

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

**Angiogén faktorok vizsgálata anyai szérumból,
chorionboholy mintából és magzatvízből a késői első
trimeszterben és a második trimeszterben**

Ph.D. Thesis

Vincze Márió Attila M.D.

Témavezetők:

Kozinszky Zoltán M.D., Ph.D.

Sikovanyecz János M.D., Ph.D., habil

Szeged

2025

Bevezetés

A méhlepény immunológiai feto-maternalis interfészt biztosít, számos immun- és gyulladásos faktort választ ki, ezek egyensúlyban tartásával védi a magzatot. A megfelelő magzati fejlődés a méhlepény megfelelő vaszkuláris architektúrájától is függ. A placentáris növekedés a vaszkulogenezis és angiogenezis révén valósul meg, amelyet proangiogén és antiangiogén faktorok szabályoznak, melyek a trophoblastok, immunsejtek, epithelialis sejtek, endothelialis sejtek által expresszálódnak, és a magzatvízbe, valamint az anyai keringésbe választódnak ki.

A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor-A (VEGF-A) hatással van a vaszkulogenezis és angiogenezis minden lépésére a chorionbolyhokban. Aktiválhatja az endothel sejteket, hogy proteázokat, például urokináz típusú és szöveti plazminogén aktivátorokat, valamint kollagenázokat termeljenek. Ezen kívül a VEGF-A elősegíti az endothel sejtek proliferációját és migrációját a placentáció során. A placenta vazodilatációját és az erek permeabilitását is a VEGF-A szabályozza az endothelialis nitrogén-oxid szintáz (eNOS) és egyéb vazóaktív anyagok révén. A hipoxia, gyulladásos citokinek és számos növekedési faktor indukálja a VEGF-A fokozott expresszióját, például a basic fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) és a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β).

A bFGF az fibroblaszt növekedési faktorok családjának tagja. Ez az angiogén hatással van a vaszkulogenezisre, sebgyógyulásra és embrionális fejlődésre. A bFGF aktiválja az fibroblaszt növekedési faktor receptor 1-et (FGFR1), a bFGF/FGFR rendszer különböző fiziológiai állapotokban vesz részt, beleértve az embrionális fejlődést, a szöveti növekedést és transzformációt, a gyulladást és az érrendszeri képződést. A bFGF-t a trophoblastok és a placentális endothel sejtek választják ki. Részt vesz a placentális angiogenezisben, és alapvető hatással van a trophoblast sejtek differenciálódására és proliferációjára.

A nitrogén-oxid szintáz (NOS) egy enzim, amely az L-arginint L-citrullinné és nitrogén-monoxiddá (NO) alakítja. A NO egy kis molekulású közvetítő, amely sokféle funkcióval rendelkezik, többek között vazodilatációval, a vérlemezke-aggregáció gátlásával és az érfal átalakításával. Három izoformája ismert: neuronális (nNOS), indukálható (iNOS) és endothelialis (eNOS). A placentális syncytiotrophoblast sejtek, villózus endothel sejtek és köldökzsinór endothel sejtek expresszálják az eNOS-t. A NO elősegíti a spirális artériák

átalakulását, és lokálisan hatással van a placenta vazodilatációjára, amely elengedhetetlen a megfelelő placentális véráramlás és normális placentáció fenntartásához.

Az human leukocita antigén-G (HLA-G) egy nem klasszikus, I. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex molekula tagja. Az HLA-G kulcsfontosságú molekula az anyai-magzati immuntoleranciában, amely fenntartja az immunhomeosztázist. A lokalizációjától függően hét izoformát azonosítottak, négy membránhoz kötött (G1-4) és három oldható (G5-7) altípust. A membránhoz kötött izoformák az extravillous trophoblast sejteken fejeződnek ki. Az oldható izoformák különböző sejtekben keletkeznek, mint az extravillous és villous citotrophoblastok, a chorion membrán, a syncytiotrophoblastok, a deciduális stroma sejtek, a magzati endothel sejtek és az immunsejtek. Az HLA-G gátolja a citotoxicitást és fokozza az antiinflammatorikus citokinek (pl. IL-4, IL-10, TGF- β) termelődését. Az HLA-G, különösen az oldható HLA-G izoformák kulcsszerepet játszanak a trophoblastok inváziójában és a spirális artériák átalakításában. Másrészt elősegítik a növekedést serkentő faktorok, mint a pleiotrophin, osteoglycin és osteopontin termelődését, amelyek kulcsfontosságúak az embrionális és magzati fejlődéshez.

A PP13 (placentáris protein 13), más néven galectin-13, a galectin család tagja, amely konzervált szénhidrát-felismerő doménnel (CRD) rendelkezik. A CRD képes kapcsolódni a béta-galaktózidázot tartalmazó glikokonjugátumokhoz, és jelentős szerepet játszik a biológiai eseményekben, mint az implantáció és az embrionális fejlődés. A PP13 elsősorban a placentában, az anyai-magzati interfészen van jelen, és specifikusan a citoplazmában és a syncytiotrophoblastok sejtmembránján helyezkedik el. Ezen kívül a PP13 gén expressziója a magzati membránokban és a villózus kapilláris endothelben is kimutatható. A PP13 elősegíti a trophoblastok migrációját és differenciálódását, valamint szerepet játszik a spirális artériák vaszkuláris átalakításában a terhesség korai szakaszában. Továbbá hozzájárul az immunregulációhoz azzal, hogy apoptózist indukál az anya T-sejtjeiben.

Anyag és módszer

Prospektív, keresztmetszeti kohorsz vizsgálatot végeztünk várandósok bevonásával, akik chorionboholy mintavételen vagy amniocentézisen estek át a Szegedi Tudományegyetem Születészeti és Nőgyógyászati Klinikáján. A VEGF-A, bFGF és eNOS koncentrációkat chorionboholy mintákból, míg az szolubilis HLA-G (sHLA-G) és PP13 koncentrációkat anyai szérum- és magzatvíz mintákból határoztuk meg.

131 válogatott esetben történt chorionboholy mintavétel, melyek indikációi a következők voltak: megnövekedett nyaki tarkóredő vastagság (>2 MoM a terhességi életkorhoz képest) ($n = 18$), kromoszóma rendellenesség vagy genetikai rendellenesség az előző terhességben ($n = 65$), és magas anyai életkor ($n = 48$). 71 válogatott esetben történt amniocentézis, melyek indikációi: megnövekedett nyaki tarkóredő vastagság (≥ 2 MoM a terhességi életkorhoz képest) ($n = 20$), kromoszóma rendellenesség vagy genetikai rendellenesség az előző terhességben ($n = 11$), és magas anyai életkor ($n = 40$). A kizárási kritériumok közé tartoztak a magzati kromoszóma-, vagy struktúrális rendellenességek, többszörös terhesség és súlyos anyai szövődmények.

Egy további vizsgálatunk során az amniocentézis csoporthoz további kizárási kritériumokat is hozzárendeltünk, nevezetesen a terhességi hipertóniát, terhességi diétával kezelt cukorbetegséget, illetve terhességi korhoz mérten kis és nagy magzatot. Az amniocentézis indikációi a 41 válogatott esetben: megnövekedett nyaki tarkóredő vastagság (≥ 2 MoM a terhességi életkorhoz képest) ($n = 10$), kromoszóma rendellenesség vagy genetikai rendellenesség az előző terhességben ($n = 2$), és magas anyai életkor ($n = 29$).

Minden várandós nő hagyományos genetikai ultrahangos vizsgálaton esett át az első és második trimeszterben. Az amniocentézis során a szonográfusaink 3D ultrahangos méréseket végeztek a méhlepénnyel kapcsolatosan, adatokat gyűjtöttek a méhlepény térfogatáról és a power Doppler indexekről, mint a vaszkularizációs index (VI), áramlási index (FI), vaszkularizációs áramlási index (VFI).

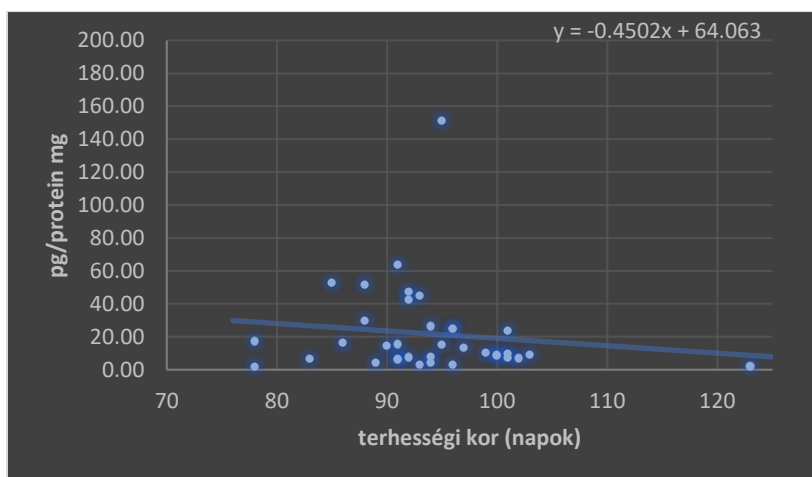
Eredmények

Az angiogén faktorok koncentrációjának vizsgálata chorionboholy mintákban

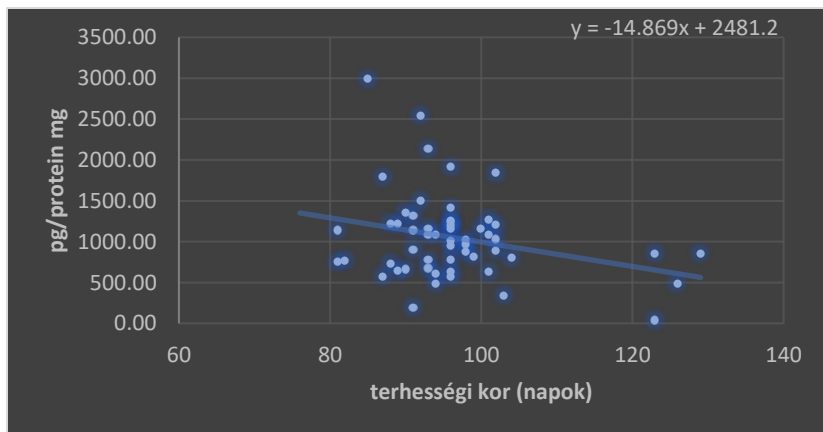
- 1. A cél az angiogén faktorok (VEGF-A, eNOS és bFGF) koncentrációinak meghatározása, valamint azok változásainak vizsgálata chorionboholy mintákban a 10+6 és 18+3 hetes gesztációs kor között, komplikációmentes terhességek esetén.**

Vizsgáltuk az angiogén faktorok medián koncentrációját a chorionboholyokban. A VEGF-A koncentrációja 11,1 pg/ml, a bFGF koncentrációja 1019,0 pg/ml, az eNOS koncentrációja pedig 116,8 pg/ml volt. A statisztikai elemzés jelentős negatív korrelációt mutatott a terhességi életkor és a VEGF-A- ($p < 0.05$), valamint a bFGF-szintek ($p < 0.05$) között (1. ábra, 2. ábra).

- 1. ábra** A méhlepény VEGF-A koncentrációja a terhességi kor függvényében ($p < 0.05$)



- 2. ábra** A méhlepény bFGF koncentrációja a terhességi kor függvényében ($p < 0.05$)



2. A VEGF-A, eNOS és bFGF koncentrációk közötti összefüggések vizsgálata a placentában

Statisztikai elemzést végeztünk az angiogén faktorok közötti kapcsolatok azonosítására. Az eNOS koncentrációja fordított korrelációt mutatott a VEGF-A- ($p < 0,05$) és a bFGF koncentrációkkal ($p < 0,05$). A VEGF-A koncentrációja egyenes arányú összefüggést mutatott a bFGF koncentrációjával ($p < 0,05$). A VEGF-A és bFGF közötti pozitív korreláció a chorionban a késő első és a korai második trimeszterben szoros összefüggésben lehet a vaszkulogenezis végével és az elágazódó/nem elágazódó angiogenezis kezdetének eltolódásával. A korai második trimeszterben az expanszív chorionbolyhok magas eNOS koncentrációt és aktivitást igényelnek, hogy elegendő NO-t termeljenek a lokális vazodilatáció elősegítésére. A növekvő NO szint pozitív visszacsatolást válthat ki a VEGF-A és bFGF expressziójára, és negatív visszacsatolást az eNOS aktivitására.

3. Az anyai (anyai életkor, testtömeg-index (BMI)) és magzati (nyaki tarkóredő vastagság (NT)) tényezők hatása a VEGF-A, eNOS és bFGF koncentrációkra

Az anyai életkor nem mutatott szignifikáns korrelációt egyik angiogén faktoral sem. A VEGF-A koncentrációja negatív korrelációt ($p < 0,05$), míg a bFGF koncentrációja pozitív korrelációt igazolt ($p < 0,05$) a terhesség előtti anyai BMI-vel. Feltételezhető, hogy a terhesség előtti elhízás hatással van a placentáris VEGF-A szekréciójára. Az aktivált zsírszövet több angiogén faktort termel, például VEGF-A-t és bFGF-t, amelyek új erek képződését indukálják. Irodalmi adatok alapján a harmadik trimeszterben a "placentális elhízás" valószínűleg az angiogén faktorok fokozódott termelődésének a következménye. Eredményeink a normál súlyú vagy enyhén túlsúlyos nőkre vonatkoznak a késői első és korai második trimeszterben.

A bFGF koncentrációja inverz kapcsolatot mutatott ($p < 0,05$), míg az eNOS szintje lineáris kapcsolatot mutatott ($p < 0,05$) a nyaki tarkóredő vastagsággal. Vizsgálatunk alapján a chorionbolyhokban magasabb eNOS koncentrációk mérhetők nagyobb nyaki tarkóredő vastagság esetén kromoszóma rendellenességgel nem rendelkező magzatoknál, ami összefügghet a tágult nyirokrendszeri és érrendszeri beáramlással. Feltételezhetjük, hogy a

bFGF fokozhatja a nyirokerek és vérerek endothel sejtinek proliferációját és migrációját, így a nyirokerek és vérerek ellenállóbbá válnak a folyadék felhalmozódásával szemben.

Az immunológiai és angiogén faktorok szintjeinek vizsgálata a magzatvízben és az anyai szérumban

- 1. A cél a sHLA-G és PP13 szintek meghatározása és változásainak vizsgálata az anyai szérumban és magzatvízben a 16+0 és 22+6 hetes gesztációs kor között, egészséges terhességekben és olyan terhességekben, melyek komplikáltak terhességi hipertóniával vagy diétával kezelt gesztációs diabetes mellitussal, vagy kis magzati súllyal (SGA) vagy nagy magzati súllyal (LGA).**

A PP13 és sHLA-G átlagos koncentrációi az anyai szérumban és magzatvízben mindkét csoportban a 1. táblázatban találhatók.

1. táblázat. Az angiogén faktorok szintjei a magzatvízben és az anyai szérumban

Faktor	Unselected (N=71)	Selected (N=41)
PP13 koncentráció magzatvízben (pg/ml)	8.68 ± 9.85	9.91 ± 12.05
PP13 koncentráció szérumban (pg/ml)	204.23 ± 171.34	221.96 ± 207.88
sHLA-G koncentráció magzatvízben (ng/ml)	55.89 ± 19.51	53.39 ± 19.00
sHLA-G koncentráció szérumban (ng/ml)	55.84 ± 30.50	51.05 ± 26.99

**Folyamatos változók, amelyek átlag ± szórás (SD) formájában jelennek meg.*

A sHLA-G és PP13 koncentrációk változása nem volt szignifikáns a vizsgált időszakban a sem anyai szérumban sem a magzatvízben.

A sHLA-G szintek összefüggéseit elemeztük komplikációmentes terhességek és terhességi hipertóniával, diétával kezelt gesztációs diabetes mellitussal, SGA-val és LGA-val szövődött várandósságok között. Az anyai szérumban a sHLA-G koncentrációk magasabbak voltak LGA-

val rendelkező terhességekben ($p=0,044$). Nem találtunk szignifikáns eltérés egyik faktor koncentrációjában sem a terhességi hipertónia, diétával kezelt gesztációs diabetes mellitus és SGA esetében. A PP13 koncentrációk összefüggéseit szintén elemeztük komplikációmentes terhességek és terhességi hipertóniával, diétával kezelt gesztációs diabetes mellitussal, SGA-val és LGA-val komplikált terhességek között. Szignifikáns eltérést egyik kórállapottal kapcsolatban sem detektáltunk.

2. A sHLA-G és PP13 közötti lehetséges korrelációk vizsgálata

Kifejezett szignifikáns korreláció igazolódott a szérum sHLA-G és a magzatvíz sHLA-G koncentrációk között mindkét csoportban ($p<0.01$). Ez azzal magyarázható, hogy elsősorban az extravillous trophoblast (EVT) sejtek, de egyéb sejtek is szekretálnak sHLA-G-t ugyanarra az stimulusra, mind az anyai szérumba, mind a magzatvízbe. Emellett elképzelhető, hogy létezik egy egyedi transzportmechanizmus az sHLA-G számára a feto-placentáris interfészen keresztül.

A szérum sHLA-G és PP13 koncentrációk negatív korrelációt mutattak mindkét csoportban, de az eredetileg vizsgált populációban ez erőteljesebben volt jelen ($p<0.01$). Ez egy érdekes és új megfigyelés, amely ellentmond a két angiogén faktor hasonló funkcióiról szerzett legújabb ismereteinknek. Lehetséges, hogy közvetlen vagy közvetett kapcsolat van a molekuláris mechanizmusok között, például egy negatív visszacsatolási mechanizmus, amely befolyásolja a faktorok aktivitását.

3. Az anyai (anyai életkor, BMI, paritás), magzati (tarkóredő vastagság, biometriai adatok) és placentáris (placentáris térfogat és vaszkuláris indexek) tényezők hatása sHLA-G és PP13 koncentrációkra

Jelentős összefüggéseket találtunk a szérum sHLA-G koncentráció és a szonográfiai hasi percentilis között, valamint az ultrahanggal becsült magzati súly percentilisét illetően a válogatott populációban. A csoportok összehasonlítása során további érdekes megállapítások születtek a szérumban és magzatvízben található sHLA-G koncentrációk, valamint a placentális szonográfiai mérések vonatkozásában. Az eredetileg vizsgált csoportban a szérum sHLA-G

koncentráció a nagyobb placentális volumen mellett szignifikánsan magasabb volt ($p < 0.05$), de a válogatott csoportban nem mutatkozott ez az összefüggés. Az eredetileg vizsgált csoportban az anyai életkora pozitívan korrelál a placentáris térfogattal ($p = 0.02$), ezért az anyai életkort (< 36 év, > 35 év) és a placentális térfogatot ($< 201 \text{ mm}^3$, $> 200 \text{ mm}^3$) két csoportra osztottuk, és vizsgáltuk azok kapcsolatát a szérumban sHLA-G-vel. A sHLA-G koncentrációk nem mutattak különbséget a 201 mm^3 alatti placentáris térfogattal rendelkező csoportban. Ezzel szemben a 200 mm^3 feletti placentáris térfogattal rendelkező csoportban a 35 év feletti várandósok esetén jelentősen magasabb szérumban sHLA-G koncentrációk voltak mérhetők.

A szérumban sHLA-G és a VFI között fordított irányú, szignifikáns korrelációt találtunk a válogatott csoportban ($p < 0.05$), melyet az eredetileg vizsgált csoportban nem detektáltunk. A magzatvíz sHLA-G koncentrációja is fordított korrelációt mutatott a VFI-vel mind az eredetileg vizsgált populációban ($p < 0.01$), mind a válogatott csoportban ($p < 0.05$). Továbbá, a magzatvíz sHLA-G koncentrációja negatív korrelációt mutatott a VI-xel a válogatott csoportban ($p < 0.05$), míg az eredetileg vizsgált csoportban nem volt hasonló összefüggés.

A válogatott csoportban az anyai életkor pozitívan korrelált a VFI-vel. Ezért a VFI-t (< 9 , > 9) két csoportra osztottuk, és statisztikailag elemeztük a magzatvíz sHLA-G koncentrációinak összefüggését az anyai életkor alapján. A 35 év feletti várandósok esetén magasabb magzatvíz sHLA-G koncentrációt detektáltunk mind az alacsony, mind a magas VFI csoportokban.

Feltételezhető, hogy az sHLA-G expresszió reagálhat a csökkent véráramlásra és az egyre bővülő placentáris vaszkuláris hálózatra, mivel az sHLA-G részt vesz a vaszkulogenezis folyamatában. Másrészt, a deciduális NK sejtek és makrofágok HLA-G specifikus kölcsönhatása elősegíti az angiogén és proinflammatorikus faktorok kiválasztódását, amelyek a vaszkuláris átalakulásban szerepet játszanak, és befolyásolják a trophoblast invázió mértékét, ami összefüggésben áll a placentában mért alacsonyabb perfúziós indexekkel.

Érdekes megfigyelés volt, hogy komplikációmentes terhességek esetén a nyaki tarkóredőv vastagság és a második trimeszterben vett magzatvíz sHLA-G koncentrációja között fordított kapcsolat volt. Ennek patofiziológiája jelenleg ismeretlen.

A magzati biometria adatokat figyelembe véve a magzatvíz PP13 koncentráció egyenes arányú összefüggést mutatott a magzati haskörfogattal ($p < 0.05$). A placentáris szonográfiai paraméterek és a PP13 között nem volt szignifikáns kapcsolat.

4. A sHLA-G és PP13 összefüggése a terhességi kimenetekkel

A második trimeszteri sHLA-G koncentrációk nem befolyásolták a születési súlyt vagy a szülés időpontját.

A válogatott csoportban a szérumban és a magzatvízben PP13 koncentrációk szignifikáns negatív korrelációt mutattak a születési súllyal ($p < 0.05$). Míg az eredetileg vizsgált csoportban a szérumban PP13 koncentrációja nem mutatott szignifikáns összefüggést, addig a magzatvízben PP13 koncentrációja szignifikáns korrelációt igazolt ($p < 0.05$) a születési súllyal összefüggésben. Másrészt a magzatvízben PP13 koncentráció pozitív korrelációt mutatott a szülés időpontjával mindkét csoportban, és az összefüggés a válogatott csoportban jelentősebb volt ($p < 0.05$ / $p < 0.01$).

A második trimeszterben mért anyai szérumban és magzatvízben PP13 koncentrációk előre jelezhetik a születési súlyt nem patológiás terhességek során. Nincs rá konkrét magyarázat, hogy a magasabb második trimeszteri PP13 koncentráció miért és milyen folyamatok alapján jelzi előre az alacsonyabb születési súlyt, mivel ez a faktor a placentáris trophoblastok, az amnionmembrán és a villózus kapilláris endothelsejtek által szekretálódik, illetve részt vesz a normál beágyazódásban és a placentációban.

Az angiogén faktorok szintjének elemzése a chorionbohollyban, magzatvízben és anyai szérumban fiziológiás és patofiziológiás placentációban

1. Az angiogén faktorok fontosságának és szerepének összefoglalása a fiziológiás placentációban és a terhességgel összefüggő betegségekben

Az angiogén faktorok alapvető szerepet játszanak a terhességben, az implantációtól a szülésig. Számos olyan molekula ismert, amelyek hozzájárulnak a placentációhoz és a magzati fejlődéshez, de még mindig hiányos a tudásunk az összes faktor, a pontos molekuláris mechanizmusok és jelutak tekintetében. A várandósság során egy széleskörű és plasztikus kommunikációs hálózat működik egyensúlyban, hogy kedvező körülményeket biztosítson a feto-placentális fejlődés számára. Az angiogén faktorok számos funkcióval rendelkeznek, amelyek irányítják a terhesség fiziológiai lefolyását, beleértve a vaszkulogenezist, az angiogenezist, a vazodilatáció szabályozását, a magzati fejlődést, az immunmodulációt és a szülést is. A proangiogén és antiangiogén faktorok egyensúlyának hiánya terhességgel összefüggő kórállapotokat okozhat, ezért fontos, hogy azonosítsuk és vizsgáljuk ezen faktorokat, hogy megtudjuk, melyek használhatók biomarkerként olyan patológiás állapotok előrejelzésére vagy megelőzésére, mint a preeclampsia, a magzati növekedési visszamaradás, a gesztációs cukorbetegség, a vetélés vagy a koraszülés kockázata.

Kutatásaink célja, hogy meghatározzuk az angiogén faktorok (kiváltképp VEGF-A, eNOS, bFGF, HLA-G, PP13) koncentrációját a vizsgált terhességi korban és feltárjuk a befolyásoló tényezőket problémamentes terhességekben a késői első és második trimeszterben anyai vérmintákból, chorionboholly mintákból és magzatvíz mintákból. Eredményeink segíthetnek megérteni e faktorok szerepét egészséges terhességben, illetve elősegíthetik az eltérő koncentrációk és funkciók meghatározását a terhességgel összefüggő kórállapotok kialakulásában. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy összehasonlítsuk a patológiás állapotokkal komplikált terhességeket és a kontroll mintákat, figyelembe véve az angiogén faktorok koncentrációit és funkcióit minden trimeszterben.