymorphism With Preeclampsia Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 35 Studies. *Fetal Pediatr Pathol*, 10:1-16

Açikgoz S, Harma M, Harma M, Mungan G, Can M, Demirtas S. (2006) Comparison of angiotensin-converting enzyme, malonaldehyde, zinc, and copper levels in preeclampsia. *Biol Trace Elem Res*, 113: 1-8

Ádám V, Dux L, Faragó A, Fésüs L, Machovich R, Mandl J, Sümegi B. *Orvosi biokémia, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2006: 581*

Ahmed A, Rezai H, Broadway-Stringer S. (2017) Evidence-Based Revised View of the Pathophysiology of Preeclampsia. *Adv Exp Med Biol*, 956: 355-374

Ahmed A, Williams DJ, Cheed V, Middleton LJ, Ahmad S, Wang K, Vince AT, Hewett P, Spencer K, Khan KS, Daniels JP. (2020) StAmP trial Collaborative Group. Pravastatin for early-onset pre-eclampsia: a randomised, blinded, placebo-controlled trial. *BJOG*, 127(4): 478-488



Alasztics B, Kukor Z, Pánczél Z, Valent S. (2012) The pathophysiology of preeclampsia in view of the two-stage model. [A praeeclampsia kórélettana a kétlépcsős modell tükrében]. *Orv Hetil*, 153: 1167-76

Alqudah A, McKinley MC, McNally R, Graham U, Watson CJ, Lyons TJ, McClements L. (2018) Risk of pre-eclampsia in women taking metformin: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*, 35: 160–72

Aouache R, Biquard L, Vaiman D and Miralles F. (2018) Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci*, 19: 1496

Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Passalacqua M, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. (2008) Functional role of HSP90 complexes with endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) and calpain on nitric oxide generation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 283(43): 29069-76

Azami M, Azadi T, Farhang S, Rahmati S, Pourtaghi K. (2017) The effects of multi mineral-vitamin D and vitamins (C+E) supplementation in the prevention of preeclampsia: An RCT. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 15: 273-278

Balan A, Szaingurten-Solodkin I, Swissa SS, Feinshtein V, Huleihel M, Holcberg G, Dukler D, Beharier O. (2017) The effects of pravastatin on the normal human placenta: Lessons from ex-vivo models. *PLoS One*, 12(2): e0172174

Bánhegyi G, Csala M, Nagy G, Sorrentino V, Fulceri R, Benedetti A. (2003) Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1. *Biochem J*, 376(Pt 3): 807-812

Bányász I, Szabó Sz, Bokodi G, Vannay A, Vásárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó J Jr. (2006) Genetic Polymorphisms of Vascular Endothelial Growth Factor in Severe Pre-Eclampsia. *Mol Hum Reprod*, 12(4): 233-6

Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. (2007) Preeclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 335: 974.

Bian Z, Shixia C, Duan T. (2015) First-Trimester Maternal Serum Levels of sFLT1, PGF and ADMA Predict Preeclampsia. *PLoS One*, 10(4): e0124684

Black KD. (2007) Stress, symptoms, self-monitoring confidence, well-being, and social support in the progression of preeclampsia/gestational hypertension. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 5:419-29

Block DS, Saenger AK. (2010) Preeclampsia prediction, diagnosis, and management beyond proteinuria and hypertension. *Clin Lab News*, 36, 8–10

Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. (2007) Asymmetric Dimethylarginine Determines the Improvement of Endothelium-Dependent Vasodilation by Simvastatin : Effect of Combination With Oral L-Arginine. *J Am Coll Cardiol*, 49(23): 2274-82

Bramham K, Hladunewich MA, Jim B, Maynard SE. (2016) Pregnancy and kidney disease. *NephSAP*, 15: 1-104

Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, Hall DR, Warren CE, Adayi G, Ishaku S. (2018) The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*, 13: 291-310

Broughton PF, Rubin PC. (1994) Pre-eclampsia--the 'disease of theories'. *Br Med Bull*, 2: 381-96

Brownfoot FC, Hastie R, Hannan NJ, Cannon P, Tuohey L, Parry LJ, Senadheera S, Illanes SE, Kaitu'u-Lino TJ, Tonget S. (2016) Metformin as a prevention and treatment for preeclampsia: effects on soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin secretion and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*, 214: 356.e1–15

Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y. (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 116: 402-14

Burton GJ, Jauniaux E.(2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 287–299

Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Kim MR, Espinoza J, Bujold E, Gonçalves L, Gomez R, Edwin S, Mazor M. (2005) Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 17, 3–18

Chatterjee A and Catravas JD. (2008) Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*, 49(4-6): 134–140

Chen Y, Jiang B, Zhuang Y, Peng H, Chen W. (2017) Differential effects of heat shock protein 90 and serine 1179 phosphorylation on endothelial nitric oxide synthase activity and on its cofactors. *PlosOne*, 12(6): e0179978

Chesley LC. Hypertensive disorders in pregnancy. In: *Williams Obstetrics*. 14th Edition. Eds.: Williams, J. W., Hellman, L. M., Pritchard, J. A. Appleton Century Crofts, New York. 1971: 700–702

Chimini JS, Possomato-Vieira JS, da Silva MLS, Dias-Junior CA. (2019) Placental nitric oxide formation and endothelium-dependent vasodilation underlie pravastatin effects against angiogenic imbalance, hypertension in pregnancy and intrauterine growth restriction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 124: 385-393

Chreifi G, Li H, McInnes CR, Gibson CL, Suckling CJ, Poulos TL. (2014) Communication between the zinc and tetrahydrobiopterin binding sites in nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 53: 4216-23

Churchill D, Beevers GD, Meher S, Rhodes C. (2007) Diuretics for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*, 1: CD004451

Ciarmela P, Boschi S, Bloise E, Marozio L, Benedetto C, Castellucci M, Petraglia F. (2010) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes in preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 148(2): 144-6

Cluver CA, Hannan NJ, van Papendorp E, Hiscock R, Beard S, Mol BW, Gerhard B, Theron GB, Hall DR, Decloedt EH, Stander M, Adams KT, Rensburg M, Schubert P,

Walker SP, Tong S. (2018) Esomeprazole to treat women with preterm preeclampsia: a randomized placebo controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*, 219: 388.e1–17

Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS. (2011) Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*, 204: 503.e1-12

Cornelis T, Odutayo A, Keunen J, Hladunewich M. (2011) The kidney in normal pregnancy and preeclampsia. *Semin. Nephrol*, 31: 4–14

Costantine MM, Cleary K, Hebert MF, Ahmed MS, Brown LM, Ren Z, Easterling TR, Haas DM, Haneline LS, Caritis SN, Venkataramanan R, West H, D'Alton M, Hankins G, Shriver EK. (2016) Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*, 214: 720.e1-720.e17

Craven CM, Morgan T, Ward K. (1998) Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, 19, 241–252

Cudihy D, Lee RV. (2009) The pathophysiology of pre-eclampsia: current clinical concepts. *J Obstet Gynaecol*, 29, 576–582

Datar R, Kaesemeyer WH, Chandra S, Fulton DJ, Caldwell RW. (2010) Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1, G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx. *Br J Pharmacol*, 160(7): 1765-72

Davies CJ. (2007) Why is the fetal allograft not rejected? *J Anim Sci*, 85, 32–35

de Alwisa N, Beard S, Mangwiro YT, Bindera NK, Kaitu'u-Lino TJ, Brownfoot FC, Tong S, Hannana NJ. (2020) Pravastatin as the statin of choice for reducing pre-eclampsia-associated endothelial dysfunction. *Pregnancy Hypertens*, 20: 83-91

Dodd JM, McLeod A, Windrim RC, Kingdom J. (2010) Antithrombotic therapy for improving maternal or infant health outcomes in women considered at risk of placental dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev*, 6: CD006780

Dorniak-Wall T, Grivell RM, Dekker GA, Hague W, Dodd JM. (2014) The Role of L-arginine in the Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia: A Systematic Review of Randomised Trials. *J Hum Hypertens*, 28: 230-5

Douglas KA, Redman CW. (1994) Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ*, 309: 1395–1400.

Duckitt K, Harrington D. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 7491: 565

Dusse LM, Alpoim PN, Silva JT, Rios DR, Brandao AH, Cabral AC. (2015) Revisiting HELLP syndrome. *Clin Chim Acta*, 117-20.

Dymara-Konopka W, Laskowska M. (2019) The Role of Nitric Oxide, ADMA, and Homocysteine in The Etiopathogenesis of Preeclampsia-Review. *Int J Mol Sci*, 20(11): E2757

- Egeland GM, Klungsøyr K, Øyen N, Tell GS, Næss Ø, Skjærven R. (2016) Preconception cardiovascular risk factor differences between gestational hypertension and preeclampsia: cohort norway study. *Hypertension*, 67: 1173-1180
- English FA, Kenny LC, McCarthy FP. (2015) Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integr Blood Press Control*, 7-12
- Espinoza J, Vidaeff A, Pettker CM, Simhan H. (2019) ACOG practice bulletin No. 202: gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 133 (1): e1–25
- Everett TR, Wilkinson IB, & Lees CC. (2012) Drug development in preeclampsia: a ‘no go’ area? *J. Matern.-Fetal Neonatal Med*, 25(1): 50–52
- Fekete A, Vér A, Bögi K, Treszl A, Rigó J Jr. (2006) Is preeclampsia associated with higher frequency of HSP70 gene polymorphisms? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 126(2): 197-200
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. (2014) Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*, 20(6): 953–66
- Fox KA, Longo M, Tamayo E, Kechichian T, Bytautiene E, Hankins GD, Saade GR, Costantine MM. (2011) Effects of pravastatin on mediators of vascular function in a mouse model of soluble Fms-like tyrosine kinase-1-induced preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 205(4): 366.e1-5

Gandley RE, Rohland J, Zhou Y, Shibata E, Harger GF, Rajakumar A, Kagan VE, Markovic N, Hubel CA. (2008) Increased myeloperoxidase in the placenta and circulation of women with preeclampsia. *Hypertension*. 52, 387–393

Garg P, Jaryal AK, Kachhawa G, Deepak KK, Kriplani A. (2018) Estimation of asymmetric dimethylarginine (ADMA), placental growth factor (PLGF) and pentraxin 3 (PTX 3) in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 14: 245-251.

Genest DS, Falcao S, Gutkowska J, Lavoie JL. (2012) Impact of exercise training on preeclampsia: potential preventive mechanisms. *Hypertension*, 60: 1104–9

Gill SK, O'Brien L, Einarson TR, Koren G. (2009) The safety of proton pump inhibitors (PPIs) in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 104(6): 1541–5

Grillo MA, Lanza A, Colombatto S. (2008) Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids*, 34(4): 517-23

Gumus E, Atalay MA, Cetinkaya Demir B, Sahin Gunes E. (2016) Possible role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in prediction of perinatal outcome in preeclampsia and fetal growth retardation related to preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29(23): 3806-11

Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. (2009) The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*, 8: 1–15



Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC. (2001) Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*, 276, 16587–16591

Henderson JT, Whitlock EP, O'Connor E, Senger CA, Thompson JH, Rowland MG. (2014) Low-dose aspirin for prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: a systematic evidence review for the U.S. preventive services task force. *Ann Intern Med*, 160: 695–703

Hentschke M, Smith-Jackson K, Poli-de-Figueiredo CE, Costa BE, Kurlak LO, Broughton Pipkin F, Czajka A, Mistry HD. (2013) Placental expression of the major protein components of caveolae, eNOS and iNOS in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 3(2): 71

Hesthammer R, Eide T, Thorsen E, Svardal AM, Djurhuus R. (2019) Decrease of tetrahydrobiopterin and NO generation in endothelial cells exposed to simulated diving. *Undersea Hyperb Med*, 46: 159-169

Higgins JR, Brennecke SP. (1998) Pre-eclampsia--still a disease of theories? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2:129-33

Hofmeister V, Weiss EH. (2003) HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Sem Cancer Biol*, 13, 317–323

Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah AN, Duley L, Torloni MR. (2014) Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*, (6): CD001059

<http://www.health.am/pregnancy/preeclampsia/>. [Online, letöltve 2020. febr. 12.]

Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. (2002) Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*, 1: 158-66

James JL, Whitley GS, Cartwright JE. (2010) Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *J. Pathol*, 221, 363–378

Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. (1999) Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol*, 33(1): 234-41

Kaitu'u-Lino TJ, Brownfoot FC, Beard S, Cannon P, Hastie R, Nguyen TV, Binder NK, Tong S, Hannan NJ. (2018) Combining metformin and esomeprazole is additive in reducing sFlt-1 secretion and decreasing endothelial dysfunction – implications for treating preeclampsia. *PLoS One*, 13(2): e0188845

Kattah AG and Garovic VD. (2018) From Delivery to Dialysis: Does Preeclampsia Count? *Am J Kidney Dis*, 71(5): 601-604

Kikuchi C, Kajikuri J, Hori E, Nagami C, Matsunaga T, Kimura K, Itoh T. (2014) Aortic superoxide production at the early hyperglycemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin. *Biol Pharm Bull*, 37(6): 996-1002

Kim MC, Ahn Y, Jang SY, Cho KH, Hwang SH, Lee MG, Ko JS, Park KH, Sim DS, Yoon NS, Yoon HJ, Kim KH, Hong YJ, Park HW, Kim JH, Jeong MH, Cho JG, Park JC, and Kang JC. (2011) Comparison of Clinical Outcomes of Hydrophilic and Lipophilic Statins in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Korean J Intern Med*, 26(3): 294–303

Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. (2006) Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta*, 27(4-5): 438-44

Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. (1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 6: 632-40

Knapp HR, Reilly IA, Alessandrini P, FitzGerald GA. (1986) In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *N Engl J Med*, 15: 937-42

Knuist M, Bonsel GJ, Zondervan HA, Treffers PE. (1998) Low sodium diet and pregnancy-induced hypertension: a multicentre randomised controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol*, 105: 430-4

Kukor Z, Mészáros G, Hertelendy F, Tóth M. (1996) Calcium-dependent nitric oxide synthesis is potently stimulated by tetrahydrobiopterin in human primordial placenta. *Placenta*, 17: 69-73

Kukor Z, Tóth M. (1994) Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent NO-synthesizing activities of human primordial placenta. *Acta Physiol Hung*, 82(4): 313-9

Kukor Z, Valent S, Tóth M. (2000) Regulation of nitric oxide synthase activity by tetrahydrobiopterin in human placentae from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*, 21: 763-772

Kukor Z, Valent S. (2010) Nitric oxide and preeclampsia. [A nitrogén-monoxid-szintézis zavarai praeclampsziában.] *Orv Hetil*, 151: 2125-2135

Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. (2011) Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 1451-1455

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 6, 1004–1010

Laufs U, La Fata V, Plutzky J. (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 97, 1129–1135

Lautatzis ME, Goulis DG, Vrontakis M. (2013) Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Metabolism*, 62(11): 1522–34

LeFevre ML. (2014) Low-dose aspirin use for the prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, 161 (11): 819-826

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*, 7: 672-83

Li DK, Wi S. (2000) Changing paternity and the risk of preeclampsia in the subsequent pregnancy. *Am J Epidemiol*, 151: 57–62

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75

Lyall F. (2005) Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy-a review. *Placenta*, S31-6

Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. (2009) Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension*, 53: 944-51

Ma Y, Shen X, Zhang D. (2015) The Relationship between Serum Zinc Level and Preeclampsia: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 7: 7806-7820

Ma'ayeh M, Costantine MM. (2020) Prevention of Preeclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2: 101123

Magyar Nőorvos Társaság: Toxaemia, praeclampsia, eclampsia. In: Útmutató. Klinikai irányelvek kézikönyve – 2008. dec. Szülészeti és Nőgyógyászati Szemle, CD melléklet, 2008: 10: 61–67

Mangham LJ, Petrou S, Doyle LW, Draper ES, Marlow N. (2009) The cost of preterm birth throughout childhood in England and Wales. *Pediatrics*, 123: e312–e327

Maruta E, Wang J, Kotani T, Tsuda H, Nakano T, Imai K, Sumigama S, Niwa Y, Mitsui T, Yoshida S, Yamashita M, Nawa A, Tamakoshi K, Kajiyama H, Kikkawa F. (2017) Association of serum asymmetric dimethylarginine, homocysteine, and l-arginine concentrations during early pregnancy with hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Chim Acta*, 475: 70-77

McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ. (2008) Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J*, 156: 918-30

Milczarek R, Sokolowska E, Hallmann A, Klimek J. (2007) The NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes. *Mol Cell Biochem*, 295: 105-111

Molnár M, Sütő T, Tóth T, Hertelendy F. (1994) Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*, 170(5 Pt 1): 1458-66

Molvarec A, Szarka A, Lázár L, Bekő G, Rigó J jr. (2012) Serum cytokine profile in normal pregnancy and preeclampsia. *Magyar Nőorvosok Lapja*, 75, 10–20

Moncada S. (1994) Nitric oxide. *J Hypertens Suppl*, 12: S35-39

Moore-Maxwell CA, Robboy SJ. (2004) Placental site trophoblastic tumor arising from antecedent molar pregnancy. *Gynecol Oncol*, 2: 708-12

Morgan, T., Craven, C., Ward, K. (1998) Human spiral artery reninangiotensin system. *Hypertension*, 32, 683–687

Murphy SR, LaMarca B, Cockrell K, Arany M, Granger JP. (2012) L-arginine supplementation abolishes the blood pressure and endothelin response to chronic increases in plasma sFlt-1 in pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(2): R259-63

Nagy B, Toth T, Rigó J Jr, Karádi I, Romics L, Papp Z. (1998) Detection of factor V Leiden mutation in severe pre-eclamptic Hungarian women. *Clin Genet*, 53: 478–481

Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porrati F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G. (2004) L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension*, 43(3): 614-22

O'Gorman N, Wright D, Rolnik DL, Nicolaides KH, Poon LC. (2016) Study protocol for the randomised controlled trial: combined multimarker screening and randomised patient treatment with ASpirin for evidence-based PREeclampsia prevention (ASPRE). *BMJ Open*, 6(6): e011801

Ohkawara H, Ishibashi T, Saitoh S, Inoue N, Sugimoto K, Kamioka M, Uekita H, Kaneshiro T, Ando K, Takuwa Y, Maruyama Y, Takeishi Y. (2010) Preventive effects of pravastatin on thrombin-triggered vascular responses via Akt/eNOS and RhoA/Rac1 pathways in vivo. *Cardiovasc Res*, 88(3): 492-501

Onda K, Tong S, Beard S, Binder N, Muto M, Senadheera SN, Parry L, Dilworth M, Renshall L, Brownfoot F, Hastie R, Tuohey L, Palmer K, Hirano T, Ikawa M, Kaitu'u-Lino T, Hannan NJ. (2017) Proton pump inhibitors decrease soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin secretion, decrease hypertension, and rescue endothelial dysfunction. *Hypertension*, 69(3): 457–68

Osol G, Ko NL, Mandalà M. Altered Endothelial Nitric Oxide Signaling as a Paradigm for Maternal Vascular Maladaptation in Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*. 2017; 19(10): 82

Osol G, Ko NL, Mandalà M. (2019) Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy. *Annu Rev Physiol*, 81: 89-111

Ota H, Eto M, Kano MR, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. (2010) Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(11): 2205-2211

Pánczél Z, Kukor Z, Supák D, Kovács B, Kecskeméti A, Czizel R, Djurecz M, Alasztics B, Csomó KB, Hrabák A, and Valent S. (2019) Pravastatin induces NO synthesis by enhancing microsomal arginine uptake in healthy and preeclamptic placentas. *BMC Pregnancy and Childbirth.*, 19:426

Park JH, Lee YS, Oh YH, Oh SM, Kim HG, Na JY. (2017) Spontaneous Hepatic Rupture in a Pregnant Woman with Preeclampsia: An Autopsy Case. *Korean J Leg Med*, 41: 46-50



Pasternak B, Hviid A. (2010) Use of proton-pump inhibitors in early pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med*, 363: 2114–23

Paulin F, Pajor A. Eclampsia. In: Textbook of obstetrics and gynaecology. szerkesztette Papp Z. [Eclampsia. In: A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Szerk.: Papp, Z.] Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009: 212

Paulin Ferenc, Pajor Attila, szerkesztő Papp Zoltán. A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Semmelweis Kiadó, Budapest 2007; 212-215

Peraçoli JC, Borges VTM, Ramos JGL, Cavalli RC, Costa SHAM, Oliveira LG, Souza FLP, Korkes HA, Brum IR, Costa ML, Corrêa Junior MD, Sass N, Diniz ALD, Prado CAC, Cunha Filho EVD. (2019) Pre-eclampsia/Eclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 41: 318-332

Pereira TV, Rudnicki M, Soler JM, Krieger JE. (2006) Meta-analysis of aspirin for the prevention of preeclampsia: do the main randomized controlled trials support an association between low-dose aspirin and a reduced risk of developing preeclampsia? *Clinics (Sao Paulo)*, 2: 179-82

Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA. (2019) Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol*, 15(5): 275-289

Pimentel AML, Pereira NR, Costa CA, Mann GE, Cordeiro VS, de Moura RS, Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Resende AC. (2013) L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertension Research*, 36: 783–788

Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH, and Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. (2006) Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 367: 1145-54

Powers RW, Jeyabalan A, Clifton RG, Van Dorsten P, Hauth JC, Klebanoff MA, Lindheimer MD, Sibai B, Landon M, Miodovnik M. (2010) Soluble fmslike tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PLoS One*, 5: e13263

Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. (2002) Part 1: Clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv*, 57: 598–618

Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. (2002) Part 2: experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv*, 57: 619–640

Pulido EEC, Benavides LG, Barón JGP, Gonzalez SP, Saray AJM, Padilla FEG, Sutto SET. (2016) Efficacy of L-arginine for Preventing Preeclampsia in High-Risk Pregnancies: A Double-Blind, Randomized, Clinical Trial *Hypertens Pregnancy*, 35: 217-25

Putra RA, Effendi JS, Permadi W, Bandiara R, Fauziah PN. (2018) Role of statin as inducer of Hmox-1 system in treatment of preeclampsia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 64: 1-4

Redecha P, van Rooijen N, Torry D, Girardi G. (2009) Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood*, 113: 4101-4109

Redman CW, Sargent IL. (2009) Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, 30, 38–42

Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308: 1592–1594

Redman CW, Sargent IL. (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta*, S21-7

Redman CW. (1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, 12: 301-308

Reslan OM, Khalil RA: (2010) Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 8, 204–226

Reynolds C, Mabie WC, Sibai BM. Preeclampsia. [Online, letöltve 2020. febr. 12.]

Rigó J Jr, Boze T, Derzsy Z, Derzbach L, Treszl A, Lázár L, Sobel G, Vásárhelyi B. (2006) Family history of early-onset cardiovascular disorders is associated with a higher risk of severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 128(1-2): 148-51

Rigó J Jr, Nagy B, Fintor L, Tanyi J, Beke A, Karádi I, Papp Z. (2000) Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Hypertens Pregnancy*, 19, 163–172

Rigó J Jr. (1996) The principles of prenatal care in chronic hypertensive women. [A krónikus hypertóniás terhesek gondozásának alapelvei.] *Háziorvos Továbbképző Szemle*, 1: 125–127

Roberge S, Bujold E, Nicolaides KH. (2018) Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 218 (3): 287-293

Roberge S, Nicolaides K, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. (2017) The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis *Am J Obstet Gynecol*, 216 (2): 110-120

Roberts JM, Hubel CA. (1999) Is oxidative stress the link in the two-stage model of preeclampsia? *Lancet*, 354: 788–789

Roberts JM, Hubel CA. (2009) The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*, 30: 32–37

Robillard PY, Hulsey TC, Périanin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E. (1994) Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*, 344: 973–975

Rodger MA, Carrier M, Le Gal G, Martinelli I, Perna A, Rey E, de Vries JI, Gris JC. (2014) Meta-analysis of lowmolecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications. *Blood*, 123: 822-8

Rolnik DL, Wright D, Poon LCY, Syngelaki A, O'Gorman N, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Papaioannou G, Tenenbaum-Gavish K, Nicolaides KH. (2017) ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, Oct;50(4):492-495

Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O'Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Papaioannou G, Tenenbaum-Gavish K, Meiri H, Gizurarson S, Maclagan K, Nicolaides KH. (2017) Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *N Engl J Med*, 377:613-622

Ross MG. Eclampsia. <http://emedicine.medscape.com/article/253960-overview>. [Online, letöltve 2020. márc. 09.]

Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA, Robinson JS, and ACTS Study Group. (2006) Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N Engl J Med*, 354: 1796-806

Rumiris D, Purwosunu Y, Wibowo N. (2006) Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status. *Hypertens Pregnancy*, 25: 241-253

Sahin-Tóth M, Kukor Z, Tóth M. (1997) Tetrahydrobiopterin preferentially stimulates activity and promotes subunit aggregation of membrane-bound calcium-dependent nitric oxide synthase in human placenta. *Molecular Human Reproduction*, 3: 293-298

Saleh L, Samantar R, Garrelds IM, Van Den Meiracker AH, Visser W, Danser AHJ. (2017) Low soluble Fms-like tyrosine Kinase-1, endoglin, and endothelin-1 levels in women with confirmed or suspected preeclampsia using proton pump inhibitors. *Hypertension*, 70(3): 594–600

Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. (2008) Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension*, 52, 402–407

Sekimoto A, Tanaka K, Hashizume Y, Sato E, Sato H, Ikeda T, Takahashi N. (2020) Tadalafil alleviates preeclampsia and fetal growth restriction in RUPP model of preeclampsia in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 521(3): 769-774

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

Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. (2002) The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 346: 33–38

Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. (2009) Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol*, 174, 1959–1971

Smith-Jackson K, Hentschke MR, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Kurlak LO, Broughton Pipkin F, Czajka A, Mistry HD. (2013) Placental expression of eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 3(2): 71

Spinnato JA, Freire S, Pinto E Silva JL, Cunha Rudge MV, Martins-Costa S, Koch MA, Goco N, Santos Cde B, Cecatti JG, Costa R, Ramos JG, Moss N, Sibai BM. (2007) Antioxidant therapy to prevent preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 110: 1311-8

Staff AC. (2019) The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology*, 134–135: 1-10

Strobel J, Mieth M, Endress B, Auge D, König J, Fromm MF, Maas R. (2012) Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter 1 (CAT1). *J Mol Cell Cardiol*, 53(3): 392-400

Su Y. (2014) Regulation of Endothelial Nitric oxide Synthase Activity by Protein-Protein Interaction. *Curr Pharm Des*, 20(22): 3514–3520

Subtil D, Goeusse P, Puech F, Lequien P, Biaisque S, Breart G, Uzan S, Marquis P, Parmentier D, Churlet A. (2003) Aspirin (100 mg) used for prevention of pre-eclampsia in nulliparous women: the Essai Regional Aspirine Mere-Enfant study (Part 1). *BJOG*, 5: 475-84

Syngelaki A, Nicolaidis KH, Balani J, Hyer S, Akolekar R, Kotecha R, Pastides A, Shehata H. (2016) Metformin versus placebo in obese pregnant women without diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 374: 434–43

Sziller I, Nguyen D, Halmos A, Hupuczi P, Papp Z, Witkin SS. (2005) An A>G polymorphism at position –670 in the Fas (TNFRSF6) gene in pregnant women with pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Molecular Human Reproduction*, 11(3): 207–210

Taguchi N, Rubin ET, Hosokawa A, Choi J, Ying AY, Moretti ME, Koren G, Ito S. (2008) Prenatal exposure to HMG-CoA reductase inhibitors: effects on fetal and neonatal outcomes. *Reprod Toxicol*, 26: 175-177

Teng M, Khoo AL, Zhao YJ, Lin L, Lim BP, Wu TS, Dan YY. (2015) Meta-analysis of the effectiveness of esomeprazole in gastroesophageal reflux disease and helicobacter pylori infection. *J Clin Pharm Ther*, 40(4):368–75

Terán Y, Ponce O, Betancourt L, Hernández L, Rada P. (2012) Amino acid profile of plasma and cerebrospinal fluid in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 2(4): 416-22

Tóth M, Kukor Z, Valent S. (2002) Chemical stabilization of tetrahydrobiopterin by L-ascorbic acid: Contribution to placental endothelial nitric oxide synthase activity. *Molecular Human Reproduction*, 8: 271-280

Tóth M. (2002) Role of tetrahydrobiopterin in the regulation of activity of human placental nitric oxide synthase in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Orv Hetil*, 143(8): 391-8



Vaishali K, Deepali S, Surabhi D, Mayur S, Anvita K, Sadhana J. (2019) Maternal omega-3 fatty acids and vitamin E improve placental angiogenesis in late-onset but not early-onset preeclampsia. *Mol Cell Biochem*, 461(1-2):159-170

Valent S, Németh J, Sára L, Gidai J, Tóth P, Schaff Z, Paulin F, Pajor A. (2011) High early uterine vascular resistance values increase the risk of adverse pregnancy outcome independently from placental VEGF and VEGFR1 reactivities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 156: 165-170

Valent S, Tóth M. (2004) Spectrophotometric analysis of the protective effect of ascorbate against spontaneous oxidation of tetrahydrobiopterin in aqueous solution: Kinetic characteristics and potentiation by catalase of ascorbate action. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 1266-1280

Vatish M, Randeva HS, Grammatopoulos DK. (2006) Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of preeclampsia. *Trends Mol Med*, 12, 223–233

Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Skjaerven R, Iversen BM. (2008) Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N Engl J Med*, 359: 800-9

Villa PM, Laivuori H, Kajantie E, Kaaja R.(2009) Free fatty acid profiles in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 81, 17–21

Villar J, Purwar M, Merialdi M, Zavaleta N, Ngoc NTN, Anthony J, De Greeff A, Poston L, Shennan A, WHO Vitamin C and Vitamin E trial group. (2009) World Health Organisation multicentre randomised trial of supplementation with vitamins C and E among pregnant women at high risk for pre-eclampsia in populations of low nutritional status from developing countries. *BJOG*, 116: 780-8

Walsh SW. (2004) Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70: 223-232

Walsh SW. (2007) Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol Metab*, 10: 365-370

Winterfeld U, Allignol A, Panchaud A, Rothuizen LE, Merlob P, Cuppers-Maarschalkerweerd B, Vial T, Stephens S, Clementi M, De Santis M, Pistelli A, Berlin M, Eleftheriou G, Maňáková E, Buclin T. (2013) Pregnancy outcome following maternal exposure to statins: a multicentre prospective study. *BJOG*, 120: 463-471

Yang S, Song L, Shi X, Zhao N, Ma Y. (2019) Ameliorative effects of pre-eclampsia by quercetin supplement to aspirin in a rat model induced by L-NAME. *Biomed Pharmacother*, 116: 108969

Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. (2010) Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol*, 173-92

Zahiri Sorouri Z, Sadeghi H, Pourmarzi D. (2016) The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome: a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29: 2194-2198

Zheng JJ, Wang HO, Huang M, Zheng FY. (2016) Assessment of ADMA, estradiol, and progesterone in severe preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*, 38(4): 347-51

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*, 4: 1405-23

Zhu Q, Zhang L, Chen X. (2016) Association between zinc level and the risk of preeclampsia: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, 293: 377-382

Zou Y, Li S, Wu D, Xu Y, Wang S, Jiang Y, Liu F, Jiang Z, Qu H, Yu X, Wang X, Wang Y, Sun L. (2019) Resveratrol promotes trophoblast invasion in pre-eclampsia by inducing epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*, 23(4): 2702-2710

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Alasztics B, Kukor Z, **Pánczél Z**, Valent S. A praeclampsia kórétettana a kétlépcsős modell tükrében [The pathophysiology of preeclampsia in view of the two-stage model]. Orv Hetil. 2012; 153(30): 1167-1176

**Pánczél Z**, Kukor Z, Supák D, Kovács B, Kecskeméti A, Czizel R, Djurecz M, Alasztics B, Csomó KB, Hrabák A, and Valent S. Pravastatin induces NO synthesis by enhancing microsomal arginine uptake in healthy and preeclamptic placentas. BMC Pregnancy Childbirth. 2019; 19(1): 426 IF: 2,239

**Pánczél Z**, Supák D, Kovács B, Kukor Z, Valent S. Pravasztatin hatása tetrahydrobiopterin érzékeny és -rezisztens praeclampsziás placenták NO szintáz aktivitására [Effect of pravastatin on tetrahydrobiopterin sensitive and resistant NO synthase activity of preeclamptic placentas]. Orv Hetil. 2020; 161(10): 395–401. IF: 0,564

### 10.2. Disszertációtól független közlemények

**Pánczél Z**, Sára L, Tóth P, Hubay M, Keller E, Langmár Z, Pajor A. Spontán aortaruptura várandósság alatt [Spontaneous aortic rupture during pregnancy]. Orv Hetil. 2011; 152(23): 929-933

## 11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Valent Sándornak, aki már az egyetemi tudományos diákkörös idők óta segítette tudományos munkámat, támogatott, segített és rendületlenül biztatott, akkor is, amikor már majdnem feladtam.

Köszönet Pajor Attila professzor úrnak a bizalmáért, amiért 2007-ben érdekesnek tartott arra, hogy Semmelweis Egyetem II. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársa legyek és lehetővé tette, hogy a klinikai munka mellett tudományos munkát is végezzek. Bánhidy Ferenc professzor úrnak és Ács Nándor professzor úrnak, akik a későbbiekben igazgatóként támogattak.

Külön köszönet illeti Dr. Kukor Zoltánt, aki bevezetett a biokémia rejtelseibe, végtelen türelemmel segítette és koordinálta a laborban végzett munkát, és aki fáradtságot nem kímélve bármikor rendelkezésre állt és támogatott.

Hálás vagyok a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Üllői úti telephelyén dolgozó kollégáimnak és barátaimnak, akiktől rengeteget tanultam. A műtő és a szülőszoba dolgozóinak, akik a minták gyűjtésében segítettek.

Köszönet az Orvosi Vegytani Intézetben dolgozó, munkámat segítő munkatársaknak.

Hálás vagyok a családomnak, akik mindenben támogattak, biztattak és elviseltek a nehezebb időszakokban is. Férjemnek és gyermeimnek, hogy vannak, hogy szeretnek, kitartanak mellettem és minden nehézség ellenére lehetővé tették, hogy ide eljussak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a várandósoknak, akik részt vettek a kutatásban, adataikat és mintájukat önzetlenül rendelkezésünkre bocsátották.