

Patogenetikai markerek vizsgálata praeeclampsiában

Doktori értekezés tézisei

Dr. Stenczer Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Rigó János egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Melczer Zsolt, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Gyarmati Béla, osztályvezető főorvos, Ph.D.

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Paulin Ferenc egyetemi tanár, az MTA doktora

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sobel Gábor, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Dr. Demeter János, osztályvezető főorvos, kandidátus

Budapest
2011

Bevezetés

A praeclampsia (PE) a humán terhességek súlyos komplikációja, incidenciája 2-10% világszerte. Tekintve, hogy az anyai és magzati morbiditás, illetve mortalitás nagy részéért a PE tehető felelőssé, napjaink szülészeti egyik legnagyobb kihívását jelenti, még a fejlett országokban is. Alapvető tünetei a hipertónia és a proteinuria, melyek az esetek többségében a terhesség harmadik trimeszterében jelennek meg, és a szülést követően pár héten belül visszafejlődnek. A HELLP-szindróma (hemolízis, emelkedett májenzimek és alacsony vérlemezkeszám) egy kevésbé gyakori, de gyorsan progrediáló, életet veszélyeztető kórkép, amely elsősorban súlyos PE talaján fejlődik ki.

Intenzív kutatások ellenére, a praeclampsia etiológiája és patogenezise mindmáig csak részben tisztázott. Genetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak benne, multifaktoriális eredetű. Kialakulása két lépcsőben zajlik: ezek a preklinikai és a klinikai stádium. Előbbire a placenta kifejlődésének zavara jellemző, melynek következtében a terhesség előrehaladtával a méhlepényben hipoperfúzió és iszkémia alakul ki, ami számos patofiziológiai mechanizmus beindulásáért felelős. Ezek felelősek a második lépcsőben az anyai tünetek kialakulásáért. A kórkép súlyos, és főleg korai kezdetű formájára (amikor a tünetek a 34. terhességi hét előtt lépnek fel) jellemző a magzat hipoxiája, növekedésbeli elmaradása, esetenként intrauterin elhalása is. Praeclampszában a terhességre az anyai szervezet fokozott szisztémás immunválasszal reagál, emellett az egész szervezetre kiterjedő oxidatív stresszállapot alakul ki, valamint a keringő pro- és anti-angiogenetikus faktorok közötti egyensúly megbomlik. Az anti-angiogenetikus tulajdonságú anyagok, mint a szolubilis vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-1 (VEGFR-1, vagy sFlt1), szintje megnövekedett a PE-ás anyák perifériás vérében, míg a pro-angiogenetikus hatású faktorok mennyisége, mint a placentális növekedési faktor (PlGF) és vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), csökkentek. A VEGF-nek és PlGF-nek központi szerepe van a vaszkuláris endotélium stabilitásának és fiziológiai funkciójának fenntartásában. Az sFlt1 megköti a keringő PlGF-t és VEGF-t, ezzel meggátolva azokat hatásuk kifejtésében endoteliális receptoraikon, ami endotél-diszfunkcióhoz és -károsodáshoz vezet. Az anti-angiogenetikus irányú eltolódás mértéke szoros összefüggést mutat a betegség klinikai

jellemzőivel és súlyosságával. Az egészséges terhességre jellemző immuntolerancia kialakulásának hiánya és a szisztémás gyulladás alapvető tényezők a PE patogenezisében. A gyulladásos folyamatok fontos tulajdonsága a Th2-sejtek fiziológiás dominanciájának hiánya, és így a Th1- típusú immunitás és a pro-inflammatorikus citokinek előtérbe kerülése. Egy további karakterisztikus folyamat a hemosztatikus rendszer aktivációja, amely intravaszkuláris koagulációhoz és konzumpciós koagulopátiához vezethet, trombocitopéniát eredményezve HELLP-szindrómában, illetve a PE súlyos eseteiben.

Az osteopontin (OPN) egy multifunkcionális fehérje, amely endotélsejtekben, vaszkuláris simaizom-sejtekben és immunsejtekben termelődik. Kimutatták, hogy jelen van a humán placenta trophoblastjaiban, és hogy képes a trophoblastok invazivitásának fokozására. Részt vesz a gyulladásos folyamatok szabályozásában, és Th1-típusú pro-inflammatorikus citokinként viselkedik. Az OPN szerepet játszik számos fiziológiás és patológiás folyamat irányításában, mint például az embrió implantációja, placentáció, krónikus gyulladás és autoimmun betegségek. Több klinikai vizsgálat számolt be a megváltozott OPN koncentrációk és a kardiovaszkuláris betegségek összefüggéséről. Az OPN lokális túltermelődését és emelkedett plazmakoncentrációját figyelték meg az aorta, a koronáriák és az arteria carotis ateroszklerózisában. Az ateroszklerózisban és a praeeclamsziában számos rizikófaktor (obesitás, diszlipidémia, inzulin-rezisztencia) és patogenetikai jellemző (gyulladás, oxidatív stressz és endotél-sérülés) közös. Ezenfelül, azok a gravidák, akikben PE alakul ki, későbbi életük során fokozott kockázatnak vannak kitéve ateroszklerózis és egyéb kardiovaszkuláris betegségek tekintetében.

A PE hátterében álló folyamatok összetettségére való tekintettel, számos további tényezőt is vizsgáltak, többek között a vasháztartás változásait. Kimutatták, hogy PE-ban, élettani terhességhez viszonyítva, a plazma vas-koncentráció, ferritin-szint és transferrin-szaturáció emelkedett, míg a teljes vaskötő-kapacitás, a nem szaturált vaskötő-kapacitás és az apotranszferrin szint csökkent. Mivel a vas képes reaktív oxigén gyökök (ROS) képzésére, egyes feltételezések szerint az élettaninál magasabb vaskoncentráció fokozott lipidperoxidációhoz és endotélsejt-sérüléshez vezethet PE-ban. A megnövekedett plazma vaskoncentráció azonban ellentétben áll a PE-ban zajló generalizált gyulladásos reakcióval. Számos eredmény és általános klinikai tapasztalat

támogatja azt az elgondolást, miszerint krónikus gyulladásban csökken a vas hozzáférhetősége, ami akár gyulladás által indukált anaemiát is eredményezhet. Ezek alapján, inkább a plazma vaskoncentráció csökkenését várnánk PE-ban, a megfigyelt növekedés helyett. A vashomeosztázis és gyulladás közötti kapocs a hepcidin, egy nemrégiben leírt akut fázis fehérje. Hatását egyrészt a bélből történő vasszorbálás gátlásán, másrészt a ferroportin nevű transzportfehérje degradációját és internalizációját indukálva, az enterocitákból és makrofágokból a keringésbe történő vasszabadulás megakadályozásán keresztül fejti ki. A hepcidin expresszióját számos faktor szabályozza. Elsődleges triggerei az akut gyulladásos szignálok, mint az interleukin-6 (IL-6), valamint a magas vaskoncentráció.

A szolubilis urokináz plazminogen aktivátor receptor (suPAR) egy nemrégiben felfedezett biomarker, amely egyre szélesebb körű alkalmazást nyer a szisztémás gyulladás monitorizálásában. A vérplazmában, cerebrospinális folyadékban és a vizeletben jelen lévő suPAR a membránhoz kötött uPAR hasadása és felszabadulása útján keletkezik. Az immunrendszer aktivációjának fokozódása és a megnövekedett gyulladásos válasz – melyek jelenléte PE-ra jellemző – a plazma suPAR szintjének megemelkedéséhez vezetnek. Ezt támasztják alá a virális, bakteriális és parazita infekciók, valamint autoimmun betegségek és malignómák esetében megfigyelt emelkedett suPAR-szintek. E betegségek többségében kimutatták, hogy a suPAR koncentrációja erős összefüggést mutat a kórkép prognózisával.

A thrombospondin-1 (TSP-1) termelését és a keringésbe való szekrécióját elsősorban aktivált vérlemezkék és endotélsejtek végzik. Legmagasabb koncentrációja a trombociták α -granulumaiban figyelhető meg, és expresszióját többek között a hipoxia szabályozza. A von Willebrand faktorról és fibrinogénnel együtt, TSP-1 hozzájárul a vérrög kialakulásához. Ezenkívül TSP-1 az angiogenezis jól ismert inhibitora és az apoptózis szabályozója. Receptorához, a CD47-hez való kötődésén keresztül, a TSP-1 gátolja a pro-angiogenetikus és értágító hatású cGMP-nek a nitrogén-monoxid (NO) által indukált termelését, ezáltal feltehetően részt vesz a vérnyomás szabályozásában is. Legfrissebb klinikai tanulmányok eredményei szerint, a TSP-1 pro-ateroszklerotikus hatással is rendelkezik, azonban eddig korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre a keringő TSP-1 szintek és kardiovaszkuláris betegségek összefüggéseiről.

A thrombospondin 2 (TSP-2) egy multifunkcionális molekula, amelyet először az extracelluláris mátrix nem-strukturális, szabályozó elemeként írták le, ahol fő funkciója proteáz enzimek és növekedési faktorok aktivitásának és hozzáférhetőségének szabályozása. Kimutatták, hogy a TSP-2 termelődik az érfalakban is, és feltehetőleg az endotélsejtek szekretálják a vérkeringésbe. Ellentétben más thrombospondin típusokkal, a TSP-2 nem található meg a vérlemezkékben kimutatható mennyiségben. A TSP-2 termelődését egyebek mellett a hipoxia is szabályozza. A TSP-2 számos sejtfunkció regulációjában részt vesz, úgymint a proliferáció, a motilitás, az adhézió, az apoptózis és vérlemezke-aggregáció, valamint közreműködik az angiogenezis, a tumornövekedés, a sebgyógyulás és a hemostasis folyamataiban. Számos közlemény foglalkozott a TSP-2 anti-angiogenetikus tulajdonságainak vizsgálatával.

Munkám hajtóereje az volt, hogy a praeclampsia új patogenetikai markereinek felfedezése és ezáltal a háttérben álló folyamatok pontosabb megértése elengedhetetlen feltétele a klinikai eredmények javulásának.

Céltűzés

Céлом az volt, hogy új keringő faktorokat kutassak fel, amelyek a praeclampsia patogenetikus folyamatiban részt vehetnek, és amelyek a betegség biomarkereiként szolgálhatnak. Továbbá, annak érdekében, hogy azok patofiziológiai folyamatokban játszott szerepét megállapítsam, vizsgáltam azok összefüggéseit más, ismert biomarkerekkel, valamint a betegek klinikai jellemzőivel.

1. Vizsgáltam, hogy különbözik-e az OPN szintje a vérkeringésben, PE-ban szenvedő és egészséges terhes nők között. A PE patogenezisében résztvevő folyamatok számos markerét meghatároztam, mint a szisztémás gyulladás (C-reaktív protein (CRP)), endotélaktiváció (von Willebrand-faktor antigén (VWF:Ag)), endotél-sérülés (fibronectin), szisztémás oxidatív stressz (malondialdehidet (MDA)), és a keringő trophoblast-törmelék mennyiségének növekedése (szabad magzati DNS). Tanulmányoztam, hogy van-e összefüggés az OPN-szint és e markerek, valamint a vizsgált betegek klinikai jellemzői és rutin laboratóriumi eredményei között.

2. Célul tűztem ki, hogy meghatározzam a hepcidin kerigő koncentrációját PE-ban, és egészséges terhességben. Vizsgáltam továbbá annak lehetséges összefüggéseit a vasháztartás szabályozásában szerepet játszó egyéb faktorokkal (plazma vas, ferritin, transferrin, teljes vaskötő kapacitás (TIBC), teljes vérsejt-szám) továbbá a szisztémás gyulladás markerével (IL-6) Célom volt, hogy magyarázatot találjak a PE-ban zajló szisztémás gyulladás ellenére fennálló magas vasszint ellentmondására.

3. Meghatároztam a szolubilis urokináz plasminogen aktivátor receptor (suPAR) keringő szintjeit PE-ban és egészséges terhességben. Annak érdekében, hogy a suPAR-t, mint a terhességben fennálló inflammatorikus állapot lehetséges markerét értékeljem, tanulmányoztam összefüggéseit a szisztémás gyulladás egyéb markereivel (IL-6, C-reaktív protein). Vizsgáltam továbbá diagnosztikai hatékonyságát a praeclampsziás betegek és egészséges kontrollok inflammatorikus válasz kiterjedtsége alapján történő elkülönítésében.

4. Célom volt, hogy meghatározzam a szérum TSP-1 szintjeit nem terhes nőkben, illetve egészséges, PE-ban, valamint HELLP-szindrómában szenvedő várandósokban. Vizsgáltam továbbá, hogy van-e valamilyen összefüggés a TSP-1-szintek és a vizsgálatban résztvevők klinikai tulajdonságai között.

5. Vizsgáltam, hogy van-e különbség az anti-angiogenetikus hatású TSP-2 szérum szintjei között praeclampsziás betegekben és egészséges, normotenziós terhes nőkben. Tanulmányoztam, hogy a TSP-2 koncentrációk összefüggést mutatnak-e a betegség klinikai jellemzőivel, és hogy van-e kapcsolat a TSP-2 és az anti-angiogenetikus sFlt-1 illetve pro-angiogenetikus PlGF szintjei között.

Vizsgálati csoportok és módszerek

Tanulmányaimat eset-kontroll megközelítésben végeztem. A vizsgálatban résztvevőket a Semmelweis Egyetem, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán és Kútvölgyi Klinikai Tömb Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályán gondozták 2007 és 2011 között. A PE diagnózisát a National High Blood Pressure Education Program

Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (NHBPEP) definíciói alapján állítottam fel. Korai kezdetű PE-át diagnosztizáltam, ha a hipertónia és proteinuria a betöltött 34. terhességi hét előtt együttesen fennállt. A HELLP-szindrómás betegeket három csoportba soroltam a Mississippi- klasszifikáció alapján. Kizáró tényezőként szerepelt a többes terhesség, krónikus hipertónia, autoimmun betegségek, angiopátia, vesebetegség, anyai vagy magzati infekció, illetve fetális kongenitális anomália. Intrauterin növekedési retardációt akkor diagnosztizáltam, ha a születési súly a gesztációs korra és nemre vonatkoztatott 10. percentilis alatt volt, a magyar születési súly-percentilis görbe alapján.

A perifériás vérmintákat üres vagy antikoagulált kémcsövekbe gyűjtöttem, majd azonnal lecentrifugáltam. A plazma és szérum felülúszókat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam felhasználásig.

A statisztikai számításokat a STATISTICA (version 8.0; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) és a Statistical Package for the Social Sciences (version 15.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) nevű szoftverek segítségével végeztem. A folyamatos változók normál eloszlásának vizsgálatát követően, megfelelő paraméteres vagy nem-paraméteres statisztikai módszereket használtam. Az eredményeket folyamatos változók esetében medián (interkvartilis terjedelem) formában, míg kategorikus változók esetében esetszám (relatív gyakoriság - %) formában tüntettem fel. Minden különbséget a $p < 0,05$ értéke esetén tekintettem statisztikailag szignifikánsnak. Többszörös logisztikus regressziót, vagy kovariancia analízist (ANCOVA) alkalmaztam a zavaró változókra történő adjusztálás céljából.

1. Első vizsgálatomba negyvennégy praeclampsziás terhes nőt (ebből 19 súlyos formában szenvedő) és 44 életkorra és gesztációs korra illesztett normotenziós, egészséges gravidát vontam be. A plazma OPN kvantitatív meghatározását a Human Osteopontin ELISA assay segítségével végeztem. A szérum CRP-koncentrációt a Cobas Integra 800 automata analizátor alkalmazásával mértem. A plazma VWF:Ag koncentrációját ELISA használatával, míg fibronectin koncentrációját nefelométerrel állapítottam meg. A plazma MDA koncentrációit a thiobarbiturátsav-alapú kolorimetriás assay segítségével határoztam meg. A szabad magzati DNS mennyiségének

meghatározása fiú magzatok esetében kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (rtPCR), az Y kromoszóma nemi determináló régiójának (SRY) azonosításával történt.

2. A plazma hepcidin, vas, ferritin, transferrin, teljes vaskötő kapacitás (TVK) és az teljes vérkép meghatározásához 30 praeclampsziás, és 37 egészséges terhes nőtől gyűjtöttem vérmintát. Minden résztvevő szokásos orális vaspótlásban részesült, vas(II)-szulfát formájában (30mg/nap). A hepcidin koncentrációkat egy HPLC-hez kapcsolt tömeg-spektrofotométer segítségével határoztam meg. Az IL-6 szinteket ELISA módszerrel mértem, a Roche Elecsys IL-6 kitet használva. A plazma vas-, transferrin- és ferritin-koncentrációt, valamint a teljes vaskötő kapacitást (TVK) egy automata laboratóriumi analizátorral mértem. A CRP koncentrációját a Roche Tina-quant CRP immuno-turbidimetriás assay alkalmazásával határoztam meg.

3. Harmadik vizsgálatomba 62 egészséges terhes és 41 PE-ás nőt vontam be. Mintavételkor a két csoportban a gestációs kor és az anyai életkor hasonló volt. A plazma suPAR koncentrációt a suPARnostic Flex ELISA assay segítségével mértem. Az IL-6 szintek megállapításához a Roche Elecsys IL-6 kitet használtam. A CRP szinteket immuno-turbidimetriás módszerrel határoztam meg.

4. A szérum TSP-1 szintek tanulmányozásához, 45 korai kezdetű (EOPE), ill 43 késői kezdetű praeclampsziás (LOPE) terhes nőt, 21 HELLP-szindrómás beteget, 45 egészséges, szövődmenymentes gravidát (HP), valamint 20 nem terhes kontrollt (NP) válogattam be vizsgálatomba. 14 HELLP-szindrómás beteget soroltam a Mississippi II. kategóriába (középsúlyos forma), hetet pedig a III. kategóriába (enyhe forma). A nem terhes kontrollok esetében vérvételre a menstruációs ciklus 5. és 7. napja között került sor. A szérum TSP-1 szinteket egy automata ELISA analizátorral mértem.

5. Az ötödik vizsgálatban, keringő TSP-2, sFlt1 és PlGF mennyiségének meghatározásának céljából, 35 praeclampsziás beteg (közülük 23-nál állt fenn súlyos forma és 18-nál korai kezdetű forma) és 35 egészséges terhes nő vett részt. A szérum TSP-2 automata ELISA analizátor segítségével határoztam meg. A szérum teljes sFlt1

és biológiailag aktív PlGF koncentrációt elektro-kemolumineszcens immunassay technikával, Cobas e 411 analízátorral mértük.

Eredmények

1. Praeclampsziás betegekben, normotenziós, egészséges terhes nőkhöz viszonyítva, szignifikánsan emelkedett keringő CRP (6,11 (1,92–12,12) vs. 3,59 (1,68–7,40) mg/l, $p < 0,05$), VWF:Ag (183,0 (128,7–242,8) vs. 148,4 (106,6–199,0) %, $p < 0,05$), fibronectin (0,58 (0,39–0,82) vs. 0,36 (0,32–0,47) g/l, $p < 0,001$), MDA (18,17 (14,98–20,31) vs. 13,13 (8,38–18,61) nmol/ml, $p < 0,05$) és szabad magzati DNS (0,065 (0,034–0,267) vs. 0,005 (0,0–0,178) pg/ μ l, $p < 0,05$) koncentrációkat találtam. A plazma OPN-koncentrációk azonban nem különböztek szignifikánsan a PE-s és a kontroll csoportban (7,77 (6,60–9,67) vs. 7,40 (6,51–8,80) ng/ml, NS). Praeclampsziás betegekben a plazma OPN szignifikáns pozitív lineáris összefüggést mutatott a plazma fibronectin koncentrációival (Spearman $R = 0,38$; $p < 0,05$). További összefüggéseket ellenben nem találtam a vizsgálatban résztvevők klinikai jellemzői, valamint a vizsgált laboratóriumi paraméterek és a plazma OPN koncentrációk között. Azon praeclampsziás betegekben, akiknek plazma fibronectin koncentrációja a felső kvartilisben volt ($\geq 0,82$ g/l), szignifikánsan magasabb OPN-koncentrációkat találtam, összehasonlítva azokkal, akiknek fibronectin szintje a 75. percentilis alatt volt ($< 0,82$ g/l), illetve az egészséges kontrollcsoporttal (9,38 (8,10–11,99) vs. 7,54 (6,31–9,40) illetve 7,40 (6,51–8,80) ng/ml, $p < 0,05$ mindkét esetben). A PE-s betegek ezen alcsoportjára jellemző volt a súlyos forma magasabb aránya is (9/13 (69,2%) vs. 10/31 (32,3%), $p < 0,05$).

2. A plazma hepcidin-koncentráció emelkedett volt PE-ás gravidák esetében az egészséges terhes nőkkel összehasonlítva (5,68 (0,72–9,25) vs. 3,74 (0,73–8,14) ng/ml, $p = 0,003$). A plazma IL-6 koncentráció szintén magasabb volt PE-ban a kontrollcsoportéhoz képest ($p < 0,001$), bár az IL-6 koncentráció a detektálhatóság szintje alatt volt 28 egészséges és 8 PE-ás grávida esetén. A plazma vas- és ferritin-koncentrációkat szintén magasabbak (19,1 (7,1–51,6) vs. 15,0 (6,8–29,5) μ mol/l, $p = 0,02$ and 34 (5–78) vs. 15 (5–69) μ g/l, $p = 0,003$), míg a plazma transferrin koncentrációkat és a teljes vaskötő kapacitás (TVK) értékeit alacsonyabbnak találtam PE-ás terhes nők

esetében, az egészséges terhes nőkhöz képest (4,1 (2,8–5,7) vs. 4,4 (3,6–6,2) $\mu\text{mol/l}$, $p=0,02$ és 81,2 (55,4–112,9) vs. 87,1 (71,3–122,8) $\mu\text{mol/l}$, $p=0,02$). Nem találtam különbséget a vérkép paramétereiben és a plazma CRP szintekben a vizsgálati csoportok között.

3. A suPAR koncentrációk emelkedését mutattam ki PE-ban, egészséges terhes nőkhöz viszonyítva (3,18 (2,30–4,71) vs. 2,02 (1,81–2,40) ng/ml , $p < 0,001$). Az eredmény nem változott a vérvételkori terhességi korra és anyai életkorra történő adjusztálást (logisztikus regresszió) követően sem. Az IL-6 szintek szintén magasabbak voltak PE-ban, mint a kontrollcsoportban (5,99 (2,97–18,12) vs. 1,41 (1,00–2,70) pg/ml , $p < 0,001$). A plazma IL-6 koncentráció a detektálhatóság szintje alatt volt 1 PE-s és 22 egészséges gravida esetében. A CRP-szintjét szintén magasabbnak találtam PE-ban, mint élettani terhességben (6,60 (3,55–15,40) vs. 3,90 (2,10–7,25) mg/l , $p=0,006$). A lineáris regresszió-analízis pozitív összefüggést mutatott a plazma suPAR és IL-6 szintek között ($R=0,58$, $p < 0,001$), valamint a suPAR és CRP koncentrációk között is ($R=0,29$, $p=0,003$). Nem találtam azonban összefüggést az IL-6 és a CRP szintek között. A fenti összefüggések akkor is jelen voltak, amikor az értékeket külön, a PE-s csoportban vizsgáltam ($R=0,62$, $p < 0,001$ illetve $R=0,27$, $p=0,005$). A ROC-görbe analízise a suPAR esetében 0,83 ROC AUC-értéket mutatott (95% CI: 0,74–0,91, $p < 0,001$), az IL-6 tekintetében az AUC értéke szintén 0,83 volt (95% CI: 0,76–0,92, $p < 0,001$), CRP esetében 0,66 (95% CI: 0,55–0,76, $p < 0,008$).

4. A TSP-1 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak HELLP-szindrómás betegek esetében, összehasonlítva az összes többi vizsgálati csoporttal (93,5 (62,0–103,4) ng/ml vs. EOPE: 141,2 (102,5–177,3) ng/ml , $p=0,006$; LOPE: 138,4 (111,8–158,2) ng/ml , $p=0,008$; HP: 133,4 (106,2–149,8) ng/ml , $p=0,02$; NP: 171,7 (135,1–201,3) ng/ml , $p < 0,001$). A többi csoport között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a TSP-1 szinteket tekintve. Szignifikáns pozitív összefüggés volt kimutatható a TSP-1 szintek és a vérlemezke szám között a PE-s és HELLP-szindrómás csoportokban ($r=0,33$ ill. 0,53, $p=0,002$ ill. 0,01). A súlyosabb HELLP-szindrómás betegekben (Mississippi II. kategória), a TSP-1 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a HELLP-szindróma enyhébb formájában szenvedő nőkhöz viszonyítva

(Mississippi III. osztály) (74,6 (57,0-97,6) vs. 103,4 (87,4-164,2) ng/ml, $p=0,04$). A PE-ban szenvedő betegek esetén azoknál, akiknél trombocitopénia is jelen volt, alacsonyabb TSP-1 szinteket mértem, mint akiknél a normál tartományban volt a vérlemezkeszám (96,2 (62,5-131,1) vs. 145,8 (112,0-171,0) ng/ml, $p=0,004$). Nem volt különbség a TSP-1 koncentrációt illetően a PE egyes alcsoportjai között (enyhe vagy súlyos; korai vagy késői kezdetű), illetve IUGR fennállása, vagy eutróf magzatokat hordozó terhes nők összehasonlításakor sem. Nem tudtam összefüggést kimutatni a TSP-1 szintek és a betegek klinikai jellemzői, valamint rutin laboratóriumi eredményei között. A gesztációs kor vérvétel idején nem korrelált a TSP-1 szintekkel egyik csoportban esetében sem, és az eredmények változatlanok maradtak az erre történt adjusztálást követően is (kovariancia-analízis).

5. A thrombospondin 2 szérumszintek szignifikánsan emelkedettek voltak a praeclampsias csoportban a kontrollcsoporthoz képest [13,2 (9,4–18,1) vs. 7,9 (7,2–11,2) ng/ml, $p<0,001$]. Továbbá szignifikánsan magasabb sFlt1 [9 263 (5 460–16 110) vs. 2 414 (1 448–2 868) pg/ml, $p <0,001$], és alacsonyabb PIGF koncentrációkat [50,9 (27,9–87,4) vs. 220,1 (137,3–339,8) pg/ml, $p <0,001$] mutattam ki a praeclampsias betegek esetében, a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A szérum TSP-2 szintek közötti különbségek szignifikánsak maradtak a két csoport között az életkorra, dohányzásra, primiparitásra és terhesség előtti BMI-re történő adjusztálást (kovariancia-analízis) követően is. Nem tudtam különbséget kimutatni a TSP-2 szintekben a korai és késői kezdetű, illetve az enyhe és súlyos praeclampsias alcsoportokat összehasonlítva. Hasonlóképpen nem találtam eltérést a praeclampsiasok között IUGR fennállása, illetve eutróf magzatok esetén. Nem mutatkozott összefüggés a TSP-2 és az sFlt1, illetve a PIGF szintek között, sem a praeclampsias, sem a kontrollcsoportban. Továbbá a TSP-2 koncentrációk és a betegek klinikai adatai (anyai életkor, terhességi kor vérvételkor, testtömeg-index, dohányzás, paritás) és rutin laboratóriumi paraméterei (fehérvérsejtszám, trombocitaszám, laktát-dehidrogenáz, aszpartát aminotranszferáz, alanin aminotranszferáz, szérum kreatinin) sem volt korreláció a vizsgálati csoportokban.

Következtetések

1. Az osteopontin (OPN) anyai szérumszintje nem különbözik praeclampszában szenvedők és egészséges terhes nők között. Koncentrációi azonban összefüggést mutatnak a keringő fibronectin szintekkel, ami az endotél-sérülés ismert markere praeclampszában. Továbbá, azon PE-s betegekben, akikre kifejezett endotélkárosodás jellemző (magas fibronectin szint), jelentősen magasabb az OPN koncentráció is, és ezen betegek között magasabb a súlyos forma aránya. Azt feltételezzük, hogy kiterjedt endotél-sérülés esetén az OPN a fibronectinnel együtt felszabadul az érfalból, és a perifériás keringésbe kerül. Ezek alapján az OPN az endotélkárosodás biomarkere lehet praeclampszában. Nem találtam összefüggést a PE további patogenetikai folyamatainak (endotélaktiváció, oxidatív-stressz, placentáris törmelék megnövekedett keringő mennyisége) markerei (von Willebrand faktor antigén, malondialdehid, szabad magzati DNS) és az OPN szintek között. Ezek alapján valószínű, hogy ezen folyamatokban az OPN nem játszik lényegi szerepet.

2. A vasanyagcsere szabályozásában közreműködő, akut-fázis fehérje, a hepcidin keringő koncentrációja szignifikánsan emelkedett PE-ban, egészséges terhességhez képest. Ennek háttérében egyrészt a generalizált gyulladós válasz, másrészt a PE-ban észlelt emelkedett szérum vas-koncentráció állhat. Eredményeim azt sugallják, hogy valamilyen okból a hepcidin nem tudja kifejteni vascsökkentő hatását PE-ban. A hepcidin és a vas-homeosztázist jellemző markerek közötti korreláció hiánya arra utalhat, hogy eddig ismeretlen, a terhességre specifikus faktorok, interferálhatnak a hepcidin vascsökkentő hatásával.

3. A szolubilis urokináz plazminogén aktivátor (suPAR) keringő szintje PE-ban magasabb, fiziológiás terhességhez viszonyítva. Eredményeim alapján a suPAR szint a PE-ra jellemző emelkedett gyulladós válasz hasznos indikátora lehet. A plazma suPAR szint összefüggést mutat a klasszikus gyulladós markerek (IL-6 és CRP) szintjeivel. Diagnosztikus hatékonysága a PE-s betegek és egészséges terhes nők gyulladós reakció alapján történő elkülönítésében a CRP-t felülmúlja, az IL-6-tal egyenértékű. Kiváló stabilitási jellemzői miatt a suPAR a terhesség alatti gyulladós állapot jellemzésének hasznos markerévé válhat.

4. Az anti-angiogenetikus, pro-trombotikus és immunmoduláns hatású trombospondin 1 (TSP-1) szérumszintje jelentősen alacsonyabb HELLP-szindrómás betegekben, nem terhes nőkhöz, egészséges várandósokhoz és PE-ban szenvedő betegekhez képest. Ennek oka feltételezésem szerint a véralvadási rendszer általános aktivációja következtében létrejövő konzumpciója. A TSP-1 szint erős összefüggést mutat a vérlemezkeszámmal, ezáltal jól tükrözi a betegség súlyosságát HELLP-szindrómában. Ezzel szemben a TSP-1 szintek változatlanok egészséges terhességben a nem terhes állapothoz képest, valamint PE-ban az egészséges várandósokhoz viszonyítva. Ebből arra következtettem, hogy a keringő trombospondin 1 szintjének változása nem játszik szerepet a terhesség élettani folyamataiban, és nem vesz részt a PE patogenezisében sem. A TSP-1 tehát a HELLP-szindróma hasznos markere lehet.

5. Az anti-angiogenetikus hatású trombospondin 2 (TSP-2) szérumszintje magasabb praeclampszában, fiziológiás terhességgel összehasonlítva. Mivel a TSP-2 termeléséért főként az endotélsejtek felelősek, feltételezésünk szerint ezek PE-ra jellemző aktivációja, vagy sérülése állhat a megfigyelt emelkedés hátterében. Ez feltehetően hozzájárul a keringő angiogenetikus faktorok egyensúlyának anti-angiogenetikus irányba való eltolódásához, PE-ban. A TSP-2 szintek nem mutattak összefüggést a közismert patogenetikai jelentőségű sFlt1 és PlGF keringő szintjeivel. Ez alapján azt feltételezem, hogy a TSP-2 anti-angiogenetikus hatását az sFlt1-től eltérő úton hozza létre, például a vaszkuláris endoteliális sejtek direkt gátlásán, vagy apoptózisuk indukálása révén. A TSP-2 az anti-angiogenetikus túlsúly hasznos biomarkere lehet PE-ban.

Publikációk listája

Doktori értekezéssel kapcsolatos publikációk

1. Toldi G, Biro E, Szalay B, **Stenczer B**, Molvarec A, Rigo J, Vásárhelyi B, Bekő G. (2011) Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in healthy pregnancy and preeclampsia. *Clin Chem Lab Med*. doi: 10.1515/CCLM.2011.656. (IF: 2,069)
2. **Stenczer B**, Molvarec A, Veresh Z, Gullai N, Nagy GR, Walentin S, Szijártó J, Rigó J. (2011) Circulating levels of the anti-angiogenic trombospondin 2 are elevated in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. doi:10.1111/j.1600-0412.2011.01220.x. (IF: 1,860)
3. Toldi G, **Stenczer B**, Molvarec A, Takats Z, Beko G, Rigo J, Jr., Vasarhelyi B. (2010) Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. *Clin Chem Lab Med*, 48:1423-1426. (IF: 2,069)
4. **Stenczer B**, Rigo J, Jr., Prohaszka Z, Derzsy Z, Lazar L, Mako V, Cervenak L, Balogh K, Mézes M, Karádi I, Molvarec A. (2010) Plazma osteopontin concentrations in preeclampsia - is there an association with endothelial injury? *Clin Chem Lab Med*, 48:181-187. (IF: 2,069)

Egyéb publikációk

1. Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, Toldi G, **Stenczer B**, Szarka A, Nakashima A, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. (2011) Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 91:56-63. (IF: 2,204)
2. Szabo G, Molvarec A, **Stenczer B**, Rigo J, Jr., Nagy B. (2011) Natriuretic peptide precursor B gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta*, 412:1371-1375. (IF: 2,388)
3. Toldi G, Rigo J, Jr., **Stenczer B**, Vasarhelyi B, Molvarec A. (2011) Increased Prevalence of IL-17-Producing Peripheral Blood Lymphocytes in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 66:223-229. (IF: 2,451)
4. Molvarec A, Blois SM, **Stenczer B**, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. (2011) Peripheral blood galectin-1-

expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol*, 139:48-56. (IF: 3,932)

5. Molvarec A, Ito M, Shima T, Yoneda S, Toldi G, **Stenczer B**, Vasarhelyi B, Rigo J Jr, Saito S. (2010) Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 203:567 e1-8. (IF: 3,313)

6. Toldi G, **Stenczer B**, Treszl A, Kollar S, Molvarec A, Tulassay T, Rigó J, Vásárhelyi B. (2011) Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 65:154-163. (IF: 2,451)

7. Bohacs A, Cseh A, **Stenczer B**, Muller V, Galffy G, Molvarec A, Rigó J, Losonczy G, Vásárhelyi B, Tamási L. (2010) Effector and regulatory lymphocytes in asthmatic pregnant women. *Am J Reprod Immunol*, 64:393-401. (IF: 2,451)

8. Tamasi L, Bohacs A, Tamasi V, **Stenczer B**, Prohaszka Z, Rigo J, Jr., Losonczy Gy, Molvarec A. (2010) Increased circulating heat shock protein 70 levels in pregnant asthmatics. *Cell Stress Chaperones*, 15:295-300. (IF: 3,162)

9. Toke J, Patocs A, Balogh K, Gergics P, **Stenczer B**, Racz K, Toth M. (2009) Parathyroid hormone-dependent hypercalcemia. *Wien Klin Wochenschr*, 121:236-245. (IF: 0,955)

10. Molvarec A, Kalabay L, Derzsy Z, Szarka A, Halmos A, **Stenczer B**, Arnaud P, Karadi I, Prohászka Z, Rigo J Jr. (2009) Preeclampsia is associated with decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein (fetuin-A) concentration. *Hipertens Res*, 32:665-669. (IF: 2,426)