Egyes lepényi jelátviteli utak vizsgálata praeeclampsiában és HELLP szindrómában, különös tekintettel a leptin és a leptin receptor közötti kapcsolatra

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: **Dr. Várkonyi Tibor**

Témavezető: **Dr. Nagy Bálint**
Konzulens: **Dr. Than Nándor Gábor**

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
(Vezető: Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanár)

2/2. Magzati és újszülöttkori orvostudomány akkreditált (Ph.D) program
(Programvezető: Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár)

Hivatalos bírálók: Dr. Molnár Mária Judit egyetemi docens
Dr. Ugocsai Gyula osztályvezető főorvos

A Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Szende Béla professzor emeritus
A Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Nagy Sándor osztályvezető főorvos
Dr. Tóth Sára egyetemi docens

Budapest
2011.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3

1. BEVEZETÉS 5

1.1. A lepény szerepe a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában.....5

1.2. Endokrinológiai és immunológiai változások preeclampsiában és HELLP szindrómában.....7

1.3. A HELLP szindróma epidemiológiája 9

1.4. Genetikai, genomikai diagnosztikai vizsgálatok HELLP szindrómában 10

2. CÉLKITŰZÉSEK 12

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 13

3.1. Beteganyag 13

3.1.1. Praeeclampsiás, HELLP szindrómás és kontroll terhesek genomikai vizsgálati csoportjai 13

3.1.2.1. Leptin gén (LEP) hosszpolimorfizmus (STR) elemzésének csoportja.....14

3.1.2.2. Leptin receptor gén (LEPR) egynukleotidos génpolimorfizmus (SNP) analízis vizsgálati csoportja 15

3.2.1. Lepényszöveti minták gyűjtése 15

3.2.1.1.1. RNS izolálása lepény szövetből és annak DNS-chipen történő teljes genom oligonukleotid expressziós analízise 16

3.2.1.1.2. Expressziós eredmény validálása kvantitatív valós idejű PCR módszerrel 20

3.2.1.2. Lepényszövet TMA (tissue microarray) fehérje expressziós vizsgálata 23

3.2.2. Genomiális DNS izolálása perifériás vérből 26

3.2.2.1. Leptin (TTTC)n hosszpolimorfizmus kimutatása kvantitatív fluoreszcens rendszerrel 27

3.3.2.2. Leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus meghatározása valós idejű PCR és olvadásgörbe analízissel 28

3.3.1.1.1. Génexpressziós vizsgálathoz felhasznált statisztikai módszerek 31

3.3.1.1.2. Génexpresszió validálására használt kvantitatív valós idejű PCR során alkalmazott statisztikai módszerek 32

3.3.1.2. Lepényszöveti fehérjeexpressziós vizsgálatnál alkalmazott statisztikai módszerek.....33

3.3.2.1. Leptin hosszpolimorfizmus elemzésben felhasznált statisztikai módszerek.....33
3.3.2.2. Leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus vizsgálatában alkalmazott statisztikai eljárások.....33

4. EREDMÉNYEK.....35
4.1.1.1. Lepényszöveti génexpressziós vizsgálat normál és kóros terhességben.....35
4.1.1.2. A kora praeeclampsia és HELLP szindróma vizsgálata során kapott microarray eredmények validálása kvantitatív valós idejű PCR rendszerrel.....47
4.1.2. Szöveti microarray fehérjeexpressziós vizsgálat analízise.....49
4.2.1. Leptin gén (TTTC)n hosszpolimorfizmusának populációs megoszlása HELLP szindrómás, praeeclampsiás és kontroll terhesek közt.....53
4.2.2. Leptin receptor gén egynukleotidos génpolimorfizmus megoszlása egészséges és HELLP szindrómás betegek közt.....56

5. MEGBESZÉLÉS.....61
5.1.1. Lepényi génexpresszió praeeclampsiában és HELLP szindrómában.....61
5.1.2. Fehérjeexpressziós vizsgálat syncytiotrophoblaston.....65
5.2. A leptin szerepe preeclampsiában és HELLP szindrómában.....65

6. KÖVETKEZTETÉSEK.....69

7. ÖSSZEFOGLALÁS.....70

8. SUMMARY.....71

9. IRODALOMJEGYZÉK.....72

10. SAJÁT PUBIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....89
10.1. Az értekezés témájával összefüggő saját közlemények jegyzéke.....89
10.2. További saját közlemények jegyzéke.....89
10.3. Egyéb idézhető absztrakt.....91

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....92

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALT: alanin-aminotranszferáz

AST: aszpartát-aminotranszferáz

Bp: bázispár

CD: csoportot megkülönböztető tulajdonság

CVS: chorionboholy-minta

cDNS: komplementer DNS

cRNS: komplementer RNS

DNS: dezoxiribonukleinsav

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

FDR: hamis találati arány

hCG: humán choriális gonadotropin

HELLP szindróma: hemolízis, emelkedett májenzimek, csökkent vérlemezkeszám

HLA: humán leukocyta antigén

IDO: indolamin 2,3-dioxigenáz

IL: interleukin

IUGR: méhen belüli retadáció

KEGG: Kyoto-i genetikai adatbázisrendszer

LDH: laktát-dehidrogenáz

LEPR: leptin receptor

MBL: mannóz-kötő lektin

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex

MTFR: metiléntetrahidrofolát-reduktáz enzim

NK sejt: természetes ölő sejt

PCR: polimeráz-láncreakció

PE: praeeclampsia

RFLP: restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus

RIN: RNS integritását jellemző szám

RNS: ribonukleinsav

SNP: egynukleotidos génpolimorfizmus

STR: rövid ismétlődési egységek, mikroszatellita

TaqMan: PCR kimutatási módszer

Th2: T-helper 2

TMA: szöveti microarray

TNF-α: tumor nekrózis faktor-α

VEGF: vasculáris endotheliális növekedési faktor

1. BEVEZETÉS

1.1. A lepény szerepe a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában

A humán terhességben az ovulációt követő 3-4. napon a szedercsíra megkezdi a beágyazódását a méh falába, a szedercsíra trophoblastsejtjeiből pedig a terhesség 7. napjától fokozatosan kifejlődik a méhlepény, mely direkt kapcsolatot teremt az anya és magzata között a tápanyag és a gázcsere hatékonyabb ellátását biztosítva [1,2]. A villózus trophoblastsejtek a lepényi bolyhok felszínén két réteget alkotnak: a belső rétegben a folyamatosan proliferáló cytotrophoblast sejtek biztosítják az utánpótlást a külső rétegben elhelyezkedő, többmagvú, a cytotrophoblast sejtekből fúzióval és differenciációval létrejövő syncytiotrophoblastnak, mely a 11. terhességi hét körül direkt kapcsolatba kerül az anyai keringéssel az intervillózus térben [3,4]. Ezen differenciációs folyamat szabályozása még részleteiben nem ismert, hasonlóképpen ahhoz a differenciálódási folyamathoz, melynek eredményeképpen a cytotrophoblast sejtek egy csoportja (extravillózus cytotrophoblast) invazív fenotípust nyer és a syncytiotrophoblast réteget áttörve először a decidua, majd pedig a myometrium belső harmadát és a méhben lévő spirális artériák falát is beszövi [5,6].

Egészséges körülmények között ezen extravillózus trophoblast inváció során a cytotrophoblastsejtek bejutnak a spirális artériák középső rétegébe (tunica media) és annak szerkezetét – az anyai NK sejtek együttműködése mellett – megváltoztatják. Ezen folyamat következményeként csökken a spirális artériák ellenállása és vasomotoros kontrollja, azt eredményezve, hogy a fejlődő lepény és az anyai felszín között lévő intervillózus tér vérellátottsága megnő [7,8]. A cytotrophoblast sejt syncytiotrophoblasttá, illetve invazív cytotrophoblasttá differeciálódása, majd utóbbi migrációja egy többkomponensű szabályozási rendszer része, mely transzkripciós szinten szabályozott [9,10]. Ezen rendszerben bekövetkező szabályozási hibák a lepény elégtelen funkciójához vezethetnek. A trophoblast differenciációt genetikai tényezőkön kívül befolyásolhatja a környezet, az extracelluláris struktúra és környezeti hatások (pl. a lepény oxigénellátottsága) is. Tényként ismerjük, hogy például a lepény túl korai vérellátottsága (a relatíve magas parciális nyomású oxigén korai jelenléte miatt) gátolja a megfelelő mélységű trophoblast infiltrációt, mely a lepény fejlődésére negatív hatással

van [11]. Több ismeretlen eredetű terhességi kórkép, mint például praeeclampsia, HELLP szindróma, és gestatios diabetes hátterében is elégtelen trophoblastinváziót figyeltek meg [12-15]. Pontosan nem ismerjük ezen kórképek lepényi patofiziológiai történéseit, azonban az egyre nyilvánvalóbb, hogy némiképpen hasonló, de részleteiben eltérő lepényi kórfolyamatok játszódnak le a korai- illetve késői- praeeclampsia, HELLP szindróma, valamint a méhen belüli magzati retardáció kialakulásának hátterében [16-21].

A korai praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulása a jelenleg legáltalánosabban elfogadott modell szerint a terhesség korai szakaszára tehető, amikor is elégtelen a lepény fejlődése, és ennek következményeképpen egy második lépcsőben alakul ki a praeeclampsia klinikai tüneteihez vezető generalizált endothel aktiválódás [22]. Ezen modell szerint a korai praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásának meghatározó tényezője az elégtelen extravillózus trophoblast invázió és ennek következtében kialakuló elégtelen lepényi adaptációs mechanizmus. A spirális artériák „remodelling”-je ezen betegségekben jelentősen csökkent, nagyobb mértékben, mint például magzati retardáció esetében. Ennek következtében gyakoribb és fokozottabb patológiás elváltozások figyelhetők meg az érintett lepényekben: például akut sclerotikus elfajulása a tunica mucosának, hyalin szerű depozitumok, habos sejtek az artéria falában és fibrinnel elzárt területek a lepényszövetben [19,21,23]. Az elégtelen spirális artéria remodelling károsan befolyásolja a lepény szerkezetét és működését. A csökkent rezisztenciájú, folyamatos intervillózus áramlással szemben egy pulzatilis, turbulens lepényi áramlás keletkezik az intervillózus térbe benyíló spirális artériákban „jet”-szerű áramlásának következtében, mely károsítja a lepényszövet szerkezetét [24,25]. A szöveti sérülés mellett, a lepényt érő ingadozó oxigénellátottság endoplazmatikus stresszt okoz, csökkentve a trophoblastsejtek fehérjeszintetizációját és osztódási képességét, fokozva apoptózisuk mértékét, minek eredményeképpen csökken a lepény tömege és a magzati súly [26]. Ezen kórfolyamatok hatására a lepény anti-angiogenikus faktorokat termel, melyek bekerülnek az anyai keringésbe, és ott szisztémás gyulladásos reakciót, endothelsérülést okoznak, mely a praeeclampsia és az ezzel szövődött HELLP szindróma klinikai tüneteinek kialakulásához vezet [27].

1.2. Endokrinológiai és immunológiai változások preeclampsiában és HELLP szindrómában

A terhesség első trimeszterében lezajló elégtelen lepényi adaptáció alapjaként több kórtani folyamatot gyanítanak [20,28-31], melyeknek endokrin vagy immunológiai háttere lehet:

Endokrinológiai tényezők:

A lepény a terhesség fenntartásában meghatározó szereppel bíró hormonok termelődésének szerve. A syncytiotrophoblast termeli a humán choriális gonadotropint (hCG), mely az utolsó menstruációt követő 25.-27. napban jelenik meg az anyai keringésben és többek között fontos szerepet tölt be a sárgatest fenntartásában, amíg a nagymértékű lepényi progeszteron-termelés be nem indul [2]. A syncytiotrophoblast biztosítja továbbá az emelkedett terhességi ösztrogén szinteket is, és ezen sejtben termelődik a humán placentáris laktogén és leptin is [32-35]. Ezen hormonok emelkedett szintjei az anyai keringésben az anya szervezetének a terhességhez való metabolikus és endokrinológiai alkalmazkodását, a terhesség sikeres kiviselését biztosítják [36].

Bemutatandó eredményeim szempontjából kiemelkedő, hogy a terhesség első felében mind a humán choriális gonadotropin béta alegység [37-40], mind pedig a leptin [41-46] koncentrációi az anyai keringésben emelkedettek, a humán placentáris laktogén mennyisége viszont az anyai keringésben csökkent azoknál, akiknél később a terhesség során praeeclampsia alakul ki [47]. Ezek alapján felvetődött, hogy a praeeclampsia hátterében a metabolikus szabályozás zavara (is) fennállhat [48,49].

Immunológiai tényezők:

Medawar vetette fel először a terhesség során fellépő immunológiai paradoxont [50], miszerint az anyai szervezet nem löki ki a számára fél-idegen, apai antigéneket hordozó ébrényt. Hovatovább, a lepény ugyan elhatárolja a magzati és az anyai keringést, mégis van sejtmozgás a két szervezet keringése között [51,52]. Ma már tudjuk, hogy az anyai immunrendszer a terhesség során aktív szerepet tölt be az anyai- és magzati szervezet kapcsolatában [53,54]. A kialakuló immuntolerancia fennmaradásának feltétele a szedercsíra beágyazódását és a lepény fejlődését elősegítő, lokális és szisztémás

immunológiai adaptáció, melyben a fentebb említett lepényi hormonok közül a humán choriális gonadotropin is meghatározó szerepet játszik [55-58].

A humán choriális gonadotropin termelődése a blastocysta stádiumban indul meg a trophoblastsejtekben, és hatásmódját sokfajta sejttípuson és szövetben, elsősorban saját, illetve az LH receptorán keresztül fejti ki [59-62]. A hCG alapvető hatással van a terhesség alatti immunológiai változásokra: fokozza a komplement C3 és C4 endometriális expresszióját, ezzel növelve a fagocitózist [63]; fokozza az aktivált dendritikus sejtek MHC II. expresszióját valamint az IL-10 expressziót és növeli a lepényben az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) aktivitását, melyek hatásaként csökken az anyai T sejtek proliferációs képessége [64]; fokozza az endometrium sejtek Fas/Fas-ligand expresszióját, azok apoptózisát indukálva [56]. Ezen hatások összességében az anya immunrendszerét adaptálják a terhes állapothoz. Mindemellett a hCG csökkenti a vasokonstriktor hatású eikosanoidok termelődését az uterus endothel sejtjeiben, és segíti az új erek képződését, ezzel is javítva a lepény vérellátását [55].

A leptin magzati expressziója már a blastocysta stádiumban megjelenik. Összekötő molekulának tartják a neuroendokrin rendszer és az immunrendszer között a terhesség alatt: fokozza a hCG termelődését és az extracelluláris fehérjék szintézisét a lepényben, valamint a várandós nőkben mobilizálja a zsírraktárakat [65,66]. Anyai szérumszintjei a terhesség során végig emelkedettek a nem terhes állapothoz képest, praeeclampsia esetén pedig jóval a klinikai tünetek kialakulása előtt emelkedett leptinszinteket detektáltak az anyai keringésben. A praeeclampsiában mért emelkedett anyai leptin szintek oka jelenleg még felderítésre vár, az azonban tudott, hogy a vérlemezke membránon elhelyezkedő receptorán keresztül a endothél sérülést követő thrombus kialakulást befolyásolhatja [67], ami HELLP szindróma kialakulása esetén releváns.

A helyi immunológiai folyamatok közül kiemelendő még, hogy a syncytiotrophoblast direkt kapcsolatba kerül az anyai keringéssel, az extravillózus trophoblast pedig a lepényágyban található nagy mennyiségű anyai fehérvérsejttel, mégsem lökődnek ki. Magyarázatként szolgál, hogy a trophoblast sejtek nem expresszálnak klasszikus I. osztályú, nagy polimorfizmust mutató MHC molekulákat (HLA-A és -B), viszont expresszálnak nem klasszikus HLA molekulákat (HLA-G, -E), így nem kerülnek az NK sejtek citotoxikus immunválaszának célpontjává [68,69]. Továbbá, a HLA-G molekulával kontaktusba kerülő anyai citotoxikus T sejtekben az extravillózus

trophoplast sejtek CD95 expressziót indukálnak, mely következtében kiszelektálódik az apai antigéneket felismerő és az ellen celluláris immunitást kiváltó lymphocyta populáció [70]. Annak ellenére, hogy a terhesség előrehaladtával az anyai immunrendszert az első trimeszterhez képest körülbelül 10-szeres magzati antigéninger (sHLA-DR) éri [71], az anyai szervezet nem támadja meg a fejlődő utódját: ebben a szabályozásban központi szerepet tulajdonítanak egy regulátor típusú (CD4+) T sejtcsoportnak [72]. Ezen sejtek egy szubpopulációjának mennyiségi változása volt megfigyelhető praeeclampsiában [73]. A szisztémás immunregulációs mechanizmusok következtében az egészséges terhességekben csökken a celluláris immunitás és fokozódik a humorális immunválasz, az anyai keringésben pedig a citokin koncentrációk változása a TH2 túlsúlyt segíti elő [74,75]. Felvetették, hogy praeeclampsiában csökkent az anyai immunrendszert érő magzati antigén stimulus mértéke, és ennek következtében az indukált immuntolerancia elégtelen [71]. Érdekes, hogy praeeclampsiában az anyai keringésben csökkent mennyiségű szolubilis HLA-G mokelulát detektáltak, de emelkedett szinteket HELLP szindrómában [76].

1.3. A HELLP szindróma epidemiológiája

A HELLP szindróma (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet) a praeeclampsia súlyos, életet veszélyeztető formája. A terhesség során fellépő súlyos kórkép a tudományos irodalomban 1954-ben (Pritchard) került dokumentálásra [77], amelyben három eset észlelését dokumentálták. Külön diagnózisként - Weinstein után - 1982-től használják [78,79].

Az európai populációban a terhességek 0,5-0,9%-ában fordul elő HELLP szindróma [80]. A súlyos praeeclampsiával szövődött terhességek 10-20%-ában található [80]. A HELLP szindrómával szövődött terhességek 10%-a a 27. hét előtt, 70%-a a 27-37. hét között és 20%-a a 37. hét után jelentkezik [81]. A betegség egyik formája az úgynevezett post-partum, azaz a szülést követően kialakuló HELLP szindróma. Főleg a praeeclampsiás nők közt jelentkezik a szülést követő 48 órán belül. Az esetek többségében a HELLP szindróma súlyos vagy közepes fokú magas vérnyomással és/vagy fehérjevizeléssel jár, de 10-20%-ban ezen klinikai tünetek hiányoznak.

Tünetként megtalálható még a fokozott súlygyarapodás, valamint az általános vizenyő a betegek több mint felében [80].

A HELLP szindróma diagnózisa laboratóriumi paraméterek alapján történik:
Hemolízis: A hemolízis a legnehezebben diagnosztizálható, de jó laboratóriumi markernek tekinthető: az emelkedett indirekt bilirubin és az alacsony haptoglobin szint, vagy a vérből készített kenetben a schistiocita sejt vagy Burr sejt diagnosztikus értékű [82]. Sibai az emelkedett indirekt bilirubin szintet és a magas laktát dehidrogenáz (LDH) szintet javasolta a hemolízis indikátorának [83]. A legérzékenyebb marker a csökkent haptoglobin szint [79,82].
Emelkedett májenzim értékek: A magas szérum aszpartát-aminotranszferáz (AST) és magas alanin-aminotranszferáz (ALT) jelzi a májsejtek sérülését, és gyakran kapcsolódik az epigasztriális régióban érezhető fájdalommal [84].
Alacsony thrombocytaszám: Jelenleg nem pontosan elfogadott hogy milyen mértékű vérlemezkeszámot tekintsünk kórosnak [79]. A thrombocytopénia, mint a HELLP szindróma súlyosságát prognosztizáló laboratóriumi marker, kétféle osztályozása alakult ki (1. táblázat): a Tennessee osztályozás szerint 100 000/mm^3 alatt nevezzük kórosnak a laboreredményt, illetve a Mississippi hármas osztályzás szerint már 150 000/mm^3-t elérve pozitív a laborteszt a HELLP szindrómára [79,85,86].

1. táblázat Thrombocytaszám klinikai beosztása HELLP szindrómában a Mississippi- és a Tennesse osztályozás szerint

Thrombocytaszám	Mississippi osztályozás	Tennessee osztályozás
100 000/mm^3 - 150 000/mm^3	III. típus	negatív
50 000/mm^3 - 100 000/mm^3	II. típus	pozitív
< 50 000/mm^3	I. típus	pozitív

1.4. Genetikai, genomikai diagnosztikai vizsgálatok HELLP szindrómában

Az irodalom több anyai szövetekben expresszálódó fehérje, mint például a vasculáris endotheliális növekedési factor (VEGF) génjének mutációját vagy pedig a metiléntetrahidrofolát-reduktáz enzim (MTHFR) génjének mutációját hozza kapcsolatba

a HELLP szindróma kialakulásával [87-89]. Emellett több magzati genetikai faktort is leírtak, mint a betegség kialakulásában szerepet játszó esetleges tényezőt, például a mannóz-kötő lektin génjének polimorfizmusát [90]. Ezen bíztató próbálkozások ellenére is a HELLP szindróma korai diagnózisa jelenleg még nem megoldott, korai prognosztikus markerek nem ismertek, egyedül Grill és mtsai összefoglaló közleményében említ egy endoglin nevű fehérjét mint lehetséges marker a betegségben [91]. A HELLP szindróma kialakulásának hátterében lezajló lepényi patofiziológiai folyamatok pedig egyáltalán nem kiderítettek, a teljes genom lepényi expressziójának vizsgálatára HELLP szindrómában még nem került sor. Microarray vizsgálatok során pedig többezer RNS molekula egyidejű elemzésére nyílik lehetőség, utat nyitva a komplex betegségek hátterében álló kóros sejtszintű szabályozási folyamatok megismeréséhez, esetleges új diagnosztikus, prognosztikus markerek azonosításához [20,92], valamint a kóros génműködés hátterében megbúvó esetleges gén/fehérje szerkezeti eltérések felfedezéséhez [93].

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A fentiek alapján célkitűzésem a praeeclampsiában és HELLP szindrómában eltérő expresszivitást mutató gének teljes genomszintű meghatározása a méhlepényben, valamint, az ezen szindrómákban megváltozott lepényi jelátviteli útvonalak felderítése.

1.1.1. Ennek érdekében célom optimalizálni a lepényből történő RNS izolálási technikát, hogy megfelelő minőségben és hatékonyságban lehessen a microarray vizsgálatokhoz az RNS-t kinyerni, meghatározni a kóros és egészséges terhességből származó lepényben az eltérő aktivitású géneket, és ezen gének elemzése alapján megvizsgálni az eltérő lepényi jelátviteli utakat korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában.

1.1.2. Valós idejű PCR-rel ellenőrizni a praeeclampsiában és HELLP szindrómában microarray-n legnagyobb expressziós különbséget mutató gének aktivitását.

1.2. Két gén (luteinizáló hormon, humán choriális gonadotropin béta alegységek) esetében célom megvizsgálni, hogy a detektált fokozott lepényi génexpresszió korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában fehérjeszinten is megfigyelhető-e.

2. Célom a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásához vezető esetleges genetikai hajlam meghatározása a génexpressziós vizsgálatokban legmarkánsabban eltérő leptin gén esetén.

2.1. Ennek érdekében megvizsgálom, hogy a leptin gén promoter régiójában található mikroszatellita polimorfizmus anyai hordozása használható-e genetikai prognosztikus markerként a HELLP szindróma és a praeeclampsia előrejelzésében.

2.2. Beállítottam a leptin jelátviteli útban fontos szerepet játszó leptin receptor gén kódoló egynukleotidos génpolimorfizmusainak meghatározását valós idejű PCR, olvadási görbe analízissel, hogy felderítsem, használható-e genetikai prognosztikus markerként a HELLP szindróma előrejelzésében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Beteganyag

3.1.1. Praeeclampsiás, HELLP szindrómás és kontroll terhesek genomikai vizsgálati csoportjai

A lepényi vizsgálatokhoz a mintákat a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján gyűjtöttem 2007 és 2009 között. A terhességi kor a 8-12. hétben történő ultrahang-szűrővizsgálat szerint került meghatározásra. A többes terhességek, fejlődési rendellenesség vagy kromoszóma-rendellenesség diagnózisával terhelt terhességek kizárásra kerültek. A vizsgálat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történt. A részletes betegtájékoztatást követően minden résztvevő beleegyező nyilatkozatot írt alá. A betegek adatait a vizsgálatok során végig anonim módon kezeltem.

A vizsgálatban részt vett várandósok a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Szülőszobáján kerültek kiválasztásra. A következő csoportokat határoztam meg:

- Érett kontroll
- Korai kontroll
- Korai praeeclampsia
- Késői praeeclampsia
- Korai HELLP szindróma

Érett kontrollok anamnézisében nem volt a jelen terhességet befolyásoló orvosi vagy szülészeti komplikáció. Az újszülött elektív császármetszéssel jött világra (korábbi császármetszés, vagy harántfekvés miatt), és súlya megegyezett az azonos terhességi hétre született magyar újszülött populáció átlagos súlyával [94].

A korai kontroll csoportba azon várandósok kerültek, akiknél a szülés fájástevékenység vagy idő előtti burokrepedés következtében indult meg, a terhesség a nem megfelelő

tartási helyzet miatt császármetszéssel került lezárásra a terhesség 35. hete előtt és a koraszülés okaként utólag nem volt megtalálható semmilyen klinikai vagy patológiai jele a chorioamnionitisnek.

Korai praeeclampsiás eseteket a következőképp határoztam meg: újonnan kialakult magasvérnyomás a terhesség 20. és 35. hete között (szisztolés vagy diasztolés vérnyomás ≥140mmHg vagy ≥90mmHg, két egymástól eltérő időpontban mérve (4 óra- 1 hét különbséggel) fehérjevizeléssel párosulva (≥300mg a 24 órás vizeletgyűjtés során, vagy két különböző vizelet mintavétel során (4 óra- 1 hét különbséggel) ≥1+ indikátor csíkkal, vagy indikátor csík mérése során ≥2+ fehérje).

Késői praeeclampsia esetén a praeeclampsiára jellemző klinikai tünetek kialakulása a 35. terhességi hetet követően jelentkezett.

A korai HELLP szindrómás csoportba azon esetek kerültek, akiknél az alábbi tünetek jelentkeztek: hemolízis (szérum LDH >600IU/l), emelkedett májenzim szint (szérum alanin-amionotranszferáz (ALT) és/vagy aszpartát-aminotranszferáz (AST) >70IU/l), és thrombocytopénia (vérlemezkeszám < 150 000/mm^3), melyek a terhesség 20-35 hete között alakultak ki.

A terhesség a betegcsoportokban császármetszéssel került lezárásra.

3.1.2.1. Leptin gén (LEP) hosszpolimorfizmus (STR) elemzésének csoportja

A retrospektív vizsgálatot a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján korábban gyűjtött mintaanyagból végeztem. A vizsgálathoz használt kóros minták jelentős átfedésben voltak a leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus vizsgálatban használt DNS mintákkal. A vizsgálat során három csoportot különítettem el: egészséges terhesek (n=88), súlyos praeeclampsiás (n=79) és HELLP szindrómán átesett terhesek (n=77). A vizsgált esetek csoportosításának feltételrendszere megegyezett a leptin receptor vizsgálatnál alkalmazott kritériumrendszerrel.

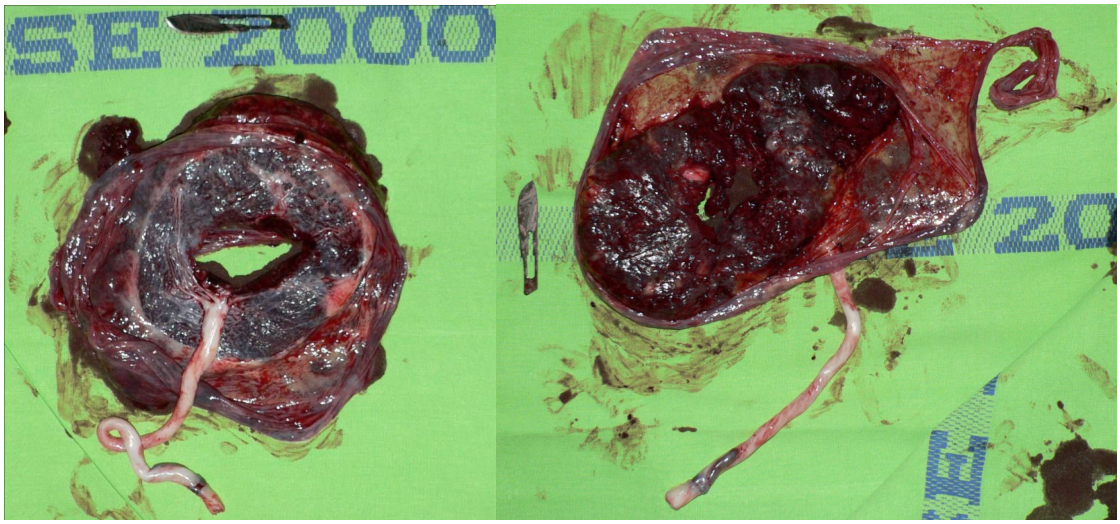
3.1.2.2. Leptin receptor gén (LEPR) egynukleotidos génpolimorfizmus (SNP) analízis vizsgálati csoportja

A retrospektív vizsgálatban a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján HELLP szindrómával kezelt nőket (n=75) és egészséges terhességet kiviselt várandós nőket (n=83) hasonlítottam össze. A csoportba sorolás az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium ajánlása szerint történt [95]. Az esetet akkor tartottam HELLP szindrómásnak, ha a betegségre jellemző laboratóriumi eltérések kimutathatóak voltak: a hemolízis, emelkedett laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás (>600IU/l) mint a hemolízis indikátora; emelkedett májenzimek: emelkedett aszpartát-aminotranszferáz és alanin-aminotranszferáz aktivitás (>70IU/L); és alacsony thrombocytaszám (≤150 000 trombocyta/mm^3) jelentkezett. Az előbbi paraméterek alapján osztályoztam a súlyosságukat. Az összes HELLP szindrómás betegnél megtalálhatóak voltak a praeeclampsia diagnosztikai kritériumai: a vérnyomás két alkalommal (két mintavétel között legalább 6 óra elteltével) meghaladta a 140/90mmHg-t, proteinuriával együtt (≥0,3g/24h), amely a 20. terhességi hét után jelentkezett a korábban normál vérnyomású nőknél. Az újszülöttet akkor tekintettem növekedésben retardáltnak, ha a terhességi korral megegyező születési súly az átlag 10 percentil alatt volt [94].

A vizsgálat a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével készült.

3.2.1. Lepényszöveti minták gyűjtése

A génexpressziós vizsgálathoz a lepénymintákat centrális cotyledókból vágtam ki, melyek közvetlenül a köldökzsinórnál helyezkedtek el. Ezzel próbáltam kiküszöbölni, hogy a lepény különböző területein korábban leirt heterogén génexpresszió befolyással legyen az eredményre [96,97] (1. ábra). A centrális cotyledót szárazjégen egyszerhasználatos steril szikepengével vágtam ki, steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe raktam és -80°C-on tároltam. A lepény többi részét 10%-os formalinba raktam a patológiai feldolgozáshoz.



1. ábra Centrális cotyledóból kivágott lepényminta

A szöveti-microarray (TMA) vizsgálatra öt reprezentatív szövettani blokk volt indítva minden formalinban fixált lepényből, azok centrális területéből, a perifériás cotyledóból és a lepény anyai oldaláról. A blokkok paraffinba voltak ágyazva.

A lepénymintákat a patológiai feldolgozás szabályai szerint voltak megvizsgálva. A vizsgálók nem ismerték a mintákhoz tartozó klinikai jellemzőket. A minták morfológiája és a makroszkópos elváltozások leírásra kerültek. Négy μm vastagságú metszetek készítése történt minden egyes szövettani blokkból (n=110), és SuperFrost/Plus lemezre (Fisherbrand, Loughborough, UK) voltak rakva a különböző core-okat tartalmazó blokkok. A deparaffinálást és rehidrációt követően a lemezek meg voltak festve hematoxilin-eozinnal és azok értékelésre kerültek tíz random kiválasztott mikroszkópos látótért vizsgálata alapján. A makroszkópos és a mikroszkópos elváltozásokat korábban közölt [98] kritériumok szerint voltak értékelve, jellemezve és elemezve.

3.2.1.1.1. RNS izolálása lepény szövetből és annak DNS-chipen történő teljes genom oligonukleotid expressziós analízise

Teljes RNS izolálása:

A szövetek homogenizálására, a sejtek feltárására Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Illkirch, France) kerámia gyöngyöket használtam Thermo Savant FastPrep FP120

homogenizátor készülékkel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A homogenizált szövetből a teljes RNS tisztítására ezután RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) oszlopos tisztítási rendszert alkalmaztam.

Az izolálás menete röviden: A homogenizált szövethez 300µl RLT Puffert mértem, majd az oldatot 590µl RNáz mentes vízzel higítottam fel. Ezután 10µl proteináz K oldatot mértem bele, majd 55ºC-on 10 percig inkubáltam. Az inkubálást centrifulálás követte (3 perc, 10000 x g). A felülúszóhoz ezt követően egy új Eppendorfban 450µl etanolt (96-100%) mértem. Az elegyet RNeasy oszlopon centrifugáltam keresztül (15 másodperc, 8000 x g). Az oszlopra ezután 350µl RW1 Puffert mértem, majd azt átcentrifugáltam rajta (15 másodperc, 8000 x g). Ezt követően 80µl DNáz I. keveréket (70µl RDD puffer + 10µl DNáz törzsoldat) mértem az oszlopra, és arra a 15 perc inkubálást követően 350µl RW1 Puffert mértem. Az oszlopot centrifugáltam (15 másodperc, 8000 x g), majd arra 500µl RPE Puffert mértem. Centrifugálás után (15 másodperc, 8000 x g) a bemérést újra megismételtem 2 perces centrifugálási idővel. Az oszlophoz kötődött teljes RNS-t ezután 40µl RNáz mentes vizzel oldottam le (1 perc, 8000 x g).

A tisztított RNS mennyisége NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométeren volt megmérve. Az RNS mintában lévő szennyeződések, fehérjék befolyásolják az array eredményét. Ezek a komponensek különböző hullámhosszon abszorbciós maximummal rendelkeznek:

A230 nm fehérjék (peptid kötések abszorpciós maximuma)

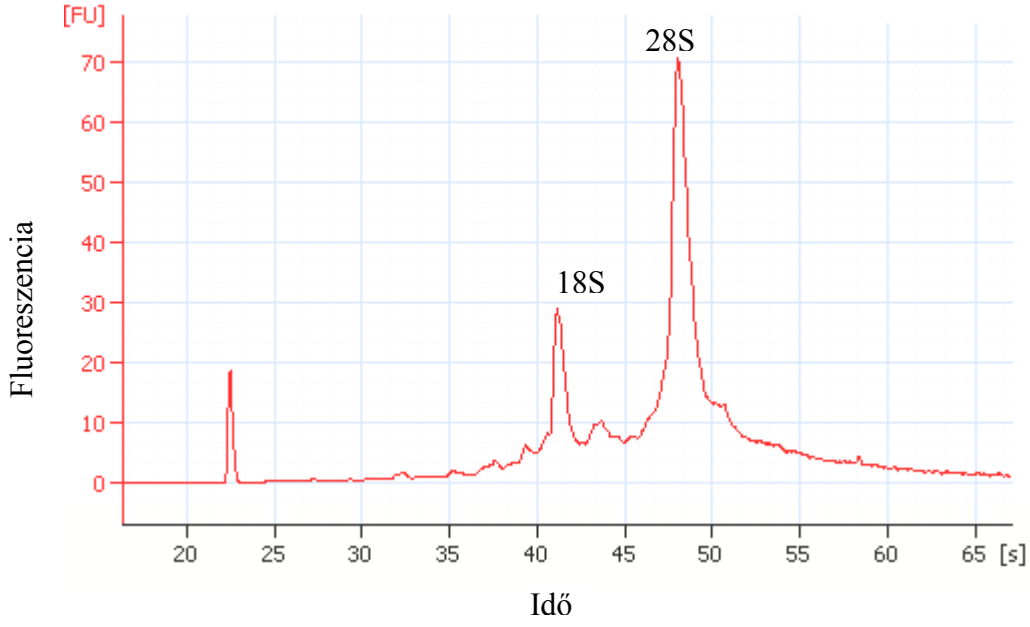
A260 nm DNS-RNS (nukleinsavak abszorpciós maximuma)

A280 nm fehérjék (aromás aminosavak abszorpciós maximuma)

Az abszorbciós értékek összeadódnak, a különböző hullámhosszon mért optikai denzitások (OD) hányadosából lehet következtetni a minta minőségére.

A minta integritását Agilent 2100 Bioanalyser (Matrix, Norway) műszerrel volt meghatározva. A műszer az izolált RNS-ben lévő kis riboszómális RNS (18S) és nagy riboszómális RNS (28S) szedimentációjából számol egy úgynevezett RIN (RNA integrity number) értéket mely következtetést nyújt a mintában található messenger RNS minőségére, azaz arra, hogy mennyire degradálódott a minta RNS tartalma (2. ábra).

Minden vizsgált mintánál a RIN szám (RNA integrity number) 7 felett volt, mely szükséges feltétele volt a releváns microarray vizsgálatnak.

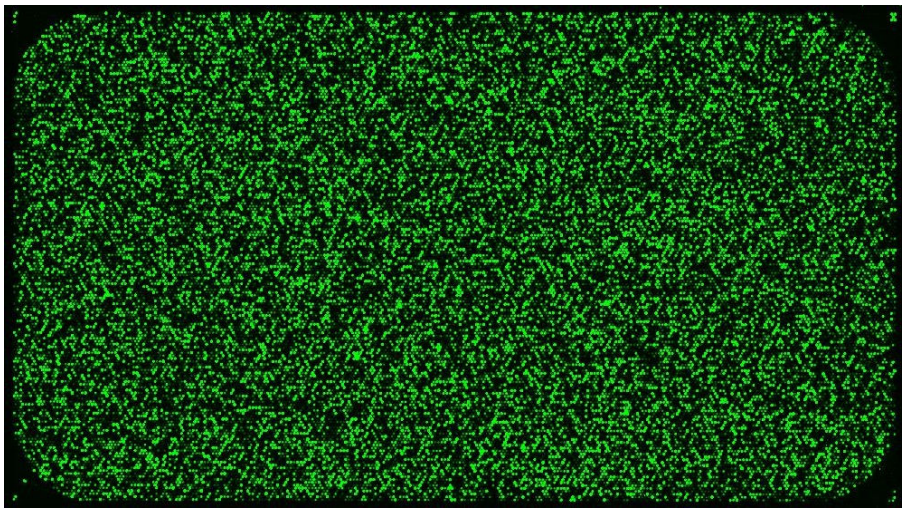


2. ábra RNS integritásának mérése Agilent 2100 Bioanalyserrel

DNS-chipen történő teljes genom oligonukleotid expressziós analízis:

22 lepényből származó mintát használtam fel a génexpressziós vizsgálatra. Minden mintából 800ng teljes RNS került felhasználásra a reverz transzkripcióhoz és az azt követő complement-DNS fluoreszens jelöléséhez. A reverz transzkipcióhoz One-Color Quick Amp Labeling Kit (Agilent) lett használva. A mintákban lévő RNS molekulákból egér Moloney leukémia vírusból származó reverz transzkriptáz enzim segítségével dupla szálú komplementer DNS (cDNS) lett készítve. Az átírás és az amplifikáció 2 órán keresztül történt 40ºC-on inkubálva. A keletkezett cDNS-t ezt követően RNS-re volt átírva és a molekulák CY3-CTP fluorescens festékkel voltak jelölve. A jelölés 2 órán keresztül 40ºC-os inkubációval történt a gyártó cég instrukciói szerint. A Cyaninnel jelzett cRNS-t ezt követően RNeasy Mini Kit (Quiagen) felhasználásával tisztításra került. Az így keletkezett jelölt amplifikált minták tisztasága és a festék beépülési minősége NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével volt ellenőrizve. A jelölési beépülési mutatónak magasabbnak kellett lennie, mint 9,0pmol festék/µg cRNA.

A minta jelölését követően mintánként 1650ng jelölt cRNS volt fragmentálva az alábbi reakcióközegben: 11µl 10x Blocking agent, 2,2µl 25x Fragmentation Puffer és RNáz mentes víz úgy, hogy a teljes reació 55µl-ben ment végbe 60ºC-on 30 percig. Az így keletkezett fragmentált jelölt reprezentáns oligonukleotidok kerültek felhasználásra a hibridizációhoz. Mintánként 100µL jelölt fragmentált cRNS volt hibridizáltatva 6 darab 4x44K Whole Human Genome Oligo Microarray Chips (Agilent Technologies) lemezen. A vizsgált mintáknál a génexpressziós mintázat meghatározása Agilent HGU G4112 microarray platformmal történt, egy-csatornás módban (egy minta volt hibridizáltatva egy teljes genomot reprezentáló DNS-chip felületen). A hibridizációhoz Agilent Gene Expression Hybridization Kit volt használva, 65ºC-on 10 rpm forgási sebességgel (Agilent Hybridációs szekrényben) 17 órás inkubálási idővel, majd ezt követően a microarray lemezek mosásra kerültek a scannelés számára 3. ábra. A lemezek beolvasása Agilent Scanner segítségével történt „extended dynamic range" módban. A kapott képi intenzitási adatok kicsomagolása és normalizálása Agilent Feature Extraxtion software v9.5 segítségével történt.



3. ábra Beolvasásra került minta a bekötődött jelölt oligonukleotidokkal a DNS-chipen. Minden egyes pontnak ismert az ott lévő komplementer oligonukleotid szekvenciája, és a kapcsolódott jelölt cRNS intenzitásából megatározható az eredeti minta adott specifikus mRNS mennyisége

Az DNS-chipen lévő háttérzaj korrekcióra került. A szűrő lépésben eltávolításra kerültek a további elemzésből azon próbák, melyeknek a korrekciós szignál értékük

gyengébb volt, mint 50 fluoresencia egység legalább két minta esetében. Az adatok ezután log2-alapra voltak hozva azért, hogy az array-ek közötti mennyiségi normalizációt el lehessen végezni [99] és a mérések átlagolását egy expressziós értékre mintánként és array-enként is. Az eltérő expresszió lineáris modellel volt elemezve, mely faktorként használja a terhességi kort is, mint változót. A modellben az együtthatókban a különbség, mint a csoportok közötti hatás módosítot t teszttel volt meghatározva [100]. Azokat a géneket tekintettük megváltozottnak, amelyek eltérő expresszivitást mutattak, a false discovery rate [101], az adjustált p érték kisebb volt mint 0,25 és az expresszió-szint különbség legalább kétszeres volt.

3.2.1.1.2. Expressziós eredmény validálása kvantitatív valós idejű PCR módszerrel

A microarray eredmények megerősítésére kvantitatív valós idejű PCR-t használtam. Tizenegy TaqMan® Gene Expressziós Assayst (2. táblázat) és az összehasonlításhoz szülséges belső kontrollként nagy riboszómális protein (large ribosomal protein=RPLPO) TaqMan kontrollt (4333761T) (Applied Biosystems) használtam. Az eljárás során TaqMan® Universal PCR Master Mix-et használtam. A PCR reakciót ABI 7300 Real-time PCR készüléken futtattam.

A cDNS szintetizálásához 2µg teljes RNS-t használtam mintánként. A minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mértem meg és azonos koncentrációjúra higítottam. A mért koncentrációkat a 3. táblázat mutatja.

Az azonos RNS koncentrációjú mintákat ezután High Capacity RNA-to-cDNA Kit-et (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználva cDNS-é írtam át.

Az átírás során mintánként a reakciómix dupla mennyiségben a következő komponenseket tartalmazta: 2x RT Puffer 10µl, 20x Enzim mix 1µl és (RNS minta + víz) 9µl. Az átíráshoz a következő beállítást használtam: 60 percig, 37ºC-on ment végbe a reverz transzkripció, 95ºC-on 5 percig denaturáltam, majd 4ºC-ra hűtöttem a reakciómixet. Az átíráshoz ABI 9700 PCR készüléket használtam (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A keletkezett cDNS-t ezután vízzel a 10-szeresére higítottam, majd a PCR-hez mintánként 9µl cDNS-t, master mixet (10µl) és TaqMan próbát (1µl) mértem össze. A real-time PCR reakciót ABI 7300 RT-PCR készüléken (Applied

Biosystems) futtattam le. A PCR reakció futási paraméterei az alábbi módon voltak beállítva: első lépésként két percig 50ºC-on, majd 10 percig 95ºC-on tartottam a reakciómixet, ezt követte 40-szer ismételve: 15 másodpercig 95ºC-on denaturáció, majd 1 percig 60ºC-on anealing és elongáció.

2. táblázat Az array eredmények validálásához használt kvantitatív valós idejű PCR assay-k

Assay azonosító	Gén szimbóluma	Gén neve	RefSeq
4333761T	RPLPO	large ribosomal protein	
Hs00751207_s1	LHB	luteinizing hormone beta polypeptide	NM_000894.2
Hs00361224_gH	CGB	chorionic gonadotropin, beta polypeptide	NM_000737.2
Hs00706258_s1	TOX4	TOX high mobility group box family member 4	NM_014828.2
Hs01038298_m1	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	NM_001085.4
Hs00220393_m1	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	NM_145791.1|NM_145764.1| NM_145792.1|NM_020300.3
Hs00365582_s1	SOCS4	suppressor of cytokine signaling 4	NM_199421.1|NM_080867.2
Hs00609663_m1	SIGLEC6	sialic acid binding Ig-like lectin 6	NM_198845.3, NM_001245.4
Hs00209700_m1	ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	NM_032995.1|NM_015320.2
Hs00168730_m1	PRL	prolactin	NM_000948.3
Hs00174877_m1	LEP	leptin	NM_000230.2
Hs00236877_m1	IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	

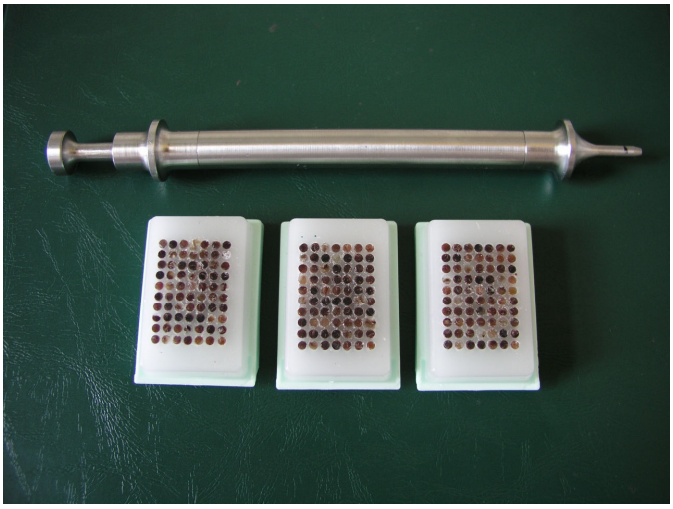
3. táblázat A microarray eredmények konfirmálására használt minták koncentrációi, illetve tisztaságának mérése spektrofotométerrel

	Eset	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
	1	721,2	18,03	8,69	2,07	2,16
	2	263,71	6,593	3,428	1,92	2,02
Korai kontroll	3	361,9	9,048	4,658	1,94	2,08
	4	173,55	4,339	2,096	2,07	1,74
	5	310,29	7,757	4,143	1,87	2,09
	1	156,46	3,911	1,938	2,02	2
	2	513,36	12,834	5,946	2,16	1,99
Érett kontroll	3	246,85	6,171	2,969	2,08	2,15
	4	1121,12	28,028	13,125	2,14	2,01
	5	500,29	12,507	5,801	2,16	1,98
	1	150,99	3,775	1,867	2,02	1,79
	2	456,24	11,406	5,977	1,91	1,96
Korai	3	348,38	8,709	4,303	2,02	1,9
praeeclampsia	4	125,81	3,145	1,569	2	1,84
	5	411,16	10,279	5,195	1,98	2,03
	6	196,17	4,904	2,381	2,06	1,93
	1	597,24	14,931	7,256	2,06	2,16
	2	55,26	1,381	0,666	2,07	1,57
Korai HELLP	3	523,03	13,076	6,295	2,08	2,09
szindróma	4	1358,27	33,957	16,144	2,1	1,72
	5	342,2	8,555	4,329	1,98	2,05
	6	102,36	2,559	1,261	2,03	1,47

3.2.1.2. Lepényszövet TMA (tissue microarray) fehérje expressziós vizsgálata

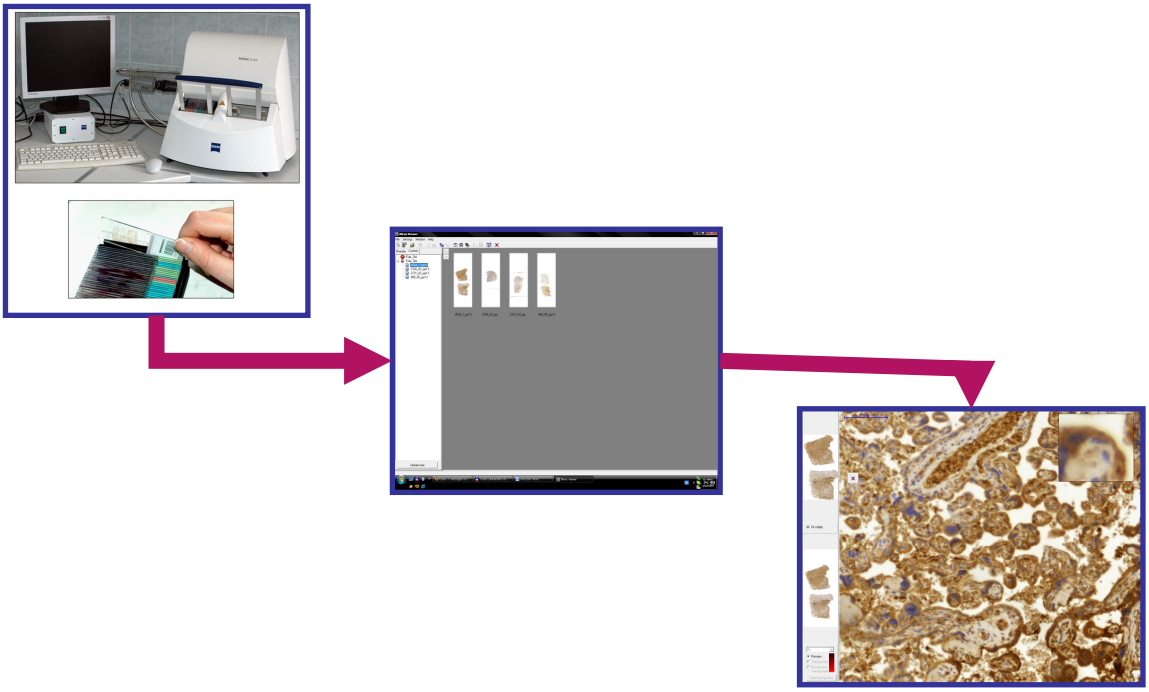
Kettő mm átmérőjű core-ok (hegerek) voltak kivéve minden szöveti blokkból, és azok egy recipiens blokkba kerültek (4. ábra). Ezt követően a recipiens blokkból 5µm vastagságú szelet volt lemetszeve és elhelyezve SuperFrost/Plus lemezen. A lemezek

ezt követően deparafináláson és rehidratáláson mentek keresztül. Az endogén peroxidázt 10%-os H_2O_2-vel volt gátolva, majd az antigén feltárására a lemezeket 10mM Tris és 1mM EDTA (pH=9,1) keverékében volt inkubálva 45 percig 100°C-on. A mosást követően a nem specifikus kötődés (10 perc, RT) megfelelő pufferrel lett gátolva (NovoLink™ Polymer Detection System, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). A lemezek egy csoportja ezt követően inkubálásra került (10 percig RT) poliklonális nyúl anti humán choriális gonadotropin béta alegység ellenes antitesttel (beta-hCG; 1:3) (Dako North America, Inc., CA, USA), a másik csoportja pedig poliklonális nyúl anti humán placentáris laktogén hormon béta alegység ellenes antitesttel (beta-LH; 1:1) (BioGenex, BioGenex Laboratories Inc., CA, USA)



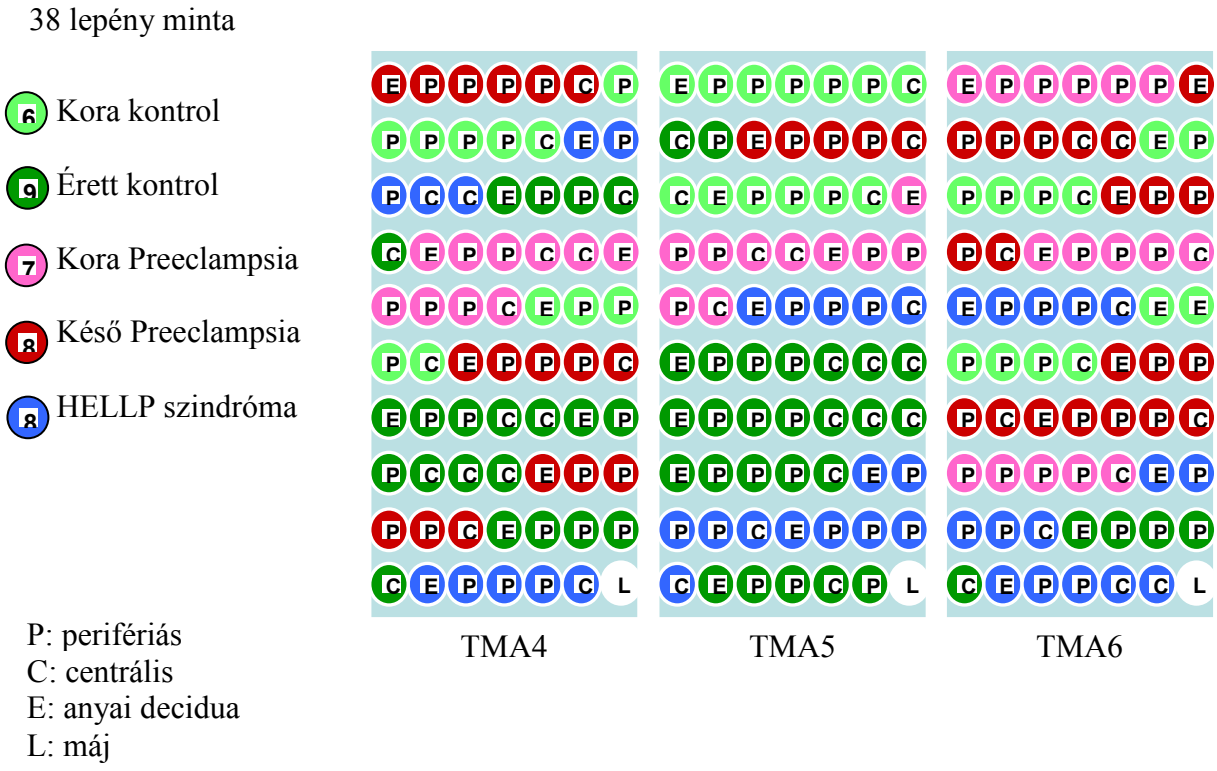
4. ábra TMA szövettani blokk készítéséhez használt fúró és 3 paraffinba ágyazott blokk

A kapott szöveti immunfestéseket két vizsgáló mikroszkóposan értékelte (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Németország). A szöveti microarray lemezeket a festést követően nagyfelbontású digitális scannelővel vettem fel (Mirax Scan, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Németország), és a kapott képeket virtuálisan értékeltem a Mirax Viewer 1.8.3.0 szoftverrel (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Németország és 3DHistech Kft., Budapest, Magyarország) 5. ábra.



5. ábra A virtuális mikroszkóp használatának folyamatábrája. Az elkészített metszetről egy nagyfelbontású digitális képet készítünk, majd azt követően Mirax Viewer 1.8.3.0 szoftverrel értkeljük

Első lépésként készítettem egy TMA térképet (6. ábra), majd az immunfestést egy az adott immunfestési intenzitási skála szerint – 0-tól 3+-ig – értékeltük [98]. Az értékelés során kapott független értékelési adatokat a további adatfeldolgozás során átlagoltam.



6. ábra TMA térkép. A különböző betegcsoportoktól származó minták véletlenszerűen kerültek elhelyezésre

3.2.2. Genomiális DNS izolálása perifériás vérből

A vizsgált személyektől etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó kémcsőbe 3ml perifériás vér lett véve. A DNS minták izolálására High Pure PCR Template Isolation kitet (Roche, Mannheim, Németország) használtam. A genomiális DNS-t 0,2ml mintából vontam ki [102].

Az izolálás során 1,5ml Eppendorf csőbe mértem 40µl Proteinase K enzimet 200µl Binding Puffert (6M guaninidine-HCl, 10mM urea, 10mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25ºC)), majd az elegyhez hozzáadtam 200µl vérmintát. Összekeverés után 70ºC-on 10 percig inkubáltam. Ezt követően az elegyhez mértem 100µl isopropanolt. Az összekeverést követően szilika oszlopra mértem a mintát, majd egy percig 8000 x g-vel centrifugáltam le. Az oszlop megköti a DNS molekulákat és egyéb szennyező anyagokat, ezért az oszlopot 500µl Inhibitor Removal Pufferrel (5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 ºC)) mostam át (centrifugálás 1 perc, 8000 x g). Ezt követően 500µl Wash Pufferrel (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 ºC)

mostam át az oszlopot (centrifugálás 1 perc, 8000 x g). A mosási szakaszt még egyszer megismételtem, majd a centrifugálás végén teljes sebességgel még további 10 másodpercig tisztítottam az oszlopot. A tisztítás végeztével 200µl 70ºC-os Elution Pufferrel (10mM Tris-HCl, pH 8,5 (25ºC)) oldottam le az oszlopról a tiszta DNS-t. A tisztított mintát steril 1,5ml-es Eppendorf csőben tároltam a vizsgálatig.

3.2.2.1. Leptin (TTTC)n hosszpolimorfizmus kimutatása kvantitatív fluoreszcens rendszerrel

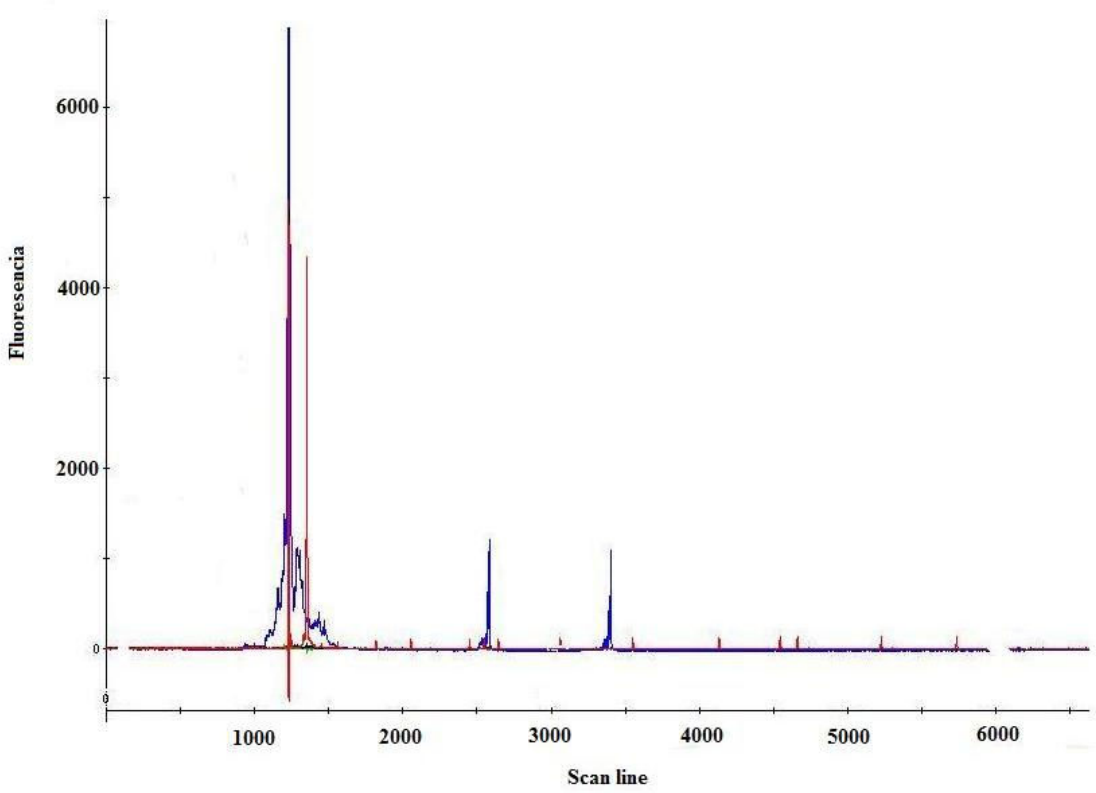
PCR reakcióval dúsítottam fel a DNS terméket, majd kapilláris elektroforézist és DNS fragmenthossz analízist használtam a mikroszatellita hossz meghatározására.
A használt PCR primerek szekvenciáit a 3. táblázat mutatja.

4. táblázat Leptin gén hosszpolimorfizmus meghatározására használt primer szekvencia

$(TTTC)_n$	
Forward primer:	5'-6-FAM-AGT TCA AAT AGA GGT CCA AAT CA-3'
Reverse primer:	5'-TTC TGA GGT TGT GTC ACT GGC A-3'

A PCR mix 25 µl Qiagen Multiplex PCR mix-et (Quiagen, Hilden, Németország) és 0,3µM koncentrációjú primert tartalmazott 50µl végtérfogatra számolva. A PCR reakció futtatási paraméterei a következők voltak:
A reakció 10 percig 95ºC-os denaturálással indult, majd 32 ciklus során a következő PCR környezet ismétlődött: anealing szakasz 15 másodpercig 55ºC, az elongációs fázis 20 másodpercig 72ºC-on, majd denaturálás 15 másodpercig 95ºC-on, a dúsítást követően egy 10 perces 72ºC-on történő extenzió következett. A PCR reakciót ABI 9700 PCR készülékkel végeztem (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
A célzott DNS szakasz dúsítását követően 4µl PCR termékhez 19µl formamid és 1µl GeneScan 500-ROX molekula méret standard (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) volt hozzámérve.
A keveréket ezután 3 percig 95ºC-on denaturáltm, majd 5 percig 4ºC-on inkubáltam. Az elektroforézis ABI 3130 Genetic Analyzerrel történt POP7 géllel (PE Applied

Biosystems). Az elektroforézis az alábbi beállítással működött: Injekciós idő: 16 másodperc, injekciós feszültség 1200V. A géllel töltött kapillárisban a minta 39 perc 40 másodpercig futott 15000V feszültségen, 60ºC-os munkahőmérsékleten. A futtatást Genescan Analysis programmal (PE Applied Biosystems) elemeztem 7. ábra.



7. ábra Leptin gén hosszpolimorfizmus analízis GeneScanner program segítségével. Az eltérő hosszú jelölt DNS termék a gélben az elektromos feszültség hatására méret szerint eltérő mértékben vándorol és a különböző termékek markánsan elválnak egymástól. Az ismeretlen hosszúságú terméket párhuzamosan futtatva ismert hosszúságú molekulastandarddal lehetőség adódik a vándorlás mértékéből a termék hosszára következtetni

3.3.2.2. Leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus meghatározása valós idejű PCR és olvadásgörbe analízissel

Az egynukleotidos génpolimorfizmus sokszorosításához a vizsgált génszakasz meghatározására alkalmas primerek, a vizsgált nukleotidot érintő hely kimutatására

pedig specifikus próbák voltak terveztetve. A primereket és a megfelelően jelölt próbákat a TibMolbiol (Berlin, Németország) tervezte és szintetizálta. A 5. táblázat mutatja a szekvenciákat. A PCR reakcióhoz 1µl DNS-t mértem be 5,0µM forward és reverse primert, 5,0µl-5,0µl hibridizációs próbát, 4,5-5,0mM $MgCl_2$-t és 1µl LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes keveréket (Roche, Penzdorf, Németország). A reakció 10µl végtérfogatban ment végbe.

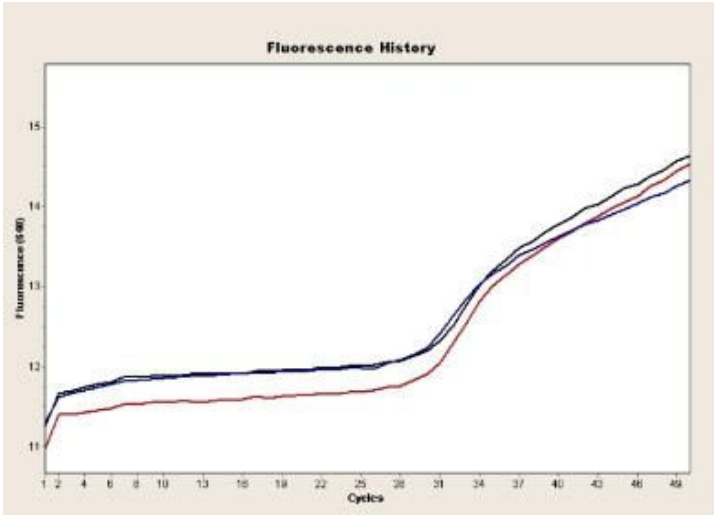
5. táblázat A leptin receptor (LEPR) egynukleotidos génpolimorfizmushoz használt primer és próba szekvenciák

LEPR c.326A>G	
Forward primer:	5'-AgTggTACTCACTTTTCTAACTTATC-3'
Reverse primer:	5'-gAATTAAAAAACATTgTTCAATACA-3'
Sensor próba:	5'-AACATTgAAggAA(A/g)gACATTTgTT-Fluorescein
Anchor próba:	LC640-CAACAgTAAATTCTTTAgTTTTTCAACAAATAgg-Foszfát
LEPR c.668A>G	
Forward primer:	5'-CAgCCAAACTCAACgACACT-3'
Reverse primer:	5'-CCACTCTTAATACCCCCAgTACTA-3'
Sensor próba:	5'-CATTAgAggTgAC(T/C)ggAAAATTAC-Fluorescein
Anchor próba:	LC640-CCACCAgATgTgATTTTCAAACACATTAAgg-Foszfát
LEPR c.1968G>C	
Forward primer:	5'-CAACTTgTCATTTTgCAgTTCCTA-3'
Reverse primer:	5'-gCTTTCCgAAgATTAATAACAggAT-3'
Sensor próba:	5'-TgACATTTTTCTC(C/g)TTTTTCATAgTATC-Fluorescein
Anchor próba:	LC640-CCATTAATTATTCTCCAAAATTCAggTCCT-Foszfát
LEPR c.3024A>G	
Forward primer:	5'-CCAgAgACAACCCTTTgTTAAATACg-3'
Reverse primer:	5'-TggTgAAATTATgTTgggATgC-3'
Sensor próba:	5'-gCACTTggTgAC(T/C)gAACTATTTAT-Fluorescein
Anchor próba:	LC640-gCCCTTgTTCTTCACCAgTTTCACTT-Foszfát

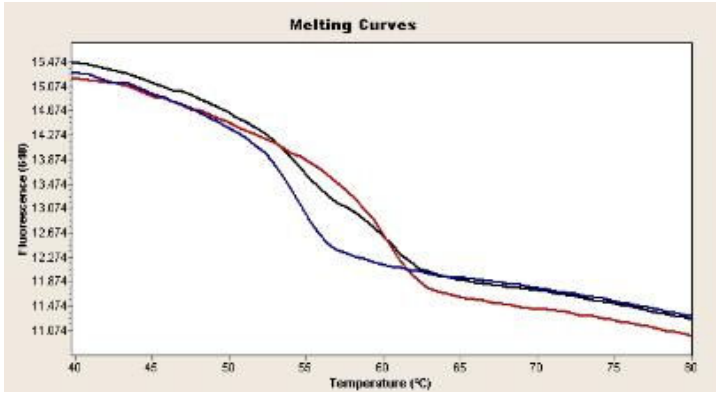
A PCR során 95ºC-on, 10 percig tartó denaturálást követően 36 ciklusban történt a termékek sokszorosítása. Az annealing hőmérséklet a reakciókban eltérő volt a különböző termékek esetén, értékük 52 és 62ºC között változott.
A termékek amplifikálását követően olvadási görbe elemzést végeztünk.

Egy rövid denaturálást követően a PCR reakció hőmérsékletét csökkentettem, majd fokozatosan emelve az elegy hőmérsékletét regisztráltam a fluoreszcens festékkel jelölt próbáról érkező jel változását. A hőmérséklet emelkedése során a vizsgált SNP-re jellemző hőmérsékleten a próba disszociál a DNS szálról. Olvadáspontnak nevezzük azt a hőmérsékletet, amikor a reakcióban 50-50%-ban van jelen a levált és a még le nem vált termék-próba komplex, ekkor a fluoreszencia éles változásával detektálható. Attól függően, hogy a homozigóta vad vagy homozigóta mutáns nukleotid van jelen, eltérő olvadáspont fog jelentkezni. Heterozigóta minta esetén mindkét (azaz a vad és a mutáns nukleotidra jellemző) olvadáspont detektálható. A LEPR c.326A>G vad allél PCR termékének olvadási pontja 63 ºC, az A allél esetén 55 ºC az olvadáspont, GA heterozigóta genotípus esetén mindkettő jelentkezik.
A LEPR c.668A>G vad allél PCR termékének olvadási pontja 63 ºC, az A allél esetén 55 ºC az olvadáspont, GA heterozigóta genotípus esetén mindkettő jelentkezik.
A LEPR c.1968G>C vad allél PCR termékének olvadási pontja 63 ºC, a C allél PCR termékének olvadási pontja 57 ºC, a GC genotípus esetén mindkettőt mutatja. A LEPR c.3024A>G vad allél PCR termékének olvadási pontja 47 ºC, a G allél PCR termékének olvadási pontja 52 ºC, az AG genotípus mindkettőt mutatja. (8. ábra)

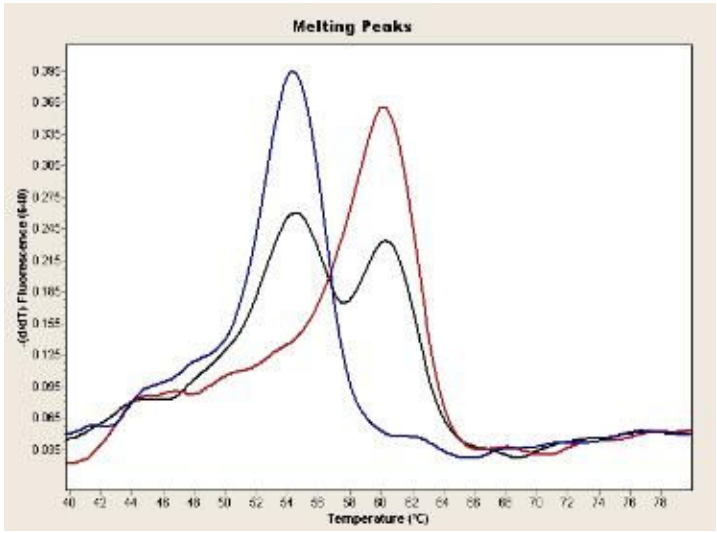
A:



B:



C:



8. ábra Folyamatábrák, az egynukleotidos génpolimorfizmus meghatározására valós idejű PCR olvadási görbe analízissel kombinálva. A: valós idejű PCR reakció során a termék mennyisége a reakcióciklus során előrehaladva folyamatosan nő; B: olvadási görbe felvétele, azaz a feldúsított termék és a DNS-hez kapcsolódott próba disszociációjának regisztrálása a reakciótér hőmérsékletének emelkedése során; C: Ha az intenzitási görbét leíró függvény változási gyorsaságát, azaz a függvény első deriváltját nézzük, akkor azon hőmérsékleti pontban ahol az olvadáspont van, az első derivált függvénynek maximuma van

3.3.1.1.1. Génexpressziós vizsgálathoz felhasznált statisztikai módszerek

Az adatfeldolgozás és elemzés: R statisztikai nyelvi környezetben volt végrehajtva (www.r-project.org), amelyhez a Bioconductor (www.bioconductor.org) csomag került használatra (limma, preprocessCore).

A kibővített elemzés során meghatározásra került a gén ontológia (GO) kifejezések szerint gyakrabban előforduló gének az eltérően expresszált gének közt. Ezzel az elemzéssel egy p-érték lettt kiszámolva minden egyes gén ontológiai kifejezésre és ezek az értékek „false discocery rate" (FDR) szerint voltak korrigálva. Hasonló elemzést volt végezve a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) útvonal elemzővel. A két bővített elemzést a Bioconductor GOstats csomagjával [103] lett elvégezve. Egy másik elméleti útvonal elemzés, mely nemcsak azt veszi figyelembe, hogy hány eltérően expresszálódó gén mutatható ki az adott jelátviteli útban, amit a bővített elemzés használ, szintén alkalmazásra került. Ez az úgynevezett Signaling Pathway Impact Analysis (SPIA) [104,105] szintén figyelembe veszi a jelátviteli útban a gének helyét, a gének közötti kapcsolat tulajdonságát és a nagyságát, valamint a génexpresszió változás irányát az adott útvonalban. SPIA elemzést a Bioconductor SIPA csomagjának felhasználásával volt végezve. A bővített elemzések és a hatás elemzések eredményeit szignifikánsnak tekintettük, ha a FDR-rel javított $p<0,05$.

3.3.1.1.2. Génexpresszió validálására használt kvantitatív valós idejű PCR során alkalmazott statisztikai módszerek

A három technikai ismétlés eredményeiből a küszöb ciklus értékeket (Ct értékek) minden vizsgált génre és a plate-en elhelyezett endogén kontroll génre (RPLPO) átlagoltam.

Minden vizsgált génre a –DCt érték az alábbi módon kaptam meg: minden minta (i), mint –DCt (vizsgált gén, i)=Ct (RPLPO,i)- Ct (target, i). A –DCt (vizsgált gén, i) érték így az adott mintában lévő gén koncentrációjának kettes alapú logaritmusával ($\log_2$gén) helyettesíthető. Lineáris modellt volt használva a –DCt(vizsgált gén, i) értékek illesztésére, mint a csoport tényezőjének (PE vs. Kontroll) működtetésére, mialatt kovariánsként a terhességi hét figyelembe volt véve. Mivel a microarray eredmények alapján a vizsgált gének expresszió-változásainak iránya ismert volt, ezért a statisztikai különbségeket egy oldalú t-teszttel határoztam meg. A kvantitatív valós idejű PCR adatok elemzésénél a $p<0,05$ szint volt szignifikáns értékű.

A microarray adatokat és az array adatok konfirmálása során kapott kvantitatív valós idejű PCR adatok R statisztikai programozási csomaggal (www.r-project.org) voltak

elemezve. A többi elemzéshez Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) programot használtam. A csoportok közötti arányok összehasonlításra Khi-négyzet tesztet és Fisher tesztet alkalmaztam. A nem normál eloszlású folytonos változókat Kruskal–Wallis teszttel, majd Mann–Whitney teszttel elemeztem. A $p<0,05$ szintet használtam a statisztikailag szignifikáns értéknek minden demográfiai jellemzőre.

3.3.1.2. Lepényszöveti fehérjeexpressziós vizsgálatnál alkalmazott statisztikai módszerek

Az összehasonlításra Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) programot használtam. A csoportok közötti arányok összehasonlítására Khi-négyzet tesztet és Fisher tesztet alkalmaztam. A normál eloszlású folytonos változókat Kruskal–Wallis teszttel, majd Mann–Whitney teszttel elemeztem. A $p<0,05$ szinet használtam a statisztikailag szignifikáns értéknek minden demográfiai jellemzőre.

3.3.2.1. Leptin hosszpolimorfizmus elemzésben felhasznált statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai analízise a Statistica 8 program (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) segítségével történt. A statisztikai különbségek kiszámítása az egyes csoportok között Mann-Whitney teszttel történt, a szignifikancia szintje $p <0,05$–ben lett meghatározva.

A kategórikus elemek összehasonlítására Pearson féle Khi-négyzet tesztet használtam (allél és genotípus gyakoriságok).

A mikroszatellita hordozásra kapott allél és genotípus megoszlást Hardy-Weinberg egyensúlyi eloszlásra is elemeztem.

3.3.2.2. Leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus vizsgálatában alkalmazott statisztikai eljárások

A vizsgálathoz szükséges mintabecslést Quanto 1.2.4 statisztikai programmal végeztem (http://hydra.usc.edu). Az eredmények statisztikai analízise a Statistica 8 program (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) segítségével történt. A statisztikai különbségek

kiszámítása az egyes csoportok között Mann-Whitney teszttel történt, a szignifikancia szintje $p<0,05$–ben lett meghatározva.

A kategórikus elemek összehasonlítására Khi-négyzet tesztet használtam (allél és genotípus gyakoriságok). A haplotípus analízis és a Hardy-Weinberg törvénynek való megfelelés kiszámítása a Haploview programmal történt (www.broad.mit.edu/mpg/haploview). A geno- és haplotípus gyakoriságok összehasonlítása Khi-négyzet teszttel és Fisher teszttel történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1.1.1. Lepényszöveti génexpressziós vizsgálat normál és kóros terhességben

A demográfiai és klinikai jellemzőket az 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat Demográfiai, klinikai és szövettani jellemzők

Csoport	Érett kontroll	Korai kontroll	Össz kontroll	Korai praeeclampsia	Korai HELLP szindróma
Esetszám[a]	5	5	10	6	6
Anyai életkor (év)[b]	30,8 (30,6-31,5)	31,6 (31,5-34,3)	31,5 (30,8-34,3)	34.3 (30,2-35,4)	28,7 (24,1-30,4)*
Terhességi hét szüléskor (hét)[b]	38,9 (38,7-39,0)	31,0 (30,85-34,0)	36,9 (31-38,9)	32,4 (30,3-34,9)	30,7 (29,3-33,1)
Primiparitás[c]	40	40	40	66,7	66,7
Dohányzás[c]	0	20	10	0	0
Szisztolés vérnyomás (mmHg)[b]	130 (120-135)	120 (120-120)	120 (120-133)	160 (160-160)**,##	170 (140-170)**,##
Diasztolés vérnyomás (mmHg)[b]	80 (78-89)	80 (70-80)	80 (76-80)	100 (95-105)**,##	100 (90-110)**,##
Fehérjevizelés[c]	0	0	0	100	100
Anyai BMI (kg/m^2)[b]	26,7 (25,2-28,0)	23,4 (21,6-24,6)	24,9 (21,8-28,0)	24,3 (22,6-24,9)	23,7 (21,2-27,2)
Újszülött születési súlya (g)[b]	3440 (3400-4030)	1990 (1640-2210)	2545 (1990-3440)	1065 (990-1200)##	1235 (930-1610)##
Császármetszés[c]	100	100	100	100	100
Méhlepény súlya (g)[b]	518 (458-665)	301 (294-322)	454 (301-518)	214 (210-224)##	255 (161-302)#
Thrombocytaszám (M/mm^3)[b]	178 (173-238)	227 (170-298)	203 (170-298)	250 (187-360)	77 (71-93)**,##
Hgb (g/100ml)	10 (10-11)	11 (11-11,2)	11 (10-11)	13 (12-13)**,##	13 (12-14)
ALT (U/l)[b,d]				39 (25-80)	382 (318-439)
ASAT (U/l)[b,d]				39 (23-80)	337 (315-448)
LDH (U/l)[b,d]				261 (217-350)	609 (510-1012)
Bilirubin (µmol/l)[b,d]				8 (4-14)	21 (18-21)
Kis méhlepény[c]	0	80	40	100	100
Fokozott syncytial knots[e]	8	6,8	7,3	12,6	12,1
Villus diszmatúria[c]	0	0	0	66	66

Az összes nő kaukázusi típusú volt; **p<0,01; *p<0,05 összehasonlítva a terhességi korral illesztett korai-kontrollal
##p<0,01; #p<0,05 összehasonlítva az összes kontrollal
[a]Az értékek számban kifejezve; [b]Az értékek medianja illetve az interquartilis (IQR) tartomány van feltüntetve; [c]Az értékek százalékban vannak feltüntetve; [d]Kontroll terheseknél nem történt vizsgálat; [e]Látóterenkénti szám

Az anyai kor alacsonyabb volt a HELLP szindrómás csoportban a korai kontroll csoporthoz képest. A súlyos praeeclampsia a korai praeeclampsiás betegek 2/3-ban és a korai HELLP szindrómás betegek mindegyikénél előfordult. A hat HELLP szindrómás esetből egy a Mississippi I., négy a Mississippi II. és egy a Mississippi III. osztályba tartozott. A kontroll csoporthoz képest a méhlepény tömege és az újszülött súlya kisebb volt a praeeclampsiával és HELLP szindrómával szövődött terhes csoportokban. A 20 vizsgált makroszkópos és szövettani lepényi elváltozás közül a villus éretlenséget és syncyciális knots-ot gyakrabban lehetett megfigyelni a korai praeeclampsiás és HELLP szindrómás csoportokban, mint a kontrollok között.

A lepényi génexpesszió függ a terhességi kortól

A microarray vizsgálat kimutatta, hogy 708 eltérő gén, melyet 725 próba határozott meg, eltérően expresszálódott a kontroll csoporton belül, a korai kontrollok és az érett kontrollok között (7. táblázat). A Gén Ontológiai (GO) elemzés szerint, a szignifikánsan eltérő (emelkedett és csökkent aktivitású) gének listája alapján olyan kategorikus folyamatok eltérése feltételezhető, mint a „translational elongation" mint fokozott biológiai jelátvitel, a „keratin filament", „intrinsic to internal site of plasma membrane" „citoszkeletális rész", „perinucleáris citoplazmatikus régió", „intermediate filament", „intermediate filament citoszkeleton", „citoszómás rész", „citoszómás riboszóma" fokozott működése a korai kontrollnál az érett kontrollhoz képest. A KEGG útvonallakkal bővített elemzés során a „szisztémás lupus erithematodus" és a „riboszóma", mint eltérő szabályzási útvonal jelzi a változást a lepényi transzkripciós és transzlációs aktivitásban a terhességi korral előrehaladva. Mindezek figyelembevételével egy lineáris statisztikai modell lett használva, mely figyelembe vette a terhességi kort a beteg és a kontroll csoportok összehasonlításakor.

A korai praeeclampsia génexpressziós mintázata eltér a normál lepényi mintázattól

Amikor összehasonlítottam a korai praeeclampsiás eseteket a kontroll csoporttal, 350 eltérő gén (melyet 379 próba reprezentált) expressziója mutatott szignifikáns eltérést (8. táblázat).

7. táblázat A húsz legnagyobb expressziós változást mutató gén korai kontroll és érett kontoroll között

Gén szimbólum	Fehérje neve	Módosított p érték	Változás aránya	Változás iránya a terhesség során
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	0,076	1,27	Fel
LOC401975	similar to ribosomal protein S3a	0,056	1,22	Le
LOC390413	similar to 60S ribosomal protein L7	0,034	1,3	Le
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	0,187	1,19	Le
RPL7	ribosomal protein L7	0,074	1,19	Le
KLK3	kallikrein-related peptidase 3	0,134	1,18	Le
BHLHB4	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 4	0,062	1,18	Le
SPPL2B	signal peptide peptidase-like 2B	0,052	1,18	Le
SP5	Sp5 transcription factor	0,107	1,17	Le
TSKS	testis-specific kinase substrate	0,091	1,17	Fel
LOC650392	hypothetical protein LOC650392	0,108	1,17	Le
CA1	carbonic anhydrase I	0,232	1,17	Fel
ITM2B	integral membrane protein 2B	0,139	1,16	Le
PRSS36	protease, serine, 36	0,221	1,16	Le
KIAA1856	KIAA1856 protein	0,062	1,16	Le
SOX3	SRY (sex determining region Y)-box 3	0,055	1,16	Le
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	0,046	1,16	Le
DNAH2	dynein, axonemal, heavy chain 2	0,033	1,16	Fel
FCRLB	Fc receptor-like B	0,084	1,16	Le
IER5	immediate early response 5	0,062	1,16	Le

8. táblázat A húsz legnagyobb expressziós változást mutató gén (a korai kontroll csoporthoz viszonyított változás aránya szerint) korai praeeclampsiában

Gén szimbólum	Fehérje neve	Módosított p érték	Változás aránya	Praeeclampsiában a változás iránya	Referencia
LEP	**leptin (obesity homolog, mouse)**	**<0,0001**	**108,9**	**Fel**	**[106-111]**
CGB	**chorionic gonadotropin, beta polypeptide**	**0,067**	**10,2**	**Fel**	**[106,110-112]**
TREM1	**triggering receptor expressed on myeloid cells 1**	**0,015**	**9,4**	**Fel**	**[110]**
LHB	**luteinizing hormone beta polypeptide**	**0,085**	**7,9**	**Fel**	**[110,111]**
SBEM	**small breast epithelial mucin**	**0,088**	**7,7**	**Fel**	
OPRK1	opioid receptor, kappa 1	0,022	7,3	Le	
LTF	lactotransferrin	0,102	6,5	Fel	
HTRA4	HtrA serine peptidase 4	0,131	6,3	Fel	
ARHGEF4	**Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4**	**0,100**	**6,0**	**Fel**	**[110]**
KRT81	keratin 81	0,183	6,0	Le	
UCA1	urothelial cancer associated 1	0,085	6,0	Fel	
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	0,102	5,9	Le	
SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	0,002	5,9	Le	
MIG7	mig-7	0,079	4,9	Fel	
WFDC10B	WAP four-disulfide core domain 10B	0,236	4,9	Le	
PAPPA2	**pappalysin 2**	**0,073**	**4,9**	**Fel**	**[110,111]**
BTBD16	BTB (POZ) domain containing 16	0,061	4,8	Fel	
SLC14A2	solute carrier family 14 (urea transzporter), tag 2	0,144	4,7	Le	
TMEM63B	transmembrane protein 63B	0,138	4,6	Le	
SIGLEC6	**sialic acid binding Ig-like lectin 6**	**0,019**	**4,5**	**Fel**	**[109-111]**

Vatagon van szedve az a gén, melyről más publikációban már közölték az eltérő lepényi aktivitását praeeclampsiában.

Ezek közt szerepelt a leptin, a hCG és az LH béta alegysége, inhibin A, siglec-6, PAPP-A2, TREM1 és sFLT, melyek eltérő expressziós szintet mutattak praeeclampsiában. A 20 legnagyobb emelkedett és csökkent aktivitást mutató gén közül 7-et korábban már más microarray tanulmányok közöltek: ezek a jelen eredményhez megegyező módon változtak praeeclampsiás betegektől gyűjtött lepényekben (8. táblázat).

A GO bővített elemzés 73 biológiai folyamat túlműködését mutatta korai praeeclampsiában, melyekből a húsz legszignifikánsabban változót a 9. táblázat tartalmazza. Érdekes, hogy az „érképződés, vérérképződés", és „hormon szekréciós szabályzás" csak praeeclampsiában volt fokozott, HELLP szindrómában nem. Molekuláris funkció elemzése tekintetében a „hormon, a foszfolipáz és lipáz gátlás", „növekedési faktor", „oxigén transzport" és „glutation transzferáz" aktivitások különböznek praeeclampsiában a kontroll csoporthoz képest.
Megjegyzendő, hogy a gének által reprezentált fehérjék sejt-kompartmenben való elhelyezkedése szerint főleg az extracelluláris régióban és a plazma membránban, míg a KEGG adatbázis jelátviteli út elemzése során a neuroactív „ligand-receptor kapcsolódás" mutatott eltérést a normál és a praeeclampsiás csoportok között.

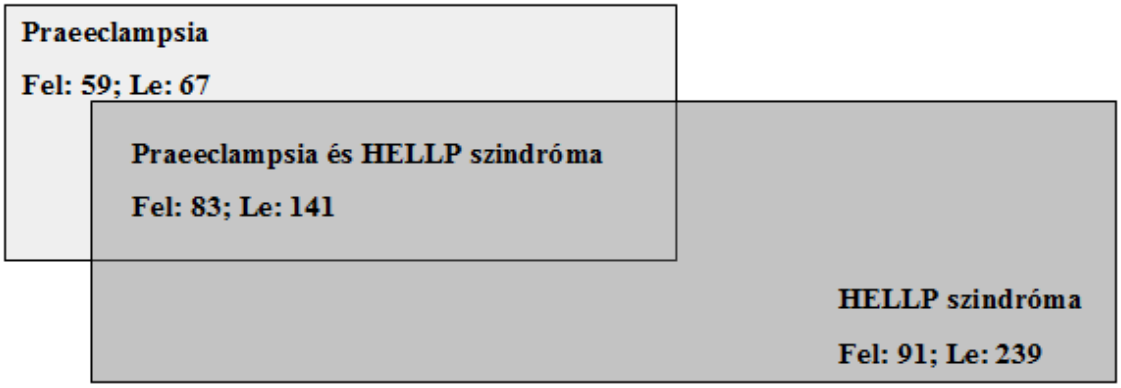
9. táblázat A húsz legnagyobb eltérést mutató biológiai folyamat korai praeeclampsiában

Sorszám	Biológiai folyamat kategóriája	Eltérő expresszivitást mutató gének (n)	Gének száma a referencia arrayn (n)	Módosított p érték
1	**többsejtű szervezeti folyamat**	**86**	**2448**	**<0,001**
2	**anatómiai struktúra morphogenezis**	**43**	**951**	**<0,001**
3	**szerv fejlődés**	**45**	**1036**	**<0,001**
4	**rendszer fejlődés**	**54**	**1424**	**0,003**
5	**biológiai ellenőrző folyamatok szabályozása**	**40**	**932**	**0,003**
6	**sejt-sejt jelátvitel**	**23**	**415**	**0,004**
7	**többsejtű szervezeti fejlődés**	**63**	**1827**	**0,004**
8	**anatómiai struktúra fejlődés**	**60**	**1710**	**0,004**
9	szerv morfogenezis	23	419	0,004
10	**külső ingerre adott válasz**	**28**	**581**	**0,005**
11	**rendszer folyamatok**	**33**	**748**	**0,005**
12	**fejlődési folyamatok**	**81**	**2635**	**0,008**
13	**lymphocita differenciálásának gátlása**	**3**	**5**	**0,01**
14	növekedés szabályozás	14	203	0,01
15	**keratinizáció**	**5**	**25**	**0,01**
16	**sejt fejlődési folyamatok**	**43**	**1171**	**0,01**
17	érképződés	11	139	0,01
18	vér ér morfogenezis	12	165	0,02
19	pozitív hormon szekréció szabályozás	4	16	0,02
20	hormon szekréció szabályozás	5	29	0,02

Vastagon vannak szedve azok a biológiai folyamatok, amelyek a HELLP szindrómában szintén eltérést mutattak a korai kontroll csoporthoz képest.

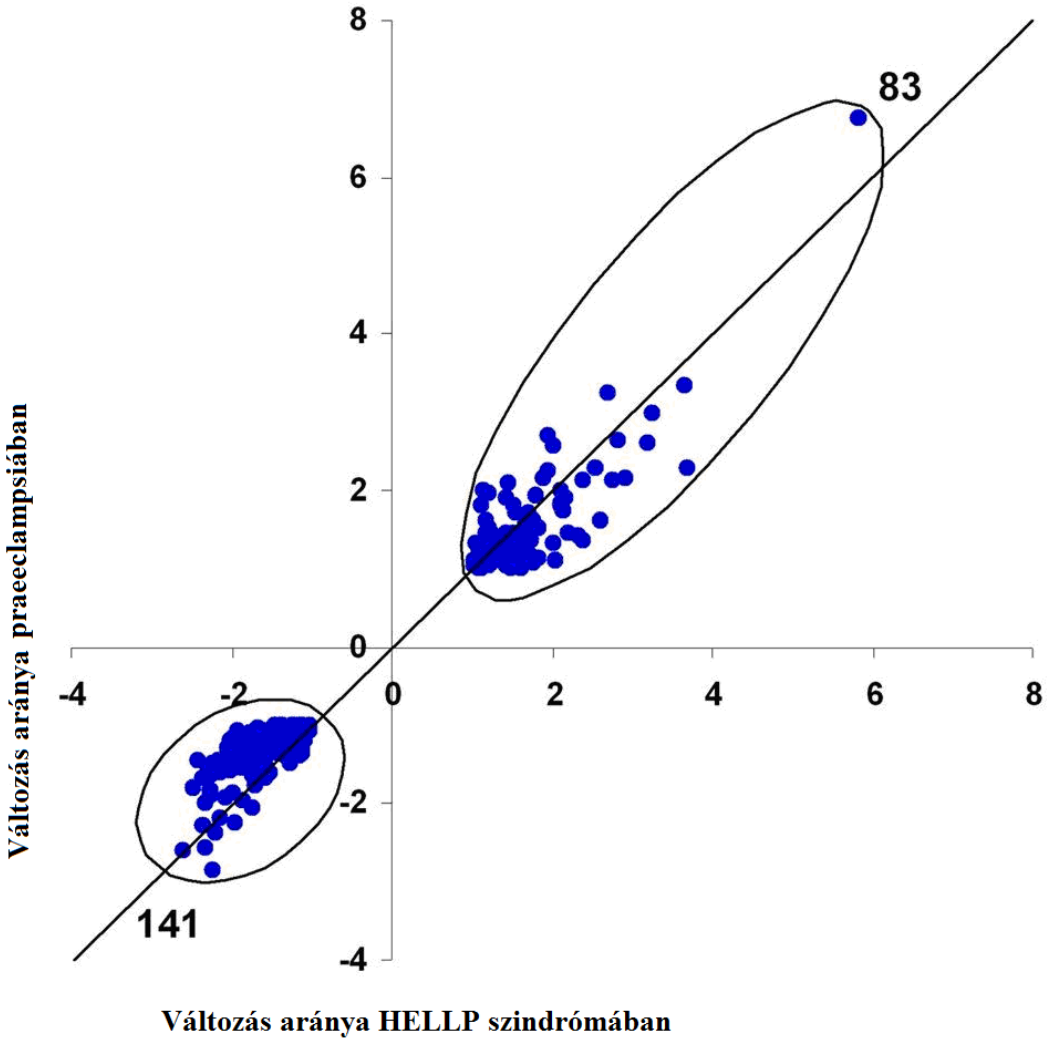
Korai HELLP szindrómában a lepényi génexpressziós mintázat hasonló a korai praeeclampsiához

A microarray elemzés során 554 eltérő gént reprezentáló 605 próba mutatott szignifikánsan eltérő expresszivitást a korai HELLP szindrómában az összkontroll csoporthoz képest (9. ábra).



9. ábra A kontroll csoporthoz képest korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában eltérést mutató gének száma Venn-diagrammon

Az eltérő expresszivitást mutató gének közül 224 gén hasonló eltérést mutatott praeeclampsiában és HELLP szindrómában (9. ábra). A 20 legjobban fel vagy alul expresszált génből, 16 szintén eltérést mutatott praeeclampsiában (10. táblázat). Nem volt olyan gén, mely eltérő irányban változott volna - a HELLP szindrómás csoportot a korai praeeclampsiás esetekkel összehasonlítva - azon gének közül, melyek mindkét betegségben eltérést mutattak a kontroll csoporthoz képest (10. ábra).



10. ábra Korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában a korai kontroll csoporthoz képest eltérést mutató gének expresszió változás mértékének összehasonlítása. A mindkét szindrómában szignifikáns lepényi expresszióváltozást mutató 224 gén azonos irányban változott mindkét betegségben

10. táblázat A húsz legnagyobb expressziós eltérést mutató gén (a változás aránya szerint) korai HELLP szindrómában

Gén szimbólum	Fehérje neve	Módosított p érték	Változás aránya	HELLP szindrómában a változás iránya
LEP	**leptin (obesity homolog, mouse)**	**0,002**	**56,9**	**Fel**
MIG7	**mig-7**	**0,010**	**13,0**	**Fel**
CGB	**chorionic gonadotropin, beta polypeptide**	**0,037**	**12,7**	**Fel**
LHB	**luteinizing hormone beta polypeptide**	**0,051**	**9,6**	**Fel**
ARHGEF4	**Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4**	**0,046**	**9,1**	**Fel**
SIGLEC6	**sialic acid binding Ig-like lectin 6**	**0,004**	**7,6**	**Fel**
HTRA4	**HtrA serine peptidase 4**	**0,114**	**7,0**	**Fel**
TREM1	**triggering receptor expressed on myeloid cells 1**	**0,022**	**6,5**	**Fel**
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	0,230	6,5	Fel
DNAH11	**dynein, axonemal, heavy chain 11**	**0,025**	**6,1**	**Fel**
KRT81	**keratin 81**	**0,204**	**6,0**	**Le**
NPAS3	neuronal PAS domain protein 3	0,065	5,9	Le
PAPPA2	**pappalysin 2**	**0,039**	**5,8**	**Fel**
LOC650392	**hypothetical protein LOC650392**	**0,032**	**5,6**	**Le**
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	0,076	5,6	Le
SPPL2B	**signal peptide peptidase-like 2B**	**0,021**	**5,3**	**Le**
GREM2	**gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)**	**0,021**	**5,2**	**Fel**
BHLHB2	**basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2**	**0,021**	**5,2**	**Fel**
PRSS36	protease, serine, 36	0,070	5,2	Le
LOC390413	**similar to 60S ribosomal protein L7**	**0,022**	**5,2**	**Le**

Vastagon vannak szedve azok a gének, amelyek a praeeclampsiában szintén azonos irányú változást mutattak.

A GO-val bővített elemzés során 69 biológiai folyamat mutatott eltérést a HELLP szindrómában, melyek többségében megegyeztek a praeeclampsában találhatókkal, melyből a 20 statisztikailag legjobban változót a 11. táblázat mutatja. Érdekes, hogy az „extracelluláris mátrix/szerkezeti szerveződés" csak HELLP szindrómában volt fokozott.

Molekuláris funkció elemzés a „hormon és a növekedési faktor aktivitást" mutatta fokozottnak a HELLP szindrómában, míg a sejtkomponens elemzés főként az „extracelluláris terület és a plazma membrán", a „kontraktilis rost", és a „fibrilláris kollagén" fokozott működését jelezte, amikor a HELLP szindrómás mintákat a kontroll csoporttal hasonlítottuk össze. A „neuroactív ligand receptor interakció" szintén eltért praeeclampsiában, a KEGG adatbázis jelátviteli út elemzés során pedig a „citokin – citokin-receptor intrakció" mutatott fokozódást HELLP szindrómában.

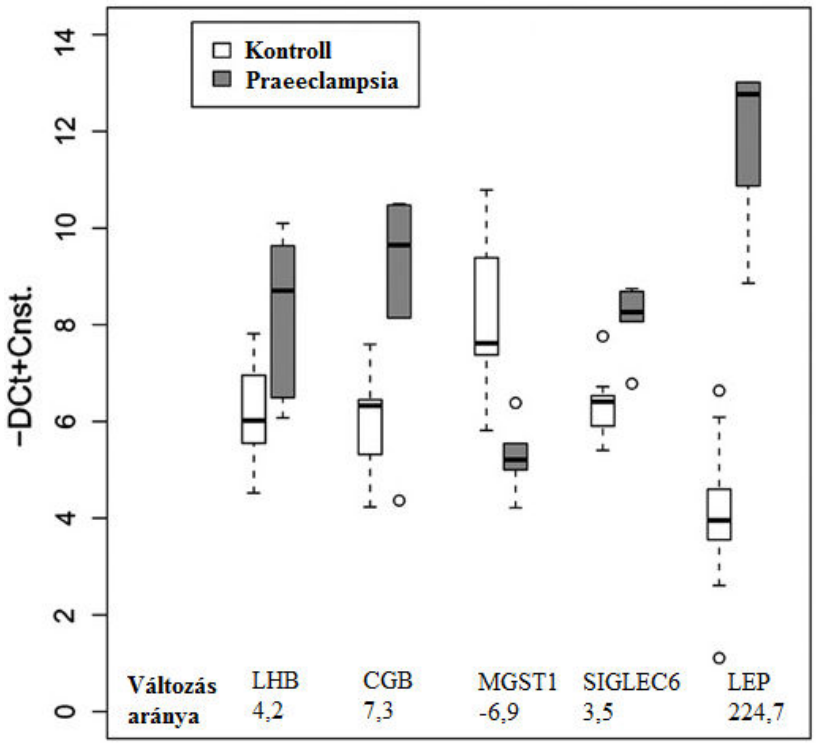
11. táblázat A húsz legnagyobb eltérést mutató biológiai folyamat korai HELLP szindrómában

Sorszám	Biológiai folyamat kategóriája	Eltérő expresszivitást mutató gének (n)	Gének száma a referencia arrayn (n)	Módosított p érték
1	**többsejtű szervezeti folyamat**	**123**	**2448**	**<0,0001**
2	soksejtű szervezeti folyamat szabályozása	33	471	<0,01
3	**soksejtű szervezeti fejlődés**	**87**	**1827**	**<0,01**
4	**rendszer fejlődés**	**71**	**1424**	**0,01**
5	**renszer folyamat**	**44**	**748**	**0,01**
6	**fejlődési folyamat**	**113**	**2635**	**0,02**
7	**szerv fejlődés**	**54**	**1036**	**0,02**
8	sejten kívüli mátrix szerveződés	8	48	0,02
9	**anatómiai struktúra fejlődés**	**79**	**1710**	**0,03**
10	**sejt differenciálódás**	**50**	**973**	**0,04**
11	rendszer folyamatok szabályozása	13	134	0,04
12	**lymphocita érés gátlása**	**3**	**5**	**0,04**
13	**ingerre adott válasz**	**86**	**1950**	**0,04**
14	**sejt-sejt jelátvitel**	**26**	**415**	**0,06**
15	sejten kívüli struktúra szerveződés	9	76	0,06
16	soksejtű szervezet szaporodása	7	47	0,06
17	soksejtű szervezetben szaporodási folyamatok	7	47	0,06
18	izom rendszer folyamatok	12	131	0,07
19	cAMP bioszintetizáló folyamat	8	65	0,07
20	**keratinizáció**	**5**	**25**	**0,07**

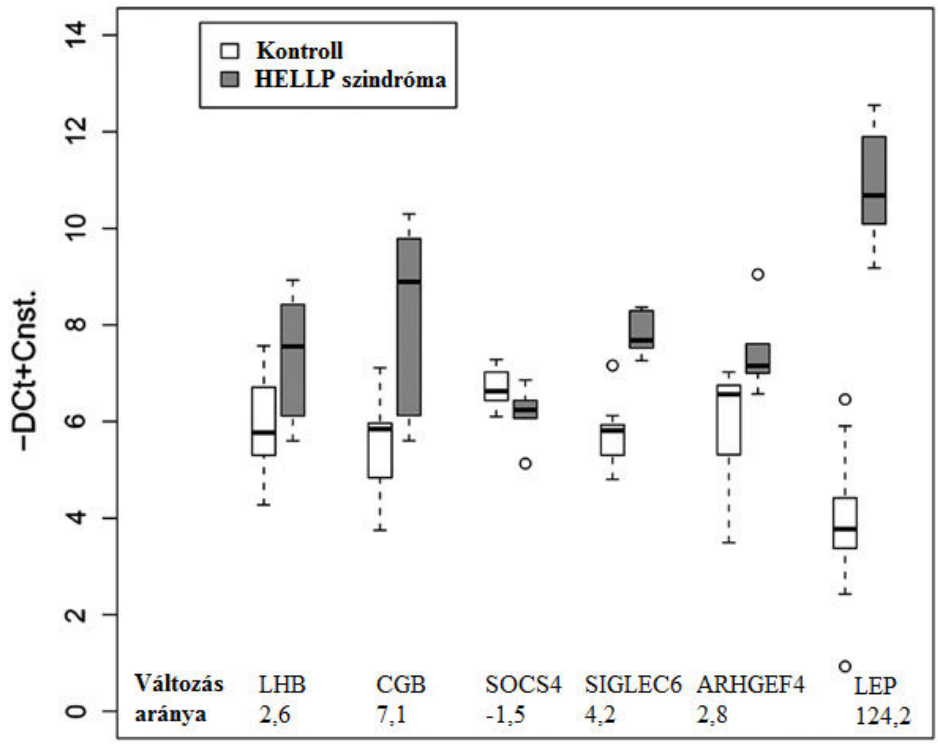
Vastagon vannak szedve azok a biológiai folyamatok, amelyek a praeeclampsiában szintén azonos irányú eltérést mutattak a kontroll csoporthoz viszonyítva.

4.1.1.2. A korai praeeclampsia és HELLP szindróma vizsgálata során kapott microarray eredmények validálása kvantitatív valós idejű PCR rendszerrel

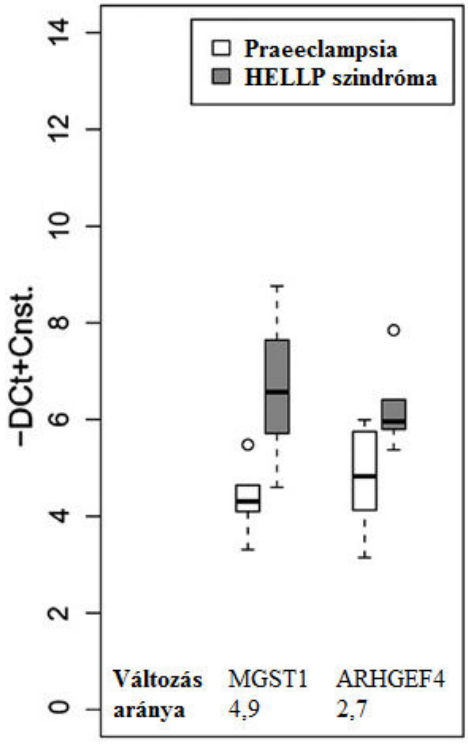
Azért, hogy biztos legyen a microarray vizsgálat erdményének helyessége, 11 gén expressziós szintjét határoztam meg kvantitatív valós idejű PCR-rel: öt gén szignifikánsan eltérő expresszivitású volt a kontroll csoporthoz képest, míg hat gén a legnagyobb koncentrációs (de nem szignifikáns) különbséget mutatta RNS szinten a praeeclampsia és a HELLP szindróma között a microarray vizsgálat során. Az előbbi öt génnél négy esetben sikerült alátámasztani a microarray eredményeket mindkét betegség esetén (LEP, CGB, LHB, SIGLEC6). Közülük a leptinnek erősen emelkedett (124-225-szeres) RNS szintje volt. A többi hat gén közül szignifikáns különbséget mutattunk ki az ARHGEF4 és a MGST1 esetében praeeclampsia és a HELLP szindróma között (11-13. ábra).



11. ábra Vizsgált öt legnagyobb expressziójú gén ellenőrzése korai kontroll és praeeclampsiás lepényekből izolált RNS között kvantitatív valós idejű PCR reakcióval. (LHB: luteinizáló hormon béta alegysége, CGB: choriális gonadotropin béta alegysége, MGST1: mikroszómális glutation S-transzferáz 1, SIGLEC6: sziálsav kötő Ig-szerű lektin 6, LEP: leptin)



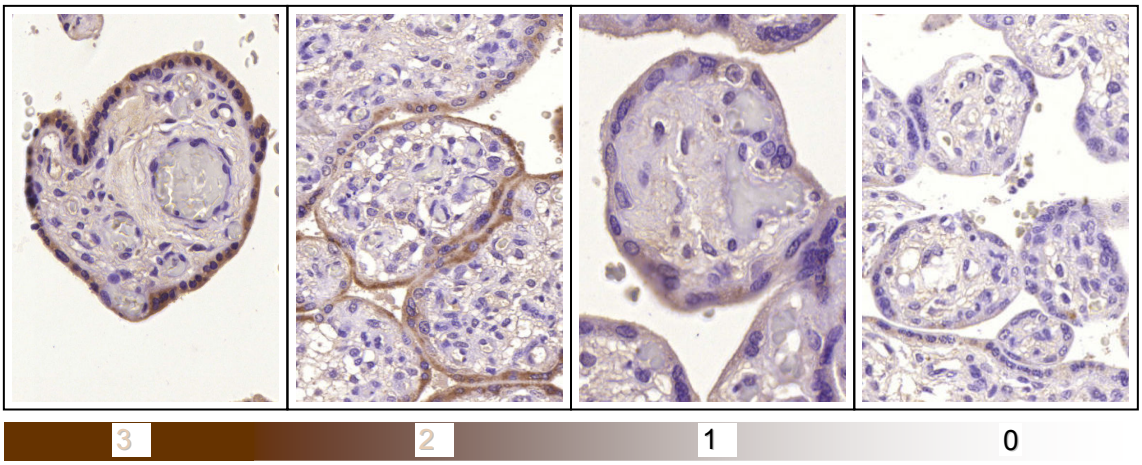
12. ábra Vizsgált öt legnagyobb expressziójú gén ellenőrzése korai kontroll és HELLP szindrómás lepényekből izolált RNS között kvantitatív valós idejű PCR reakcióval. (LHB: luteinizáló hormon béta alegysége, CGB: choriális gonadotropin béta alegysége, MGST1: mikroszómális glutation S-transzferáz 1, SIGLEC6: sziálsav kötő Ig-szerű lektin 6, LEP: leptin)



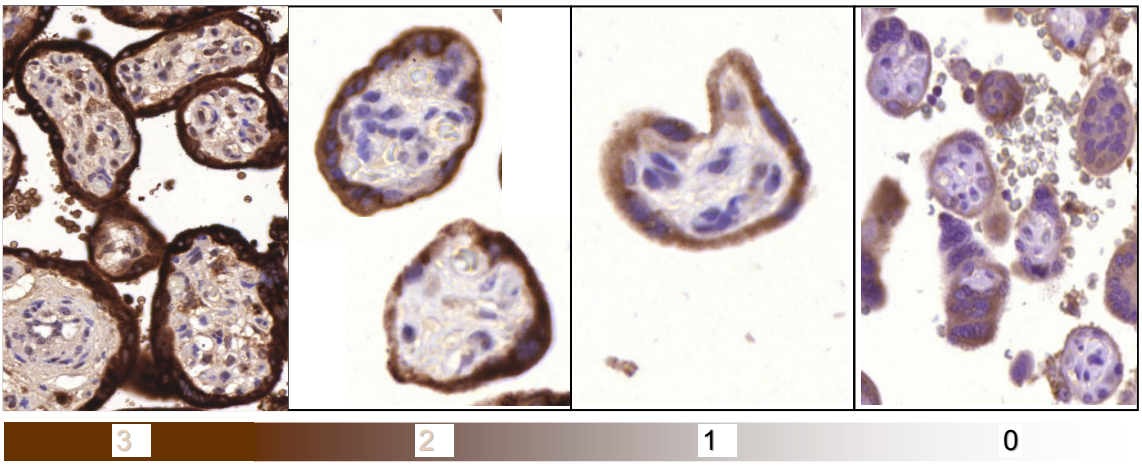
13. ábra Microarray-n nem szignifikáns eltérést mutató gének közül két gén esetében (ARHGEF4: Rho guanin nukleotid kicsrélő faktor 4, MGST1: mikroszómális glutation S-transzferáz 1) szignifikáns expresszióbeli különbség volt kimutatható praeeclampsia és HELLP szindróma között

4.1.2. Szöveti microarray fehéjeexpressziós vizsgálat analízise

A szöveti microarray (TMA) immunfestési vizsgálat során eltérést kerestem a lepényszövet festődésében kontroll és kóros terhességből származó placentákban. Az értékeléshez egy szemikvantitatív skálarendszert dolgoztam ki. A mellékelt 14. ábra mutatja a használt skálát a béta-LH esetén illetve a 15. ábra a béta-hCG esetében.



14. ábra Béta-LH festésnél alkalmazott skálarendszer



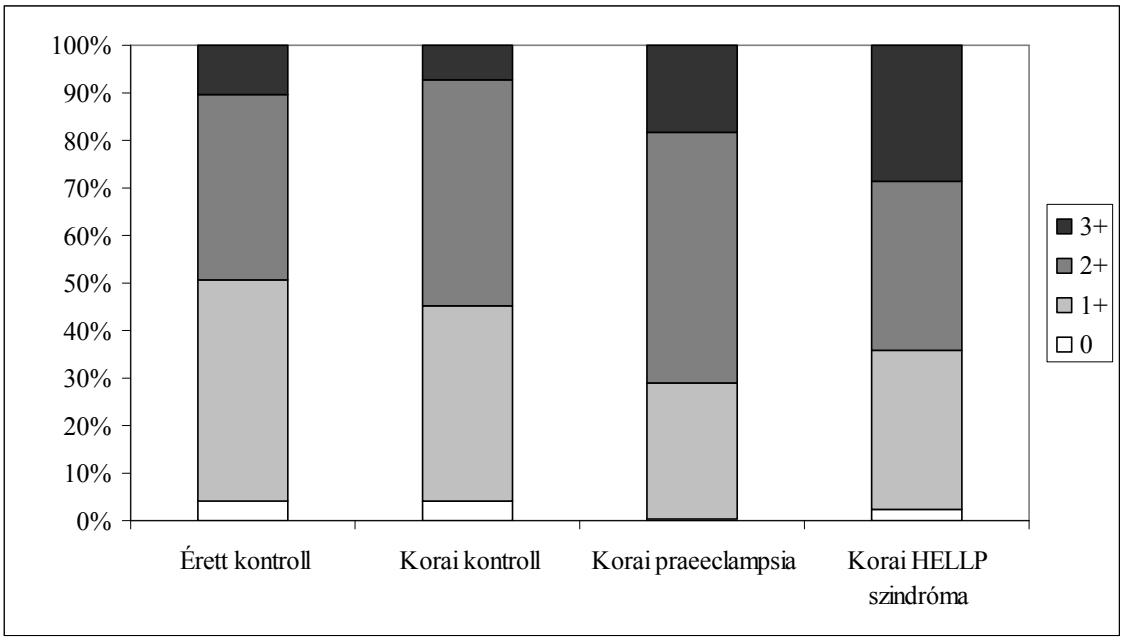
15. ábra Béta-hCG festésnél használt skálarendszer

A két értékelő személy egymástól függetlenül vizsgálta a lepényi core-okat. A vizsgálat során lepénymintánként legalább 25 mikroboholyt értékeltek a syncytiotrophoblast festődésre. Az LH esetében az érett kontroll lepények (52 db) értékelésekor 57 mikroboholy nem mutatott festést, 636 gyenge (1+), 535 közepes (2+), 140 erős (3+) festődést mutatott. A korai kontroll lepények esetében (36 db) nem mutatott festődést 44 mikroboholy, gyenge festődést 440, közepes festődés 509, és erős festődés 76 mikroboholynál volt megfigyelhető. A két csoport között a festődési intenzitásban szignifikáns különbség volt megfigyelhető, tehát a tehességi kor befolyásolta a syncytiotrohoblast LH expresszióját. Emiatt a korai praeeclampsiás és HELLP szindrómás mintákat a korai kontroll csoporttal hasonlítottam össze. A korai praeecampsiás lepények esetében (36 db) 7 mikroboholy nem festődött, 448

mikroboholy gyengén, 832 közepesen és 286 mikroboholy erősen festődött. Korai HELLP szindrómás lepények esetében (40 db) 33 mikroboholynál festődés nem volt detektálható, 457 esetben gyenge, 489 mikroboholynál közepes, 390 esetben pedig erős, festődést detektáltunk. Összességében szignifikáns eltérés volt megfigyelhető mindkét kóros csoportban a korai kontroll csoporthoz képest. A mikroboholy béta-LH antitestfestődésének csoportok szerinti relatív gyakoriságát a 12. táblázat mutatja, illetve oszlopdiagrammon a 16. ábra szemlélteti.

12. táblázat Mikrobolyhok béta-LH festődésének csoportok szerinti gyakorisága

béta-LH	**Festődési intenzitás**			
Csoport	**0**	**1+**	**2+**	**3+**
Érett kontroll	0,04167	0,46491	0,39108	0,10234
Korai kontroll	0,04116	0,4116	0,47615	0,07109
Korai praeeclampsia	0,00445	0,28481	0,52893	0,18182
Korai HELLP szindróma	0,02411	0,33382	0,3572	0,28488



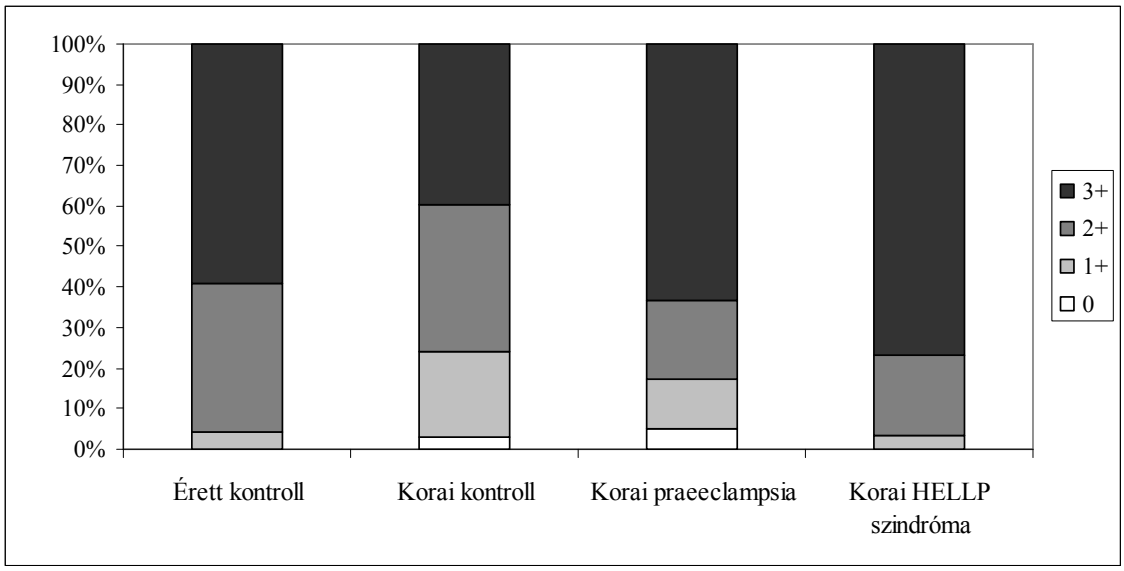
16. ábra Béta-LH festődés megoszlása a vizsgált csoportokban

A béta-hCG festésnél a korai kontroll csoportnál 26 mikroboholy esetében nem volt festődés, 196 gyengén, 337 közepesen, és 365 erősen festődött. Érett kontrollok esetén gyenge festődés 47, közepes festődés 392 és erős festődés 632 esetben volt megfigyelhető. Szignifikáns eltérés volt megfigyelhető a korai és érett kontrollok között.

Korai praeeclampsia esetében 66 mikroboholynál nem volt tapasztalható festősés, 158 mikroboholy gyengén, 250 közepesen, 820 pedig erősen festődött. Korai HELLP szindrómából származó lepények esetében 38 mikroboholy gyenge, 215 közepes, 834 pedig erős festődést adott. Az azonos terhességi korú kontroll és kóros csoportok között szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. A mikroboholy béta-hCG festődésének csoportok szerinti relatív gyakoriságát a 13. táblázat mutatja, illetve oszlopdiagrammon a 17. ábra szemlélteti.

13. táblázat Mikrobolyhok béta-hCG festődésének csoportok szerinti gyakorisága

Béta-hCG	**Festődési intenzitás**			
Csoport	**0**	**1+**	**2+**	**3+**
Érett kontroll	0	0,04388	0,36601	0,5901
Korai kontroll	0,02814	0,21212	0,36472	0,39502
Korai praeeclampsia	0,051	0,1221	0,1932	0,63369
Korai HELLP szindróma	0	0,03496	0,19779	0,76725



17. ábra béta-hCG festődés megoszlása a vizsgált csoportokban

A szöveti microarray immunfestési vizsgálat fokozott syncytiotrophoblast festődést mutatott a béta-LH és a béta-hCG-re mind praeeclampsiában, mind HELLP szindrómában a terhességi korban illesztett kontroll csoporthoz képest. A relatív citoplazmatikus festési intenzitás a béta-hCG-nél szignifikánsan erősebb volt HELLP szindrómában paeeclampsiához képest, felvetve a korrelációt a szintézis mértéke és a betegség súlyossága között. Hasonló mértékű fokozódás volt megfigyelhető a syncytiotrophoblast festési intenzitásban a béta-LH esetében mindkét szindrómában 17. ábra.

4.2.1. Leptin gén (TTTC)n hosszpolimorfizmusának populációs megoszlása HELLP szindrómás, praeeclampsiás és kontroll terhesek közt

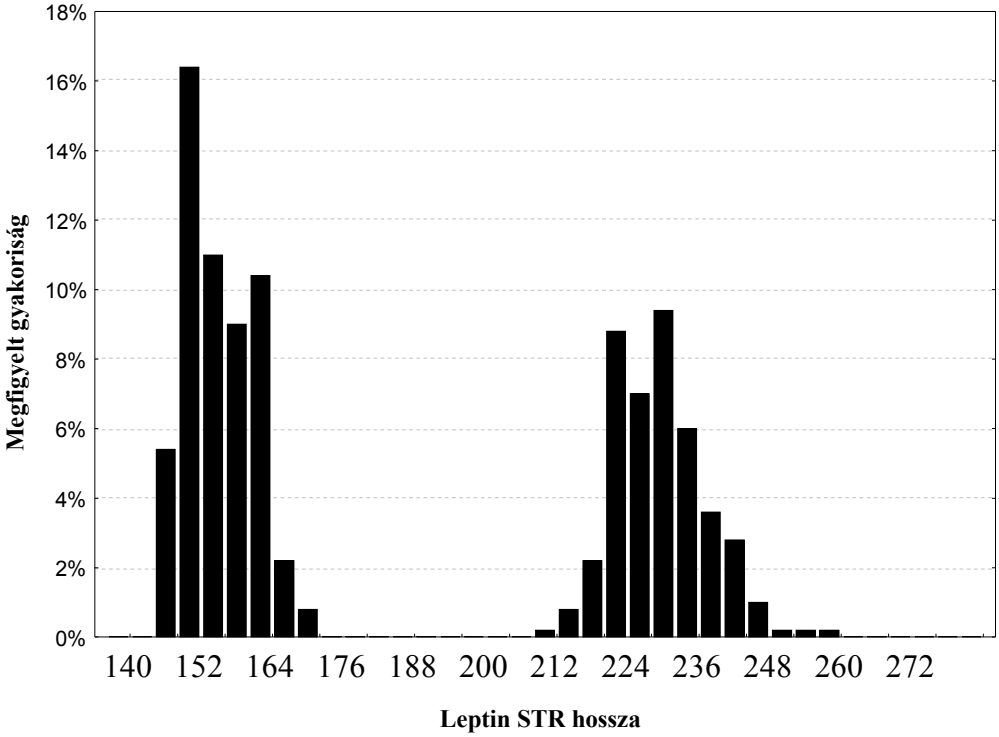
A vizsgált mintákhoz tartozó esetek klinikai jellemzőit a 14. táblázat mutatja.

14. táblázat Leptin hosszpolimorfizmus vizsgálatban elemzett csoportok klinikai jellemzői

Klinikai jellemző	Kontroll n=88	Praeeclapsia n=79	HELLP szindróma n=77	p érték
Anyai kor (év)	28,1	29	28,5	>0,05
Terhességi kor (hét)	40 (39-40)	32 (25-39)	32 (23-39)	<0,05
Primiparitás	42 (47,7%)	38 (48,1%)	41 (53,2%)	>0,05
Szisztolés vérnyomás (mmHg)	110 (105-120)	170 (140-220)	160 (130-220)	<0,01
Diasztolés vérnyomás (mmHg)	70 (60-80)	104 (100-115)	102 (90-140)	<0,01

Mann-Whitney tesztet használtam a csoportok közötti különbségek összehasonlítására.

Fluoreszcens PCR-t és DNS fragmenthossz elemzés volt a leptin gén (TTTC)n négy nukleotidból álló mikroszatellita ismétlődési polimorfizmusának a vizsgálatához. A kapilláris elektroforézissel lehetőség volt 1 bázispár nagyságú eltérés kimutatására a jelölt DNS termékben. A vizsgált minták hossz szerinti eloszlását a 18. ábra mutatja.



18. ábra Leptin (TTTC)n mikroszatellita hossz megoszlása a vizsgált populációban

A vizsgált populáció a mikroszatellita tekintetében 2 csoportra különíthető el: rövid, azaz 190 bázispárnál rövidebb, illetve hosszú, azaz a 190, vagy annál hosszabb ismétlődési szakaszra. E tulajdonságot figyelembe véve elemeztem a mikroszatellitát. A kontroll, praeeclampsiás és HELLP szindrómás csoportok allél megoszlását a 15. táblázat mutatja.

15. táblázat Leptin gén rövid és hosszú mikroszatellita allélcsoportok megoszlás

Csoport	(TTTC)n allél		p érték
	I. csoport	II.csoport	
Kontroll (n=88)	130 (58,5%)	73 (41,5%)	0,9564[a]
Praeeclampsia (n=79)	92 (58,3%)	66 (41,7%)	0,3174[b]
HELLP szindróma (n=77)	81 (52,6%)	73 (47,4%)	0,2796[a]

[a]Khi-négyzet tesztet használtam a kontroll csoport összehasonlítva a praeeclampsiás, illetve a HELLP szindrómás esetekkel.

[b]Praeeclampsiás esetek a HELLP szindrómás csoporttal összehasonlítva.

Nem találtam eltérést az allél megoszlás tekintetében a vizsgált három csoport között.
A 16. táblázat mutatja a leptin (TTTC)n mikroszatellita genotípus megoszlást a három csoportban.

16. táblázat Leptin gén rövid és hosszú mikroszatellita csoport genotípus megoszlása

Csoport	Genotípus I/I	Genotípus I/II	Genotípus II/II	p érték
Kontroll (n=88)	35 (39,8%)	33 (37,5%)	20 (22,7%)	0,764[a]
Praeeclampsia (n=79)	29 (36,7%	34 (43,0%)	16 (20,3%)	0,227[b]
HELLP szindróma (n=77)	28 (36,4%)	25 (32,4%)	24 (31,2%)	0,468[a]

[a]Khi-négyzet tesztet használtam a kontroll csoport összehasonlítva a praeeclampsiás, illetve a HELLP szindrómás esetekkel.

[b]praeeclampsiás esetek a HELLP szindrómás csoporttal összehasonlítva.

A vizsgált genotípus nem mutatott szignifikáns eltérést a három csoport között. Legnagyobb eltérést a praeeclampsiás és a HELLP szindrómás csoport közötti megoszás mutatott (p= 0,227). A Hardy-Weinberg egyensúly feltételrendszere nem volt érvényes a vizsgált populációra.

4.2.2. Leptin receptor gén egynukleotidos génpolimorfizmus megoszlása egészséges és HELLP szindrómás betegek közt

Az immár hagyományosnak mondható restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus (RFLP) módszerrel szemben egy újfajta módszert dolgoztam ki LEPR négy egynukleotidos génpolimorfizmusának (SNP) a meghatározására. A terveztetett primer-próba rendszerhez optimalizáltam a PCR körülményeket azért, hogy elkülöníthetőek legyenek az egyes allélok. A vizsgálatban 4 SNP előfordulási gyakoriságát elemeztem 83 egészséges és 75 HELLP szindrómán átesett várandós DNS mintából.
Nem volt lényeges különbség az átlagos anyai életkorban, a primiparák számában és a dohányosok arányában a vizsgált két csoport között (17. táblázat).

17. táblázat Leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmus vizsgálatába bevont személyek klinikai jellemzői

	Egészséges várandós n=83	HELLP szindrómás n=75
Átlagéletkor (év)	31,76 ± 3,93	30,08 ± 5,12
Terhesség előtti BMI (kg/m^2)	23,29 ± 3,88	25,99 ± 4,29
Primiparitás	33 (40%)	43 (57%)
Szisztolés vérnyomás (mmHg)	121,8 ± 11,2	155,4 ± 19,4
Diasztolés vérnyomás (mmHg)	77,3 ± 7,9	97,8 ± 12,8
Terhességi kor (hét)	39,63 ± 1,87	31,2 ± 3,72
Újszülött súlya (gramm)	3504,76 ± 426,2	1431,38 ± 700
Méhen belül növekedésben retardált	0%	30 (40%)
Dohányzás	6 (7%)	5 (7%)

A 18. táblázat mutatja a vizsgált négy egynukleotidos génpolimorfizmus allél eloszlását. Nem volt lényeges különbség az allélok eloszlásában. A LEPR c.326A>G esetében az A allél gyakorisága 73,0% volt a HELLP szindrómás és 77,0% az egészséges csoportban. A LEPR c.668A>G eloszlása szintén hasonló volt, az A allél 55,0% volt a HELLP szindrómásokban és 58,0% a kontroll csoportban. A LEPR c.1968G>C esetén a G allél gyakorisága 80,0% volt a HELLP szindrómás betegekben és 84,0% az egészségeseknél. A G allél gyakorisága HELLP szindrómában 38,0% és az egészséges csoportnál 32,0% volt az c.3024A>G egynukleotidos génpolimorfizmus esetében.

18. táblázat Allél gyakoriság a leptin receptor gén (LEPR) négy polimorfizmusában

	n	1[a]	2[a]	χ^2 (P érték)	Odds arány (95% CI)
LEPR c.326A>G					
Kontroll	83	128 (77%)	38 (23%)	0,60 (p=0,437)	0,81 (0,49-1,36)
HELLP szindróma	75	110 (73%)	40 (17%)		
LEPR c.668A>G					
Kontroll	83	97 (58%)	69 (42%)	0,30 (p=0,578)	0,88 (0,56-1,38)
HELLP szindróma	75	83 (55%)	67 (45%)		
LEPR c.1968G>C					
Kontroll	83	26 (16%)	140(84%)	1,01 (p=0,313)	0,74 (0,41-1,32)
HELLP szindróma	75	30 (20%)	120 (80%)		
LEPR c.3024A>G					
Kontroll	83	53 (32%)	113 (68%)	1,28 (p=0,258)	0,76 (0,48-1,2)
HELLP szindróma	75	57 (38%)	93 (62%)		

[a]Az allél 1 és 2 az első és a második nukleotidot jelöli az adott egynukleotidos génpolimorfizmust illetően.

A 19. táblázat mutatja a genotípus gyakoriságokat. Nem volt szignifikáns különbség a genotípusok eloszlásában a vizsgált két csoportot illetően.

19. táblázat Genotípus gyakoriság a leptin receptor gén (LEPR) négy egynukleotidos polimorfizmusában

	n	11[a]	12[a]	22[a]	χ^2 (P érték)
LEPR c.326A>G					
Kontroll	83	54 (65%)	20 (24%)	9 (11%)	4,83 (p=0,089)
HELLP szindróma	75	40 (53%)	30 (40%)	5 (7%)	
LEPR c.668A>G					
Kontroll	83	32 (38%)	33 (40%)	18 (22%)	0,48 (p=0,785)
HELLP szindróma	75	25 (33%)	33 (44%)	17 (23%)	
LEPR c.1968G>C					
Kontroll	83	2 (2%)	22 (27%)	59 (71%)	1,01 (p=0,602)
HELLP szindróma	75	3 (4%)	24 (32%)	48 (64%)	
LEPR c.3024A>G					
Kontroll	83	40 (48%)	33 (40%)	10 (12%)	3,66 (p=0,16)
HELLP szindróma	75	26 (35%)	41 (54%)	8 (11%)	

[a]Az allél 1 és 2 az első és a második nukleotidot jelöli az adott egynukleotidos génpolimorfizmust illetően.

A LEPR c.326A>G GA genotípus közel kétszer olyan gyakran fordult elő HELLP szindrómában, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (40,0% vs. 24,0%; p=0,089).

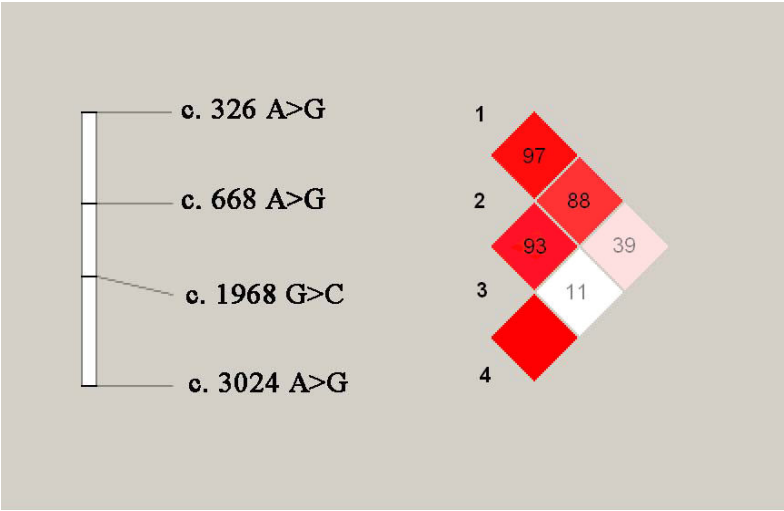
A Hardy-Weinberg törvény érvényesnek mutatkozott a tanulmányozott négy LEPR egynukleotidos génpolimozfizmus esetében (20. táblázat).

A négy egynikleotidos génpolimorfizmus kapcsoltsági viszonyát, azaz az esetleges együttöröklődést elemezve erős kapcsolat volt az alábbi egynukletotidos génpolimorfizmus pár esetén: c.326A>G és a c.668A>G (D'=0,974), c.668A>G és a c.1968G>C (D'=0,934) között a c.326A>G és c.1968G>C (D'=0,885) között. Gyenge együttes előfordulás volt a c.3024A>G és c.668A>G pár esetén (D'=0,111). Az egynukleotidos génpolimorfizmusok együttkapcsoltságát a 19. ábra szemlélteti.

20. táblázat Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálata a LEPR négy egynukleotidos génpolimorfizmusra

		Allél frequencia		HW
LEPR SNP	**% vizsgálva**	**Major**	**Minor**	**P-érték**
c.326 A>G	100	A: 0.753	G: 0.247	0.06127
c.668 A>G	100	A: 0.57	G: 0.43	0.06276
c.1968 G>C	100	G: 0.823	C: 0.177	0.82495
c.3024 A>G	100	G: 0.652	A: 0.348	0.68796

Az első nukleotid jelzi a vad típust, a második a mutáns változatot. A Hardy-Weinberg egyensúlyi törvény mefelelésének valószínűsége a HW oszlop jelzi.



19. ábra Haplowiev elemzés a vizsgált SNP-k kapcsoltságára

5. MEGBESZÉLÉS

5.1.1. Lepényi génexpresszió praeeclampsiában és HELLP szindrómában

Korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában a lepény szerepe a betegség és a klinikai tünetek kialakulásában nem kétséges. Jelenleg az egyetlen definitív terápiájuk a magzat és a lepény világrahozatala. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy mindkét betegség kórtana kapcsolatba hozható a nem megfelelő lepényi fejlődéssel, mely így elégtelen lepényi keringést eredményez, csökkent trophoblast mennyiséggel, kóros villus morphológiával és fokozott oxidatív stresszel a lepényben. A lepényi stressz következtében fokozott mennyiségű syncytiotrophoblast törmelék és érképződést gátló molekula jut a keringésbe, amelyek feltételezhetően szerepet játszanak fokozott szisztémás gyulladásos válasz kialakulásában az anyai szervezetben, a laboratóriumi jelek és a klinikai tünetek megjelenéséhez vezetve [25,26,113-116].

A terminusban lévő praeeclampsiával szövődött terhességekben a lepény morphológiai eltérése kevésbé nyilvánvaló, mint korai praeeclampsiával szövődött terhességek esetén [23,117]. Ez a megfigyelés hasonlóságot mutat a génexpessziós vizsgálattal kapott eredményekkel a betegség ezen két fenotípusát vizsgálva [106]. Meglepő, hogy függetlenül a hematológiai állapot nagymértékű különbségétől, a lepény morphológiai eltérése korai HELLP szindrómában hasonló a korai praeeclampsiával szövődött esetekkel [118]. A korábbi vizsgálatokkal összhangban ebben a mintaanyagban is hasonló szövettani eltérés volt megfigyelhető korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában [98]. Feltételezhető, hogy azonos noxa indítja el a kórtani folyamatot e két szindróma korai súlyos formáiban, mely közös klinikai megjelenést eredményeznek.

A jelen vizsgálatsorozatban elsőként vizsgáltam a lepény teljes genom expressziós mintázatát korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában [119]. A vizsgálat során a terhességi korban illesztett kontroll lepények expressziós mintázatát referenciának véve határoztam meg az eltérő aktivitást mutató géneket praeeclampsiában és HELLP szindrómában. Korábban több tanulmány vizsgálta a genom szintű expressziós változásokat praeeclampsiában [106-112,120-122], azonban csak limitált számú tanulmány hasonlította össze a géntranszkripciót korai paeeclampsiásoktól és terhességi

korban illesztett kontrolloktól vett lepényekben [106,107,111], mint ahogy azt a jelen vizsgálatban tettem. Kiemelendő, hogy nemcsak a tünetek megjelenésekori terhességi kor volt figyelembe véve, de a mitavétel helye és a szülés módja is, amely esetlegesen hatással lehet a lepényben a gén expresszióra. Wyatt és mtsai ugyanis kimutatták [96], hogy az oxigénhiánnyal kapcsolatos gének aktivitása a lepényben függ a mintavétel helyétől, ami összhangba hozható a villusokban lévő eltérő perfúzióval, Cindrova-Davies és mtsai pedig azt mutatták ki [123], hogy méh összehúzódása és a nem megfelelő lepényi véráramlás a szülés alatt oxidatív stesszt, NF-kB útvonal aktivációt, proinflammatórikus citokin expressziót és apoptózist eredményez. Ezen változások mértéke pedig kapcsolatot mutat a szülés időtartamával. Azért, hogy csökkentsem a mintavételből és a mintavételi helyből származó hibaforrásokat minimalizáljam, császármetszésből vett lepényekből mindig a centrális cotyledonok lettek vizsgálva.

Lepényi génexpressziós-változás praeeclampsiában:

Vizsgálatom során 350 gén eltérő expresszióját mutattam ki praeeclampsiában. Ezek között több gén került már közlésre korábbi microarray tanulmányokban, melyek azonos irányú expressziós változásukat figyelték meg praeeclampsiában (8. táblázat). Kiemelendő, hogy a jelen anyaggal legtöbb átfedést mutató tanulmányok a genomszintű lepényi expressziót ugyancsak korai praeeclampsiásoknál és terhességi kor szerint illesztett kontrolloknál hasonlították össze, és ezen betegcsoportok klinikai és demográfiai jellemzői a jelen csoportjaim jellemzőivel voltak hasonlók [107,110,111]. Ezen tanulmányok eredményeinek hasonlósága jelzi a besorolás során a homogén betegcsoportok kialakításának és a praeeclampsia különböző alcsoportjainak megkülönböztetésének fontosságát.

Feltételezések szerint korai praeeclampsiában a trophoblast működése megváltozott. Ezzel összhangban, a jelen anyagban is több, a syncytiotrophoblast sejtben (azaz az anya-magzati határfelszínen termelődő) aktiválódó gén (leptin, hCG, βLH, inhibin A, siglec-6, PAPP-A2, TREM1, sFLT) működése is eltért. Tágabb értelemben olyan biológiai folyamatok, molekuláris funkciók és utak túlműködése volt megfigyelhető praeeclampsiában, melyek kapcsolatba hozhatóak az elégtelen lepényi keringéssel és lepényi oxidatív stresszel, melyek meghatározó szerepet játszanak a korai praeeclampsia kialakulásában [25,113,115].

Lepényi génexpressziós-változás HELLP szindrómában:

Eddig két közlemény vizsgálta a lepényi génexpressziós változásokat HELLP szindrómában, gyulladásos citokin – citokin-receptor array-t, valamint több gén expressziós elemzési módszert (SAGE) felhasználva [121,124]. Először vizsgáltam teljes lepényi transzkripciót HELLP szindrómában. 554 gén eltérő szabályzását figyeltem meg korai kontroll csoporthoz képest, és ezek közül a legtöbb gén praeeclampsiában is eltérést mutatott, megegyező irányú változással. Ez egyaránt következménye lehet a hasonló lepényi kórélettani folyamatok lejátszódásának a két szindrómában, melyek eredménye lehet a hasonló lepényi morphológiai és klinikai változások kialakulása a két betegségben. Itt azonban meg kell jegyezni, hogy mindegyik HELLP szindrómás betegnél a súlyos praeeclampsia tünetei szintén detektálhatóak voltak és teljes genom expressziós vizsgálatok szükségeltetnek a HELLP szindróma azon eseteiben, ahol a laboratóriumi vizsgálatok eredményei kórosak, de klinikai tünetként nem jelentkezik magasvérnyomás és fehérjevizelés.

Praeeclampsiával összehasonlítva a HELLP szindrómában több gén (554 v. 350) lepényi aktivitása mutatott eltérést és ezen eltérések is nagyobb mértéket mutattak, jelezve a HELLP szindrómában a fokozottabb kóros folyamatok jelenlétét. A mindkét betegcsoportban eltérő expresszivitású géneket összehasonlítva 224 gén esetében találtam azonos irányú eltérést. Meglepő volt, hogy a klinikai jellemzőiben eltérést mutató praeeclampsia és HELLP szindróma esetén nem sikerült azonosítani olyan gént, mely ellentétes irányba változott volna. Magyarázat lehet, hogy a HELLP szindrómás csoportban lévő minden várandós esetén a praeeclampsia tünetei is megtalálhatóak voltak.

A microarray vizsgálat során a praeeclampsia és HELLP szindróma között legnagyobb expressziós eltérést mutató gének közül ki qRT-PCR-rel az ARHGEF4 és az MGST1 gének eltérő aktivitását validáltuk. A MGST1 (mikroszómális glutation S- transzferáz-1) fokozottabb expressziója feltehetőleg kompenzáció eredménye így biztosítva egy fokozottabb antioxidáns hatást a kifejezett lepényi stresszel szemben HELLP szindrómában. Az ARHGEF4 fokozott expresszivitása (mely egy Rho GTP-áz fontos szabályozó fehérjéje), azért lehet érdekes, mert eddig úgy ismert, hogy egyedül az agyban expresszálódik és a lepényben a szerepe még nem ismert [125].

Az eltérő expressziójú gének listája alapján megnéztem, hogy mely biológiai folyamatok voltak eltérőek a kontroll csoporthoz képest. Mindkét betegségben legfőképpen a „multicellular", „developmental", „differentiation" és a „signaling" folyamatok aktivitásának túlsúlya volt megfigyelhető. A KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) adatbázis segítségével végzett elemzés kimutatta, hogy a „citokin – citokin-receptor" jelátviteli útvonal csak HELLP szindrómában mutatott szignifikáns eltérést de praeeclampsiában nem. Ez a jelátviteli útvonal több eltérően expresszálódott gént mutatott ki mindkét betegségtípus esetén, mint például a LEP, INHBA, FLT1 és ACVRL1, melyeknek a praeeclampsiában már közölték eltérő aktivitását. Az előbbieken túl a KIT, CD70, GHR, CCL24, OSMR, CX3CR1 és a PDGFRA volt eltérő HELLP szindrómában. A CD70 (citokin, mely szerepet játszik az aktivált T sejtek proliferációjában és fokozza a citolitikus T sejtek utánpótlását) fokozott volta, az OSMR (citokin-receptor, mely az oncostatin M és az interleukin 31 jelzőmolekulák jelátvitelében játszik szerepet) és a CCL24 (citokin mely gátló hatású a monocitákra és az aktivált T lymphocitákra) csökkent jelenléte [126] szintén jelez egy kifejezettebb, szélesebb gyulladásos választ HELLP szindrómában praeeclampsiához képest.

Ismert biomarkerek expressziója a lepényben korai paeeclampsiában és HELLP szindrómában:

Egy korábbi microarray tanulmány első trimeszterben vett CVS mintákból vizsgálta a genomszintű lepényi génexpressziót normál terhesek és praeeclampsiások között és általános gén-alulexpressziót detektált a betegek lepénymintáiban [127]. Ezzel összhangban a legtöbb első trimeszteri lepényi biomarker fehérjének alacsonyabb volt az anyai keringésben a koncentrációja (PP13, PIGF, PAPP-A, ADAM12) a kontrollokhoz képest [91,128-131]. Az ismert lepényi biomarkerek közül paeeclampsiában hét gén esetében (leptin, inhibin A, activin A, sFLT1, hCG, és kortikotropin–releasing faktor, inzulin szerű növekedési faktor-1) expressziós eltérést lehetett detektálni a jelen vizsgált HELLP szindrómás és praeeclampsiás csoportokban is. Megjegyzendő, hogy mind a 7 gén esetén a lepényi expresszióváltozás iránya megegyezett a fehérje-koncentrációik változásának irányával az anyai keringésben praeeclampsiás betegek esetében [91,128,129]. Mivel az eredmények alapján ezen

biomarkereknek mind praeeclampsiában, mind pedig HELLP szindrómában hasonlóan változnak, felvetődik, hogy hasonlóan használhatók lehetnek HELLP szindróma előrejelzésére is. Mivel az eredmények a harmadik trimeszterből származtak, ezért nem lehet következtetést levonni az eredményekből a gének első trimeszteri expresszióját illetően.

5.1.2. Fehérjeexpressziós vizsgálat syncytiotrophoblaston

Mivel az DNS chip alapú vizsgálatok és a PCR alapú validálási vizsgálat emelkedett expressziós szintet mutattak béta-LH és a béta-hCG esetén praeeclampsiában és HELLP szindrómában, megvizsgáltam, hogy ez a jelenség fehérjeszinten is megfigyelhető-e. Szöveti microarray-el a vizsgált betegcsoportok minden tagjától levett mintákból szöveti blokkok készítése után, azokat párhuzamosan megfestve, és a metszeteket digitalizálva elemeztem. A microarray és qRT-PCR eredményeivel egybevágóan ezen két fehérjére fokozott festődés volt kimutatható a syncytiotrophoblast sejtekben korai praeeclampsiában és HELLP szindrómában. Egy korábbi tanulmány normál és praeeclampsiás lepényekből indított trophoblast sejttenyészetekben hasonló hCG expresszióbeli különbségeket detektált [17]. Leptin esetében egy korábbi microarray tanulmány [110] már közölte, hogy fehérje szinten is túltermelődése figyelhető meg ennek a fehérjének a syncytiotrophoblastban [132,133].

5.2.1. A leptin szerepe preeclampsiában és HELLP szindrómában

A leptin gén (TTTC)n hosszpolimorfizmus

Az array vizsgálat szerint HELLP szindrómában a leptin transzlációját kódoló mRNS transzkriptje volt a legnagyobb koncentrációban jelen a kóros mintákban. Megnéztem ezért, hogy a mokelula esetleges eltérő szerkezete, vagy a jelátvitelében szerepet játszó leptin receptort kódoló génszakasz eltérő génstruktúrája kapcsolatba hozható-e a betegséggel.

A leptin gén az egér Ob (obese) génjének megfelelő homológ, mely a humán 7-es kromoszóma hosszú karjának 31. régiójában helyezkedik el [134]. A leptin fehérjét meghatározó génrő 167 aminosav hosszú leptin fehérje szintetizálódik

(http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEP&search=lep), mely az energia homeosztázis szabályozása mellett fontos szerepet tölt be a különböző immunológiai szabályozásban is [135]. A gén több szövetben is expresszálódik, a keringésbe kerülő leptin fő forrása nem terhes állapotban a zsírszövet [136], várandós nők keringésében található leptin termelésében viszont a lepény játszik fontos szerepet: az anyai keringésbe kerülő leptin 95%-át termeli [137]. A terhesség előrehaladtával az anyai keringésben a leptin koncentrációja emelkedik, majd a szülést követően meredeken csökken [138]. Mind a fehérje szintje, mind pedig az azt kódoló mRNS koncentrációja az anyai keringésben eltér a normálistól kóros terhességek, mint például praeeclampsia esetében [41-44]. Ismert, hogy az anyai keringésben magasabb a leptin koncentráció praeeclampsiában és HELLP szindromában [139]. Praeeclampsiával szövődött terhességek esetében már jóval a tünetek jelentkezése előtt fokozódik a keringésben a szintje [45,46]. Felvetődik a kérdés, hogy az emelkedett leptin-szintek mögött nem a metabolikus zavar következtében fellépő fokozott zsírsejt-termelés áll. Haugen és mtsai nem találtak eltérést a normál és a praeeclampsia tüneteit mutató várandósok zsírszöveti RNS expressziója között, és arra a következtetésre jutottak, hogy a lepény állhat a fokozott termelés mögött [140].

Grosfeld és mtsai mutatták ki, hogy a leptin gén promoter régióban lévő mikroszatellita hatással van a génexpresszióra [133], egy másik tanulmány pedig kapcsolatot talált a leptin gén polimorfizmusa és a leptin szérum szintek között [141]. Általánosságban a leptin és a leptin receptor gének mutációi befolyásolják a táplálék és az energia felhasználást, hatással vannak a neuroendokrin és immunfunkcióra, a cukor és a zsír metabolizmusra [142]. Felvetődött, hogy ezen polimorfizmusok játszanak-e szerepet a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásában.

A LEP génről több polimorfizmust írtak eddig le. Ezek közt ismert az úgynevezett hosszpolimorfizmus, amely egy ismétlődő TTTC szakasz következtében eltérő hosszúságú kódoló génszakaszt eredményez. Az irodalom szerint a populáció egy 160 bázispárnál rövidebb illetve annál hoszabb ismétlődő szakaszt hordozó genotípusra bontható [143]. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a rövid és a hosszú ismétlődési szakasz határa a vizsgált tetranukleotid tekintetében 190 bázispárnál húzható meg. Meghatározásra került az anyai genotípus tekintetében a hosszpolimorfizmus hordozóság, de nem volt eltérés a normál és a HELLP szindrómás nők esetében. Az

eredmény alapján a leptin gén anyai TTTC hosszpolimorfizmusának nincs prognosztikai értéke praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulására. A tanulmányban az apai LEP gént nem volt vizsgálva, ezért nem zárható ki, hogy a lepényben az apától öröklött LEP gén aktív, és az apai LEP hosszpolimorfizmusbeli különbségek aktivitásbeli különbséget okozhatnak praeeclampsiában és HELLP szindrómában.

Leptin recepor szerepe a leptin jelátviteli folyamatában

A leptin jelátvitelében meghatározó szereppel a leptin receptor (LEPR) bír. Csaknem minden szervben előfordul, mutatva, hogy a leptin lényeges szerepet játszik alapvető életfolyamatok szabályozásában. Az angiogenezisre és a keringési betegségek kialakulására is bizonyítottan hatással van [142]. Rigó és mtsai ezen gén polimorfizmusát vizsgálva megállapították, a A223G polimorfizmus esetén a G allél jelenléte kapcsolatot mutatott a praeeclampsiában gyakrabban előforduló inzulin rezisztencia kialkulásával [144,145].

HELLP szindrómás betegeknél korábban még nem került meghatározásra a LEPR polimorfizmusa, ezért vizsgáltam ezen gén egynukleotidos polimorfizmusának kapcsoltságát HELLP szindrómában. Meghatároztam a LEPR gén négy kódoló SNP polimorfizmusát HELLP szindrómás és egészséges várandós nők csoportjában. Az eddig alkalmazott PCR-RFLP, Mass Array és TaqMan módszerek helyett munkám során elsőként alkalmaztam valósidejű PCR olvadási görbe analízist.

Az irodalomban a legtöbb tanulmány a c.668A>G SNP előfordulási gyakoriságával foglalkozik. A variáns megváltozott jelzés kapacitással és magasabb leptin szintekkel jár együtt [146,147]. Ezen egynukleotidos génpolimorfizmusra kapott eredmények összhangban vannak a már publikált praeeclampsiás magyar populációból származó eredményekkel, ahol is az előfordulási gyakoriságok hasonló eloszlást mutattnak [144]. A LEPR c.326A>G SNP-t korábban a fertőzésekkel és a stresszel hozták összefüggésbe [148,149]. Érdekes módon a variáns jelentősen gyakrabban fordul elő a nemzetközi és a jelen anyagban is (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR&search=lepr). Csupán néhány publikáció jelent meg a LEPR további egynukleotidos génpolimorfizmusának előfordulásával kapcsolatban. A vizsgált másik két SNP-t nem tanulmányozták még terhességben, viszont a Genecards

adatbázisban megadott előfordulási gyakoriságuk az vizsgálati eredményekkel hasonló eloszlást mutatott.

Vizsgálataim során nem találtam lényeges különbséget a két vizsgált csoportban a négy LEPR SNP allél, genotípus és haplotípus előfordulási gyakoriságában. Kiemelendő azonban, hogy a LEPR c.326A>G előfordulási gyakorisága közel szignifikánsan magasabbnak bizonyult HELLP szindrómában, ami alapján feltételezhető, hogy a HELLP szindróma kialakulásának pathomechanizmusában is szerepet játszhat.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Genomikai szinten eltérés van az egészséges és a kóros terhességekből származó lepényszövet expressziós mintázatában.

2. A lepényi génexpresszió korai praeeclampsia és korai HELLP szindróma esetén nagy átfedést mutat.

3. Korai HELLP szindróma esetén a lepényi génexpresszió változása nagyobb mértékű, mint korai praeeclampsia esetén.

4. A praeeclampsiában használatos lepényi biomarkerek HELLP szindróma kialakulásának előjelzésére is használhatók lehetnek.

5. A leptin gén hosszpolimorfizmusa a kaukázusi populációban a 190 bp-határ szerint rövid és hosszú csoportra osztható.

6. A leptin gén anyai hosszpolimorfizmusa nem hozható összefüggésbe a praeeclampsia és HELLP szindróma kialakulásával.

7. A leptin receptor vizsgált egynukleotidos polimorfizmusai nem hozhatók összefüggésbe a HELLP szindróma kialakulásával.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Elsőként elemeztem a lepényi transcriptome-t HELLP szindrómában. Korai praeeclampsiában 350, míg korai HELLP szindrómában 554 gén aktivitásának változását detektáltam a lepényszövetben.

HELLP szindrómában és praeeclampsiában 224 gén azonos irányú eltérést mutatott aktivitásában a kontrollhoz képest, ami felvetette az azonos lepényi szabályozási folyamatok megváltozását a két szindrómában.

A legnagyobb mértékben változó aktivitású gének között volt a leptin, valamint a hCG és LH béta alegysége mindkét szindrómában. Ezen gének aktivitásbeli különbségét RNS szinten és fehérjeszinten is igazolni lehetett kvantitatív valós idejű PCR-rel, illetve TMA-k immunfestésével.

A celluláris szabályozási útvonalak számítógépes elemzése alapján is magába foglaló „citokin-citokin útvonal" mutatott szignifikáns különbséget praeeclampsia és HELLP szindróma között.

HELLP szindrómában a leptin gén túlműködésének hátterében hosszpolimorfizmusbeli különbséget nem lehetett detektálni az anyai oldalon.

A „citokin-citokin útvonal" további vizsgálata során a leptin receptor egynukleotidos génpolimorfizmusait tanulmányoztam, de nem volt egyetlen vizsgált egynukleotidos génpolimorfizmus esetében sem gyakoribb az előfordulás HELLP szindrómában.

8. SUMMARY

Placental samples with HELLP syndrome were examined at the transcript level. In early-onset preeclampsia there were 350 genes and in HELLP syndrome 554 genes were found that were altered comparing controls.

224 genes were differentially expressed in both preeclampsia and HELLP syndrome. They also had the same direction in both diseases, which raises the possibility of the change of the same regulatory networks.

There were leptin, β-hCG and β-LH among genes with the highest fold change rate in both pregnancy associated diseases. The expression differences of these genes were confirmed either at the RNA level by quantitative real time PCR and at protein level by tissue microarray. Network analysis showed deviation in the cytokine-cytokine signal pathway between preeclampsia and HELLP syndrome.

In HELLP syndrome, the elevated leptin expression was not associated with the leptin microsatellite polymorphism on the maternal side.

I examined the leptin receptor that is the main signal transducer of leptin signalling, moreover it is also part of the cytokine-cytokine system. Determining four SNPs of the leptin receptor, there were no significant correlations with HELLP syndrome.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Papp Z: A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. ed 3, Semmelweis Kiadó, 2007.

2. Bischof P, Irminger-Finger I: The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. Int J Biochem Cell Biol 2005;37:1-16.

3. Aplin JD: Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. Int J Dev Biol 2010;54:323-329.

4. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM: Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. Hum Reprod 2010;25:862-873.

5. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR: Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Hum Reprod Update 2008;14:335-344.

6. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH: Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? J Clin Invest 1997;99:2139-2151.

7. Zhou Y, Genbacev O, Fisher SJ: The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. Ann N Y Acad Sci 2003;995:73-83.

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

9. Janatpour MJ, Utset MF, Cross JC, Rossant J, Dong J, Israel MA, Fisher SJ: A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation. Dev Genet 1999;25:146-157.

10. Bamberger AM, Bamberger CM, Aupers S, Milde-Langosch K, Loning T, Makrigiannakis A: Expression pattern of the activating protein-1 family of transcription factors in the human placenta. Mol Hum Reprod 2004;10:223-228.

11. Tranquilli AL, Landi B: The origin of pre-eclampsia: from decidual "hyperoxia" to late hypoxia. Med Hypotheses 2010;75:38-46.

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

13. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I: Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. BJOG 1986;93:1049-1059.

14. Salafia CM, Minior VK, Pezzullo JC, Popek EJ, Rosenkrantz TS, Vintzileos AM: Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features. Am J Obstet Gynecol 1995;173:1049-1057.

15. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P: Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. Placenta 2004;25:127-139.

16. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC: Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. Reproduction 2009;138:177-184.

17. Newhouse SM, Davidge ST, Winkler-Lowen B, Demianczuk N, Guilbert LJ: In vitro differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia. Placenta 2007;28:999-1003.

18. Melchiorre K, Leslie K, Prefumo F, Bhide A, Thilaganathan B: First-trimester uterine artery Doppler indices in the prediction of small-for-gestational age

pregnancy and intrauterine growth restriction. Ultrasound Obstet Gynecol 2009;33:524-529.

19. Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD: Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. BJOG 2006;113:580-589.

20. Romero R, Espinoza J, Gotsch F, Kusanovic JP, Friel LA, Erez O, Mazaki-Tovi S, Than NG, Hassan S, Tromp G: The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome. BJOG 2006;113 Suppl 3:118-135.

21. Than NG, Vaisbuch E, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Erez O, Yeo L, Mittal P, Hupuczi P, Varkonyi T, Hassan SS, Papp Z, Romero R: Early-onset preeclampsia and HELLP syndrome: an overview. Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease 2010.

22. Roberts JM, Hubel CA: The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. Placenta 2009;30 Suppl A:S32-37.

23. Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B: The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. Am J Obstet Gynecol 2003;189:1173-1177.

24. Hutchinson ES, Brownbill P, Jones NW, Abrahams VM, Baker PN, Sibley CP, Crocker IP: Utero-placental haemodynamics in the pathogenesis of pre-eclampsia. Placenta 2009;30:634-641.

25. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC: Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. Placenta 2009;30:473-482.

26. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS: Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. Placenta 2009;30 Suppl A:S43-48.

27. Ness RB, Sibai BM: Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2006;195:40-49.

28. 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: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 2004;350:672-683.

29. Baumwell S, Karumanchi SA: Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. Nephron Clin Pract 2007;106:c72-81.

30. Irani RA, Xia Y: The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. Placenta 2008;29:763-771.

31. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-Tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine RJ, Karumanchi SA: A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. J Matern Fetal Neonatal Med 2008;21:9-23.

32. Cole LA: Biological functions of hCG and hCG-related molecules. Reprod Biol Endocrinol 2010;8:102.

33. Malassine A, Cronier L: Hormones and human trophoblast differentiation: a review. Endocrine 2002;19:3-11.

34. Handwerger S, Freemark M: The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. J Pediatr Endocrinol Metab 2000;13:343-356.

35. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Kakui K, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S: Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. Endocrine 2002;19:65-71.

36. Weissgerber TL, Wolfe LA: Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. Appl Physiol Nutr Metab 2006;31:1-11.

37. Gravett CP, Buckmaster JG, Watson PT, Gravett MG: Elevated second trimester maternal serum beta-HCG concentrations and subsequent adverse pregnancy outcome. Am J Med Genet 1992;44:485-486.

38. El-Baradie SM, Mahmoud M, Makhlouf HH: Elevated serum levels of interleukin-15, interleukin-16, and human chorionic gonadotropin in women with preeclampsia. J Obstet Gynaecol Can 2009;31:142-148.

39. Gurbuz A, Karateke A, Mengulluoglu M, Gedikbasi A, Ozturkmen M, Kabaca C, Sahinoglu Z: Can serum HCG values be used in the differential diagnosis of pregnancy complicated by hypertension? Hypertens Pregnancy 2004;23:1-12.

40. Raty R, Koskinen P, Alanen A, Irjala K, Matinlauri I, Ekblad U: Prediction of pre-eclampsia with maternal mid-trimester total renin, inhibin A, AFP and free beta-hCG levels. Prenat Diagn 1999;19:122-127.

41. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K: Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:3225-3229.

42. McCarthy JF, Misra DN, Roberts JM: Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. Am J Obstet Gynecol 1999;180:731-736.

43. Teppa RJ, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM: Free leptin is increased in normal pregnancy and further increased in preeclampsia. Metabolism 2000;49:1043-1048.

44. Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y: Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients. Endocr J 2008;55:565-573.

45. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, Johnson MR: Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. Hum Reprod 2000;15:2033-2036.

46. Samolis S, Papastefanou I, Panagopoulos P, Galazios G, Kouskoukis A, Maroulis G: Relation between first trimester maternal serum leptin levels and body mass index in normotensive and pre-eclamptic pregnancies--role of leptin as a marker of pre-eclampsia: a prospective case-control study. Gynecol Endocrinol 2010;26:338-343.

47. Obiekwe BC, Sturdee D, Cockrill BL, Chard T: Human placental lactogen in pre-eclampsia. BJOG 1984;91:1077-1080.

48. Myatt L: Placental adaptive responses and fetal programming. J Physiol 2006;572:25-30.

49. Mori T, Shinohara K, Wakatsuki A, Watanabe K, Fujimaki A: Adipocytokines and endothelial function in preeclamptic women. Hypertens Res;33:250-254.

50. Medawar P: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp Soc Exp Biol 1953;7:320-338.

51. Shimamura M, Ohta S, Suzuki R, Yamazaki K: Transmission of maternal blood cells to the fetus during pregnancy: detection in mouse neonatal spleen by immunofluorescence flow cytometry and polymerase chain reaction. Blood 1994;83:926-930.

52. Bonney EA, Matzinger P: The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. J Immunol 1997;158:40-47.

53. Mor G, Cardenas I: The immune system in pregnancy: a unique complexity. Am J Reprod Immunol 2010;63:425-433.

54. Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledee N: Tolerance to the foetal allograft? Am J Reprod Immunol 2010;63:624-636.

55. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S: Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. J Reprod Immunol 2010;85:93-98.

56. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A: Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. J Immunol 2003;171:2305-2313.

57. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. Int J Obes Relat Metab Disord 2002;26:1407-1433.

58. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M: The placenta cytokine network and inflammatory signals. Placenta 2006;27:794-798.

59. Perrier d'Hauterive S, Berndt S, Tsampalas M, Charlet-Renard C, Dubois M, Bourgain C, Hazout A, Foidart JM, Geenen V: Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: which role in implantation? Gynecol Obstet Invest 2007;64:156-160.

60. Than NG, Itakura A, Rao Ch V, Nohira T, Toth P, Mansell JP, Isaka K, Nishi H, Takayama M, Than GN: Clinical applications of pregnancy-related proteins--a workshop report. Placenta 2003;24 Suppl A:S60-64.

61. Than NG, Nagai A, Sharma S, Meiri H, Hauguel-de Mouzon S, Sadovsky Y, Rao Ch V: Application of pregnancy-related proteins in prenatal and tumor diagnostics--a workshop report. Placenta 2005;26 Suppl A:S110-113.

62. Toth P, Lukacs H, Gimes G, Sebestyen A, Pasztor N, Paulin F, Rao CV: Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review. Reprod Biol 2001;1:5-11.

63. Sherwin JR, Sharkey AM, Cameo P, Mavrogianis PM, Catalano RD, Edassery S, Fazleabas AT: Identification of novel genes regulated by chorionic gonadotropin in baboon endometrium during the window of implantation. Endocrinology 2007;148:618-626.

64. Wan H, Versnel MA, Leijten LM, van Helden-Meeuwsen CG, Fekkes D, Leenen PJ, Khan NA, Benner R, Kiekens RC: Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. J Leukoc Biol 2008;83:894-901.

65. Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C: The role of the leptin in reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol 2006;18:297-303.

66. Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P: The known and unknown of leptin in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2006;194:1537-1545.

67. Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT: Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. Jama 2002;287:1706-1709.

68. Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED: Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. Am J Reprod Immunol 1998;40:136-144.

69. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, Hiby SE, McMichael AJ, Loke YW, Braud VM: HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. Eur J Immunol 2000;30:1623-1631.

70. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P: Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. J Immunol 2000;164:6100-6104.

71. Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H: Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2003;188:473-479.

72. Zenclussen AC: Regulatory T cells in pregnancy. In Springer Semin Immunopathol. 2006:31-39.

73. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S, Sohn C: Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? Clin Immunol 2008;129:401-412.

74. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T: Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. Clin Exp Immunol 1999;117:550-555.

75. Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N: The Th2 cytokine environment of the placenta. Int Arch Allergy Immunol 2000;123:107-119.

76. Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, Bahlmann F, Klee A, Sohn C: Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. Am J Reprod Immunol 2007;57:277-286.

77. Pritchard JA, Weisman R, Jr., Ratnoff OD, Vosburgh GJ: Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. N Engl J Med 1954;250:89-98.

78. Weinstein L: Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1982;142:159-167.

79. Sibai BM: Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 2004;103:981-991.

80. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U: The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC Pregnancy Childbirth 2009;9:8.

81. Baxter JK, Weinstein L: HELLP syndrome: the state of the art. Obstet Gynecol Surv 2004;59:838-845.

82. Curtin WM, Weinstein L: A review of HELLP syndrome. J Perinatol 1999;19:138-143.

83. Sibai BM: The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): much ado about nothing? Am J Obstet Gynecol 1990;162:311-316.

84. Jamjute P, Ahmad A, Ghosh T, Banfield P: Liver function test and pregnancy. J Matern Fetal Neonatal Med 2009;22:274-283.

85. Audibert F, Friedman SA, Frangieh AY, Sibai BM: Clinical utility of strict diagnostic criteria for the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. Am J Obstet Gynecol 1996;175:460-464.

86. Martin JN, Jr., Rinehart BK, May WL, Magann EF, Terrone DA, Blake PG: The spectrum of severe preeclampsia: comparative analysis by HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet count) syndrome classification. Am J Obstet Gynecol 1999;180:1373-1384.

87. Nagy B, Hupuczi P, Papp Z: High frequency of methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype in Hungarian HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR. J Hum Hypertens 2007;21:154-158.

88. Nagy B, Savli H, Molvarec A, Varkonyi T, Rigo B, Hupuczi P, Rigo J, Jr.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analyses. Clin Chim Acta 2008;389:126-131.

89. Fakhouri F, Jablonski M, Lepercq J, Blouin J, Benachi A, Hourmant M, Pirson Y, Durrbach A, Grunfeld JP, Knebelmann B, Fremeaux-Bacchi V: Factor H, membrane cofactor protein, and factor I mutations in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. Blood 2008;112:4542-4545.

90. Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigo B, Szabo G, Papp Z, Linhares IM, Witkin SS: Mannose-binding lectin (MBL) codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome and pre-eclampsia-associated intrauterine growth restriction. Mol Hum Reprod 2007;13:281-285.

91. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O: Potential markers of preeclampsia--a review. Reprod Biol Endocrinol 2009;7:70.

92. Ruegg C, Tissot JD, Farmer P, Mariotti A: Omics meets hypothesis-driven research. Partnership for innovative discoveries in vascular biology and angiogenesis. Thromb Haemost 2008;100:738-746.

93. Sikaroodi M, Galachiantz Y, Baranova A: Tumor markers: the potential of "omics" approach. Curr Mol Med 2010;10:249-257.

94. Papp C, Szabo G, Toth-Pal E, Papp Z: [Fetal growth rate and its variations 1988/89]. Orv Hetil 1991;132:1865-1866, 1869-1870.

95. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. Obstet Gynecol 2002;99:159-167.

96. Wyatt SM, Kraus FT, Roh CR, Elchalal U, Nelson DM, Sadovsky Y: The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. Placenta 2005;26:372-379.

97. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Vartun A, Acharya G: Gene expression profile in labouring and non-labouring human placenta near term. Mol Hum Reprod 2008;14:61-65.

98. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheim R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J, Jr., Romero R, Papp Z: Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations

in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. Virchows Arch 2008;453:387-400.

99. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP: A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. Bioinformatics 2003;19:185-193.

100. Smyth GK, Yang YH, Speed T: Statistical issues in cDNA microarray data analysis. Methods Mol Biol 2003;224:111-136.

101. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. Behav Brain Res 2001;125:279-284.

102. Nagy B, Ban Z, Papp Z: The DNA isolation method has effect on allele drop-out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. Clin Chim Acta 2005;360:128-132.

103. Falcon S, Gentleman R: Using GOstats to test gene lists for GO term association. Bioinformatics 2007;23:257-258.

104. Tarca AL, Draghici S, Khatri P, Hassan SS, Mittal P, Kim JS, Kim CJ, Kusanovic JP, Romero R: A novel signaling pathway impact analysis. Bioinformatics 2009;25:75-82.

105. Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, Romero R: A systems biology approach for pathway level analysis. Genome Res 2007;17:1537-1545.

106. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Udagawa Y: Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia. Placenta 2007;28:487-497.

107. Reimer T, Koczan D, Gerber B, Richter D, Thiesen HJ, Friese K: Microarray analysis of differentially expressed genes in placental tissue of pre-eclampsia: up-regulation of obesity-related genes. Mol Hum Reprod 2002;8:674-680.

108. Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC: Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. Hypertension 2007;49:604-611.

109. Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA: Differential placental gene expression in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2008;199:566 e561-511.

110. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, Acharya G: Differential placental gene expression in severe preeclampsia. Placenta 2009;30:424-433.

111. Winn VD, Gormley M, Paquet AC, Kjaer-Sorensen K, Kramer A, Rumer KK, Haimov-Kochman R, Yeh RF, Overgaard MT, Varki A, Oxvig C, Fisher SJ: Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. Endocrinology 2009;150:452-462.

112. Heikkila A, Tuomisto T, Hakkinen SK, Keski-Nisula L, Heinonen S, Yla-Herttuala S: Tumor suppressor and growth regulatory genes are overexpressed in severe early-onset preeclampsia--an array study on case-specific human preeclamptic placental tissue. Acta Obstet Gynecol Scand 2005;84:679-689.

113. Roberts JM, Lain KY: Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. Placenta 2002;23:359-372.

114. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M: Pre-eclampsia. Lancet 2005;365:785-799.

115. Redman CW, Sargent IL: Latest advances in understanding preeclampsia. Science 2005;308:1592-1594.

116. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA: Preeclampsia and angiogenic imbalance. Annu Rev Med 2008;59:61-78.

117. Sebire NJ, Goldin RD, Regan L: Term preeclampsia is associated with minimal histopathological placental features regardless of clinical severity. J Obstet Gynaecol 2005;25:117-118.

118. Smulian J, Shen-Schwarz S, Scorza W, Kinzler W, Vintzileos A: A clinicohistopathologic comparison between HELLP syndrome and severe preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal Med 2004;16:287-293.

119. Varkonyi T, Nagy B, Fule T, Tarca AL, Karaszi K, Schonleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigo J, Jr., Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG: Microarray Profiling Reveals That Placental Transcriptomes of Early-onset HELLP Syndrome and Preeclampsia Are Similar. Placenta 2011;32S1:S21-S29.

120. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I: Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4299-4308.

121. Buimer M, Keijser R, Jebbink JM, Wehkamp D, van Kampen AH, Boer K, van der Post JA, Ris-Stalpers C: Seven placental transcripts characterize HELLP-syndrome. Placenta 2008;29:444-453.

122. Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP: Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. Placenta 2009;30:15-24.

123. Cindrova-Davies T, Yung HW, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, Burton GJ, Charnock-Jones DS: Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. Am J Pathol 2007;171:1168-1179.

124. Tranquilli AL, Landi B, Corradetti A, Giannubilo SR, Sartini D, Pozzi V, Emanuelli M: Inflammatory cytokines patterns in the placenta of pregnancies

complicated by HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, and low platelet) syndrome. Cytokine 2007;40:82-88.

125. Thiesen S, Kubart S, Ropers HH, Nothwang HG: Isolation of two novel human RhoGEFs, ARHGEF3 and ARHGEF4, in 3p13-21 and 2q22. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:364-369.

126. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T: Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. Nucleic Acids Res 2007;35:D26-31.

127. Farina A, Morano D, Arcelli D, De Sanctis P, Sekizawa A, Purwosunu Y, Zucchini C, Simonazzi G, Okai T, Rizzo N: Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks of gestation in women who develop preeclampsia later in pregnancy: implications for screening. Prenat Diagn 2009;29:1038-1044.

128. Than NG, Romero R, Hillermann R, Cozzi V, Nie G, Huppertz B: Prediction of preeclampsia - a workshop report. Placenta 2008;29 Suppl A:S83-85.

129. Baumann MU, Bersinger NA, Surbek DV: Serum markers for predicting pre-eclampsia. Mol Aspects Med 2007;28:227-244.

130. Stamatopoulou A, Cowans NJ, Matwejew E, von Kaisenberg C, Spencer K: Placental Protein-13 and Pregnancy-Associated Plasma Protein-A as First Trimester Screening Markers for Hypertensive Disorders and Small for Gestational Age Outcomes. Hypertens Pregnancy.

131. Akolekar R, Syngelaki A, Beta J, Kocylowski R, Nicolaides KH: Maternal serum placental protein 13 at 11-13 weeks of gestation in preeclampsia. Prenat Diagn 2009;29:1103-1108.

132. Li RH, Poon SC, Yu MY, Wong YF: Expression of placental leptin and leptin receptors in preeclampsia. Int J Gynecol Pathol 2004;23:378-385.

133. Grosfeld A, Turban S, Andre J, Cauzac M, Challier JC, Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M: Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. FEBS Lett 2001;502:122-126.

134. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425-432.

135. Ahima RS, Flier JS: Leptin. Annu Rev Physiol 2000;62:413-437.

136. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1995;1:1155-1161.

137. Linnemann K, Malek A, Schneider H, Fusch C: Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. Biochem Soc Trans 2001;29:86-90.

138. Henson MC, Castracane VD: Leptin in pregnancy: an update. Biol Reprod 2006;74:218-229.

139. Atamer Y, Erden AC, Demir B, Kocyigit Y, Atamer A: The relationship between plasma levels of leptin and androgen in healthy and preeclamptic pregnant women. Acta Obstet Gynecol Scand 2004;83:425-430.

140. Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA: Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;290:E326-333.

141. Hinuy HM, Hirata MH, Sampaio MF, Armaganijan D, Salazar LA, Hirata RD: LEP 3'HVR is associated with obesity and leptin levels in Brazilian individuals. Mol Genet Metab 2006;89:374-380.

142. Bluher S, Shah S, Mantzoros CS: Leptin deficiency: clinical implications and opportunities for therapeutic interventions. J Investig Med 2009;57:784-788.

143. Muy-Rivera M, Ning Y, Frederic IO, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA: Leptin, soluble leptin receptor and leptin gene polymorphism in relation to preeclampsia risk. Physiol Res 2005;54:167-174.

144. Rigo J, Szendei G, Rosta K, Fekete A, Bogi K, Molvarec A, Ronai Z, Ver A: Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. Gynecol Endocrinol 2006;22:521-525.

145. Giandomenico G, Dellas C, Czekay RP, Koschnick S, Loskutoff DJ: The leptin receptor system of human platelets. J Thromb Haemost 2005;3:1042-1049.

146. Ragin CC, Dallal C, Okobia M, Modugno F, Chen J, Garte S, Taioli E: Leptin levels and leptin receptor polymorphism frequency in healthy populations. Infect Agent Cancer 2009;4 Suppl 1:S13.

147. Chiu KC, Chu A, Chuang LM, Saad MF: Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance. Eur J Endocrinol 2004;150:725-729.

148. Lakka TA, Rankinen T, Weisnagel SJ, Chagnon YC, Lakka HM, Ukkola O, Boule N, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bergman R, Bouchard C: Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and changes in glucose homeostasis in response to regular exercise in nondiabetic individuals: the HERITAGE family study. Diabetes 2004;53:1603-1608.

149. Abete I, Goyenechea E, Crujeiras AB, Martinez JA: Inflammatory state and stress condition in weight-lowering Lys109Arg LEPR gene polymorphism carriers. Arch Med Res 2009;40:306-310.

10. SAJÁT PUBIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájával összefüggő saját közlemények jegyzéke

Nagy B, Várkonyi T, Molvarec A, Lázár L, Hupuczi P, Than NG, Rigó J Jr.: Leptin gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism in pre-eclampsia and HELLP syndrome. Clin Chem Lab Med 2009;47:1033-1037.

IF: 1,886

Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A, Than NG, Rigó J Jr, Nagy B: Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. BMC Med Genet 2010;11:25.

IF: 2,840

Várkonyi T, Nagy B, Füle T, Tarca AL, Karászi K, Schönleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigó J Jr, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG: Microarray Profiling Reveals That Placental Transcriptomes of Early-onset HELLP Syndrome and Preeclampsia Are Similar. Placenta, doi:10.1016/j.placenta.2010.04.014 Elfogadva

IF: 2,767

10.2. További saját közlemények jegyzéke

Demeter A, Várkonyi T, Csapó Z, Szánthó A, Oláh J, Papp Z: Különbözô malignitású petefészek-daganattal kezelt betegek prognosztikai faktorainak vizsgálata. Magy Onkol 2004;48:259-265.

Steinborn A, Várkonyi T, Scharf A, Bahlmann F, Klee A, Sohn C: Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. Am J Reprod Immunol 2007;57:277-286.

IF: 2,130

Várkonyi T, Hupuczi P, Steinborn A: A szolúbilis HLA-G1/G5 molekula szerepe normál és patológiás terhességben. Focus Medicinae 2007;9:3-9.

Nagy B, Savli H, Molvarec A, Várkonyi T, Rigó B, Hupuczi P, Rigó J Jr.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analyses. Clin Chim Acta 2008;389:126-131.

IF: 2,960

Molvarec A, Jermendy A, Nagy B, Kovács M, Várkonyi T, Hupuczi P, Prohászka Z, Rigó J Jr.: Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. Clin Chim Acta 2008;392:52-57.

IF: 2,960

Demeter A, Szatmári E, Várkonyi T, Szánthó A, Csapó Z, Rigó J Jr.: Méhsarcomák prognosztikai faktorainak vizsgálata. Magy Nőorv L 2010;73:105-109.

Papp Z, Várkonyi T, Váradi V: Ethical considerations in prenatal diagnosis. In: Ethical Dilemmas in Perinatal Medicine. Schenker JG ed. New Delhi India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 71-80, 2010.

10.3. Egyéb idézhető absztrakt

Várkonyi T, Szabó G, Molvarec A, Hupuczi P, Than NG, Rigó J Jr, Nagy B. Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. European Human Genetics Conference, Ausztria Bécs, 2009. május 23-26.

Nagy B, Várkonyi T, Lázár L, Hupuczi P, Than NG, Rigó J Jr. Leptin gene (TTTC)n microsatellite polymorphism in pre-eclampsia and HELLP syndrome. European Human Genetics Conference, Ausztria Bécs, 2009. május 23-26.

Szabó G, Várkonyi T, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J Jr, Nagy B. Study of the natridiuretic peptide precursor gene (TTTC) repeats in essential hypertension and preeclampsia. European Human Genetics Conference, Ausztria Bécs, 2009. május 23-26.

Füle T, Karászi K, Schönleber J, Krenácsi T, Mihalik N, Várkonyi T, Nagy B, Hupuczi P, Rigó J Jr, Than NG, Kovalszky I. Changes of syndecan-1 and-2 expression in the placenta of patients with preeclampsia and HELLP syndromeChanges of syndecan-1 and-2 expression in the placenta of patients with preeclampsia and HELLP syndrome. Osztrák-Magyar Patológus Konferencia, Magyarország Sopron, 2009. október 1-3.

Várkonyi T, Nagy B, Füle T, Tarca A, Karászi K, Schönleber J, Hupuczi P, Kovalszky I, Rigó J Jr., Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG: High-throughput genomic and tissue microarray expression profiling reveal the placental gene expression signature of early-onset HELLP syndrome similar to that of early-onset preeclampsia. European Human Genetics Conference, Svédország Göteborg, 2010. junius 12 – 15.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki programvezetőmnek, Dr. Papp Zoltán Professzor Úrnak, aki a munkacsoportjába fogadott, megteremtette munkám feltételeit, irányította és számtalan tanáccsal segítette azt. Külön köszönöm neki, hogy emberi tartásával, töretlen optimizmusával segített abban, hogy az „asztalos inas is kifaraghassa saját székét".

Köszönöm Dr. Rigó János Jr. Professzor Úrnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy kutatásomat a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján végezzem.

Köszönöm Dr. Nagy Bálint tudományos főmunkatárs Úrnak, témavezetőmnek, hogy lehetőséget adott egy molekuláris citogenetikai laborban megtanulni a tudományos gondolkodás alapjait.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Than Nándor Gábor Egyetemi Tanársegéd Úrnak, az utóbbi négy évben konzulensemként adott minden segítségéért, és hogy őszinte tiszta gondolkodásmódjával segített abban, hogy gondolataim - a tudománytól - ne kalandozzanak el. Köszönöm továbbá neki és Dr. Adi L. Tarca-nak a microarray vizsgálatok statisztikai értékelését.

Hálával tartozom Dr. Hupuczi Petronella Egyetemi Docens Asszonynak és Dr. Demeter Attila Főorvos Úrnak, hogy egyetemi tanulmányaim alatt, lehetőséget adtak tudományos diákkörösként megismerni a szülészet-nőgyógyászat aktuális tudományos kérdéseit.

Tisztelettel adózok Dr. Füle Tibornak a patológiai vizsgálatok végzésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért.

Köszönöm Édesapám támogatását és azt, hogy kutyasétáltatás közben sokszor végighallgatta még kissé homályos elképzeléseimet, illetve lényegre törő konkrét ötleteivel hozzájárult munkámhoz. Édesapám mellett köszönöm Édesanyámnak, aki a helyes magyar szóhasználatra szüntelenül emlékeztet. Hálásan köszönöm nekik, hogy egyetemi és doktori tanulmányomat a Semmelweis Egyetemen végezhettem és ez alatt az idő alatt is végig mögöttem álltak.