

THE ROLE OF ANGIOGENIC AND IMMUNOLOGICAL FACTORS IN PREECLAMPSIA

Doktori értekezés

Dr. Derzsy Zoltán

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Operatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Molvarec Attila, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pozsonyi Zoltán, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Szigeti Zsanett, Ph.D, főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Várbíró Szabolcs, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Horváth Anna, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Magyar Zoltán, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2025

1. Bevezetés

A preeklampszia napjainkban is jelentős szülészeti probléma, amely anyai és magzati komplikációkat okoz, befolyásolja az anyai és magzati morbiditást és akár a halálozást is. A preeklampszia meghatározása az elmúlt évtizedekben változott. A preeklampszia a terhesség alatti hipertenzív rendellenességek egyike. Ez az állapot egy több rendszert érintő progresszív, terhesség-specifikus betegség, amelyet az újonnan kialakuló magas vérnyomás és a proteinuria vagy az újonnan kialakuló magas vérnyomás és jelentős végszervi diszfunkció jellemzi, fehérjeürítéssel vagy anélkül, amely általában a terhesség 20. hete után vagy a szülés utáni időszakban jelentkezik. A becslések szerint a preeklampszia az Egyesült Államokban, Kanadában és Nyugat-Európában a terhességek 2-5%-ában fordul elő, és az anyai megbetegedések egyik vezető oka. Néhány rizikófaktor, mint az elhízás, a cukorbetegség, az előrehaladott anyai kor, a krónikus hipertónia egyre gyakoribb a várandós nők körében, ami növeli a preeklampszia előfordulási gyakoriságát a nyugati országokban. A preeklampszia jelentős mértékben befolyásolja mind az anyai, mind a magzati egészséget. A legsúlyosabb anyai komplikációk a központi idegrendszert, a vesét, a májat, a tüdőt és a véralvadást érintik. A preeklampszia végleges terápiája a terhesség megszakítása. Ez iatrogén koraszülést eredményez. Ez az iatrogén koraszülés és a betegségre jellemző intrauterin növekedési visszamaradás felelős a legtöbb újszülöttkori komplikációért. Az összes koraszülés 15%-a iatrogén, a preeklampszia és a magzati növekedési visszamaradás kezelése miatt. Számos epidemiológiai adat kiemeli az immunológiai tényezők kulcsszerepét a preeklampszia kialakulásában. A rendellenesség előfordulása magasabb az elsőszülötteknél, mint a többször szült nőknél. Az anyai-magzati immunológiai maladaptáció a preeklampszia kialakulásának fő tényezője ezek alapján a megfigyelések alapján.

A preeklampszia kétfázisú modellje széles körben elfogadott elmélet, amely a preeklampszia patogenezisét két egymást követő lépésként magyarázza. A terhesség korai szakaszában a placentális érképződés rendellenességei relatív placentális alulperfúziót/hipoxiát/izkémiaát eredményezhetnek, ami antiangiogén faktorok

felszabadulásához vezet az anyai keringésbe, amelyek megváltoztatják az anyai szisztémás endotélium funkcióját, és magas vérnyomást és a betegség egyéb megnyilvánulásait okoznak (hematológiai, neurológiai, kardiális, pulmonális, renális és májfunkciós diszfunkciók). Az első fázis a placenta kóros fejlődése a trophoblast invázió hiánya miatt, ami a terhesség első felében következik be. Ezek a feltételek vezetnek a második fázishoz, amely az anyai tünetek kialakulása a terhesség második felében. Az első fázist preklinikai fázisnak, míg a másodikat klinikai fázisnak nevezik. Immunológiai eljárások mindkét fázisban részt vesznek, bár a hozzájáruló antigének és effektorok a fázisok között különböznek, így különböző "immunológiai interfészeket" képeznek.

2. Célkitűzések

1. A plazma von Willebrand faktor hasító proteáz (ADAMTS13) aktivitásának, a von Willebrand faktor (VWF) antigén szintjeinek és a von Willebrand faktor multimer szerkezetének vizsgálata preeclampsziában.
2. A komplementrendszer szisztémás aktivációjának elemzése a klasszikus, lektin és alternatív útvonalakon keresztül preeclampsziában.

3. Módszerek

A tanulmány résztvevői

A von Willebrand faktort és az ADAMTS13 enzim aktivitását vizsgáló tanulmányunk eset-kontroll felépítést használt. A vizsgálatban 67 preeklampsziás beteg, 70 egészséges, komplikációmentes terhességgel rendelkező terhes nő és 59 egészséges, nem terhes nő vett részt. Hasonlóképpen, a komplementrendszer aktivációjának vizsgálata is eset-kontroll megközelítést követett, amelyben 60 preeklampsziás beteg, 60 egészséges terhes nő és 59 egészséges, nem terhes nő vett részt. A résztvevők toborzása a Semmelweis Egyetem Budapesti 1. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról, valamint a Kútvölgyi Klinikai Központ Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályáról történt. Minden résztvevő a kaukázusi rasszhoz tartozott, és Magyarország azonos földrajzi területén élt. A kizárási kritériumok közé tartoztak a többes terhességek, a krónikus hipertónia, a cukorbetegség, az autoimmun betegségek, az angiopátia, a veseproblémák, az anyai vagy magzati fertőzések, valamint a magzati veleszületett rendellenességek. A preeklampszia meghatározása a vérnyomás emelkedése volt (≥ 140 mmHg szisztolés vagy ≥ 90 mmHg diasztolés két vagy több alkalommal, legalább 6 órás különbséggel) a korábban normális vérnyomású nők esetében a 20. terhességi hét után, valamint proteinuria ($\geq 0,3$ g/24 óra). Az összes preeklampsziás beteg vérnyomása a szülés utáni 12 héten belül normalizálódott. Súlyos preeklampszia esetén a szisztolés vérnyomás ≥ 160 mmHg vagy a diasztolés vérnyomás ≥ 110 mmHg, vagy a proteinuria ≥ 5 g/24 óra volt. Eklampsziás vagy HELLP-szindrómás nőket kizárták a vizsgálatból. A magzati növekedési visszamaradás diagnózisa akkor történt, ha a magzati születési súly a terhességi kor és nem szerint a magyar születési súly percentilisek alapján a 10. percentilis alatt volt.

Laboratóriumi módszerek

Az ADAMTS13 aktivitás meghatározása a FRET-S-VWF73 fluoreszcens szubsztrát hasításából eredő fluoreszcencia kinetikus mérésével történt (Peptides International, Louisville, Kentucky, USA). A citrátos plazmamintákból reakció pufferrel 1:20-as hígítást készítettünk, majd FRET-S-VWF73 szubsztrát oldattal összemértük. 37 °C-on 1 órán keresztül két percenként, 340 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszon kinetikus fluorimetriás mérést végeztünk. A kapott fluoreszcencia

értékeket az idő függvényében ábrázoltuk, lineáris regresszióval meghatároztuk a meredekséget. Tíz egészséges véradó poolozott citrátos plazmájából készült hígítási sorozat meredekségi értékeit a hígítás százalékanak függvényében ábrázoltuk. Az így készített standard görbe (100%: hígítás nélküli normál plazma, 0%: vak, reakció puffer) segítségével határoztuk meg az ismeretlen plazmák aktivitását. Az eredményeket a poolozott egészséges véradó plazma aktivitásának százalékos arányában adtuk meg.

A von Willebrand faktor antigén szintjét citrátos plazmából ELISA módszer segítségével határoztuk meg, kereskedelmi forgalomban kapható antitestek segítségével (Dakopatts, Glostrup, Dánia). Mikrotiter lemezeket nátrium-hidrogénkarbonát pufferben hígított (pH 9,6) humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitestekkel fedtünk. Egy éjszakán át tartó inkubálás és mosás után a lemezeket a hozzáadott 1:500 arányban hígított plazmamintákkal 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ismételt mosás után torna peroxidázzal konjugált humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitestekkel 1 órán át inkubáltuk a lemezeket, majd orto-feniléndiamin hozzáadása után 492 nm-es hullámhosszon mértük meg az optikai denzitást. Az eredményeket 10 egészséges véradó poolozott plazmájában mért érték százalékos arányában adtuk meg.

A von Willebrand faktor multimer mintázatának meghatározása nátrium-dodecilszulfát (SDS)-agaróz gél elektroforézis útján történt EDTA-val antikoagulált plazmamintákban. Az elektroforézist alacsony felbontású (0,8%-os) agaróz gélen (Seakem HGT, Lonza, Basel, Svájc) végeztük. A fehérjéket elektroblot módszerrel vittük át a polivinilidén-fluorid membránra (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA). A von Willebrand faktort torna peroxidázzal jelölt humán von Willebrand faktor-ellenes poliklonális nyúl antitest (DakoCytomation, Glostrup, Dánia) és diaminobenzidin szubsztrát segítségével vizualizáltuk. A kvantitatív multimer analízist GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornia, USA) denzitométeren QuantityOne szoftver (Bio-Rad Laboratories) alkalmazásával végeztük, és az eredményt a nagy multimerek (>20 mer) százalékos arányában adtuk meg.

A C4d, C3a és SC5b9 koncentrációját EDTA-s plazmamintákban a Quidel cég ELISA Kitjeivel a gyártó útmutatása szerint határoztuk meg (San Diego, Kalifornia, USA, Cat. No. A008, A015, A029).

Az MBL (mannóz-kötő lektin)-MASP-2 (MBL-asszociált szerin proteáz 2) komplex

aktiválhatóságának mértékét Petersen és munkatársai C4-depozíció alapuló módszere alapján határoztuk meg, kisebb módosításokkal.

A szérumban CRP szinteket ultraszenzitív, latex szemcsékkel érzékenyített immunoturbidimetriás eljárással mértük meg Cobas Integra 800 automatán a gyártó által forgalmazott kittel (Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 20764930). A humán CRP monoklonális anti-CRP antitestekkel fedett latex szemcsékhez agglutinálódott. A precipitátumot 552 nm-en turbidimetriával határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Két csoport folytonos változóinak összehasonlításához a Student-féle kétmintás t-próbát és a Mann-Whitney U-próbát alkalmaztuk, míg több csoport esetén a Kruskal-Wallis-féle varianciaanalízist (ANOVA) használtuk. Post-hoc tesztként az átlagos rangszámok többszörös összehasonlítását végeztük. A csoportok diszkrét változóinak összehasonlításához a Fisher-féle egzakt és a Pearson-féle χ^2 tesztet alkalmaztuk. A korrelációs együtthatókat a Spearman-féle rangkorrelációval számítottuk ki. Többszörös lineáris regresszióval a standardizált regressziós együtthatókat határoztuk meg. Analíziseink során a zavaró változók hatását dichotom függő változó esetén többszörös logisztikus regresszióval, míg folytonos függő változó esetén kovarianciaanalízissel (ANCOVA) korrigáltuk.

4. Eredmények

A vizsgálatba bevont 67 praeclampsias, 70 egészséges terhes és 59 egészséges nem terhes nők plazma ADAMTS13 aktivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget. A von Willebrand faktor antigén plazmaszintje szignifikánsan magasabb volt praeclampsias terhesekben, mint egészséges terhes és nem terhes nőkben. Az eredmények nem változtak meg azt követően sem, hogy életkorra, BMI-re és vérévételkori terhességi korra kovariancia analízissel (ANCOVA) adjusztáltunk. A praeclampsias csoporton belül nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a plazma ADAMTS13 aktivitásában és von Willebrand faktor antigén szintjében az enyhe és súlyos praeclampsias esetek, a korai és késői kezdetű praeclampsia, illetve a magzati növekedési retardációval társult és anélküli esetek között. Meghatároztuk továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezetét 5 praeclampsias, 5 egészséges terhes és 5 egészséges nem terhes nőben, akiket életkorra, terhességi korra és dohányzási státuszra illesztettünk. A von Willebrand faktor multimer szerkezete intakt volt mindegyik vizsgálati csoportban. A nagy multimerek százalékos arányában nem mutatkozott szignifikáns különbség a praeclampsias, egészséges terhes és egészséges nem terhes nők között (medián (tartomány): 24,7 (18,5-33,7) %, 27,3 (22,2-30,2) % és 25,5 (20,2-28,8) %, rendre; $p=0,45$). Egészséges terhes nők esetében szignifikánsan magasabb CRP, C4d, C3a, SC5b9, C3, C9 és faktor H antigén szinteket, valamint szignifikánsan alacsonyabb C1-inhibitor szintet figyeltünk meg a nem terhes nőkhöz képest. A preeklampsziás betegeknél szignifikánsan emelkedett CRP, C4d, C3a és SC5b9 szinteket és szignifikánsan csökkent C3 koncentrációkat figyeltünk meg az egészséges terhes nőkhöz képest. Az egészséges, nem terhes nőkhöz képest a preeklampsziás betegeknél magasabb CRP, C4d, C3a, SC5b9, C4, C3, C9 és faktor H antigén szinteket, valamint alacsonyabb C1-inhibitor szinteket mértek. A három vizsgálati csoport között nem volt szignifikáns különbség a Bb és C4b-kötő protein szintek tekintetében. Az alcsoport elemzése során kiderült, hogy a magzati növekedési visszamaradással rendelkező preeklampsziás betegek szignifikánsan magasabb plazma SC5b9 szinttel rendelkeztek, mint azok, akiknél nem állt fenn IUGR (medián (interkvartilis tartomány): 112,3 (59,1-147,5) ng/ml vs. 69,9 (46,7-107,8) ng/ml; $p < 0,05$).

5. Következtetések

1. A magas von Willebrand faktor antigén szint ellenére a vérplazma ADAMTS13 aktivitása nem csökken praeclampszában. Továbbá a von Willebrand faktor multimer szerkezete is intakt praeclampszában
2. A komplementrendszer szisztémás aktiválódása a klasszikus úton történik praeclampsziás terhesekben, ez az aktiváció a terminális komplex (SC5b9) fokozott képződéséhez vezet. A terminális komplex anyai keringésben mért excesszív mennyisége összefüggést mutat az intrauterin növekedési restrikcióval praeclampsziás terhesekben

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Molvarec A, Rigó J Jr, Bőze T, **Derzsy Z**, Cervenak L, Makó V, Gombos T, Udvardy ML, Hársfalvi J, Prohászka Z. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost* 2009; 101: 305-311.

IF: 4,451

2. **Derzsy Z**, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular immunology* 2010; 47: 1500-1506.

IF: 2,916

3. Csuka D, Molvarec A, **Derzsy Z**, Varga L, Füst G, Rigó J Jr, Prohászka Z. Functional analysis of the mannose-binding lectin complement pathway in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2010; 87: 90-96.

IF: 2,204

Az értekezés témájától független közlemények

1. Stenczer B, Rigó J Jr, Prohászka Z, **Derzsy Z**, Lázár L, Makó V, Cervenak L, Balogh K, Mézes M, Karádi I, Molvarec A. Plasma osteopontin concentrations in preeclampsia - is there an association with endothelial injury? *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 181-187.

IF: 2,069

2. Molvarec A, Kalabay L, **Derzsy Z**, Szarka A, Halmos A, Stenczer B, Arnaud P, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Preeclampsia is associated with decreased serum $\alpha 2$ -HS glycoprotein (fetuonin-A) concentration. *Hypertens Res* 2009; 32: 665-669.

IF: 2,426

3. Bertalan R, Patocs A, Nagy B, **Derzsy Z**, Gullai N, Szappanos A, Rigo J Jr, Racz K. Overrepresentation of BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene in pregnant women with HELLP syndrome. *Clin Chim Acta* 2009; 405: 148-152.

IF: 2,535

4. Molvarec A, **Derzsy Z**, Kocsis J, Bőze T, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 491-498.
IF: 2,167
5. Szabó I, **Derzsy Z**, Csabay L, Barakonyi E, Papp Z. A cervicalis terhesség ultrahang-diagnosztikája és kezelésének lehetőségei : beszámoló két eset kapcsán és irodalmi áttekintés. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2006; 69: 413-418.
6. Molvarec A, **Derzsy Z**, Rigó J Jr. What is the effect of smoking on the risk of superimposed pre-eclampsia: protective or harmful? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; 86: 506-507.
7. Molvarec A, Ver A, Fekete A, Rosta K, Derzbach L, **Derzsy Z**, Karadi I, Rigó J. Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens Res* 2007; 30: 205-211.
IF: 2,951
8. Rigó J Jr, Bőze, T, **Derzsy Z**, Derzbach, L, Treszl A., Lázár L, Sobel G, Vásárhelyi B. Family history of early-onset cardiovascular disorders is associated with a higher risk of severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128: 148-151.
IF: 1,273
9. Garamvölgyi Z, Bőze T, Beke A, Krasznai I, **Derzsy Z**, Somogyi A, Hidvégi J, Rigó J Jr. A terhesség második felében mért magzatvíz inzulinkoncentráció és a gestatiós diabetes kapcsolata. *Magy Nőorv L* 2006; 69: 177-181.
10. Rigó J Jr., **Derzsy Z**, Bőze T, Krasznai I, Lázár L, Than N G, Nagy B: Cardiovascularis megbetegedések előfordulása súlyos praeclampsias nők szüleiben 50 éves kor alatt. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2005; 68: 265-269.
11. Ujházy A, Csaba Á, Bőze T, **Derzsy Z**, Sziller I, Rigó, J: Az endocervicalis Chlamydia fertőzés fiatal nőkben hazánkban. *STD és Genitális Infektológia* 2008; 2: 110-114.

A disszertáció témájában megjelent közlemények impakt faktora: 9.571

Összegzett impakt faktor: 22.992