



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TLR ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΦΕΓΓΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Μαρία Σάτρα, Ε.Δι.Π. Μοριακής Βιολογίας

Μέλος : Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής

Μέλος : Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A1. Η προεκλαμψία ως διαταραχή.....	11
A2. Παράγοντες κινδύνου για προεκλαμψία.....	13
A3. Παθογενετικοί μηχανισμοί προεκλαμψίας.....	14
A3.1. Ατελής Πλακουντιοποίηση - Μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών ..	15
A3.2. Ισχαιμία του πλακούντα	17
A3.3. Οξειδωτικό στρες	18
A3.4. Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο	19
A3.5. Δυσλειτουργία του Ενδοθηλίου	19
A3.6. Αντι-αγγειογενετικές συνθήκες	20
A3.7. Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II	21
A3.8. Συμμετοχή του συστήματος ανοσίας στην προεκλαμψία.....	22
A4. Βιοδείκτες προεκλαμψίας	25
A4.1. Παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση	25
A4.2. Κορίνη.....	27
A4.3. Ελεύθερο Εμβρυικό DNA	27
A4.4. Εμβρυική αιμοσφαιρίνη.....	27
A4.5. PAPP-A	28
A4.6. Βασοπρεσσίνη – Copeptin	28
A4.7. PP-13.....	29
A4.8. Κυστατίνη C	30
A4.9. miRNAs.....	30
A4.10. Γενετικοί Δείκτες.....	31
A5. Toll – Like υποδοχείς.....	34
A5.1. Υποδοχέας TL-2 (TLR-2)	36
A5.2. Υποδοχέας TL-4 (TLR-4)	37
A6. Toll – Like υποδοχείς & προεκλαμψία	39
A7. Σκοπός μελέτης.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	45
B1.Υλικά	46
B1.1. Χημικά Αντιδραστήρια.....	46

B1.2. Χρωστικές Ουσίες	46
B1.3. Όργανα - Συσκευές	46
B1.4. Αναλώσιμα	47
B2. Μέθοδοι	47
B2.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα με το QIAamp Mini Kit (QIAGEN) ..	47
B2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	49
B2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)	51
B2.3.1. Πρωτόκολλο PCR για TLR-2 με HOTSTART	52
B2.3.2. Πρωτόκολλο PCR για TLR-4 με HOTSTART	53
B2.4. Αλληλούχιση DNA κατά Sanger	54
B2.5. Μέθοδοι για Στατιστική Ανάλυση και Επεξεργασία Αποτελεσμάτων ..	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Πολυμορφισμοί γονιδίου *TLR* και προεκλαμψία» πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επιστημονική επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Σάτρα (Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας).

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, Δρ. Μ. Σάτρα, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Οι γνώσεις που μου μετέδωσε, σε συνδυασμό με τις συμβουλές και τις υποδείξεις της, αποδείχθηκαν πολύτιμες τόσο για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, όσο και για τη συνολική μου πορεία ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και βιολόγος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και την Επ. Καθηγήτρια κ. Μαρία Σαμαρά για τις συμβουλές τους καθώς επίσης και το διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος Αν. Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο συνάδελφο κ. Βαγγέλη Σουσουρογιάννη για την άψογη συνεργασία και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους καθηγητές και τη γραμματεία του μεταπτυχιακού προγράμματος και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. Η ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ ΩΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

Η εκλαμψία αναγνωρίστηκε αρχικά σαν μία σπασμώδης διαταραχή της κυήσεως. Ο όρος προέρχεται από την ελληνική λέξη έκλαμψις, αντανακλώντας την ξαφνική έναρξη των σπασμών σε εγκυμονούσες γυναίκες. Ο όρος προεκλαμψία εισήχθη αργότερα για να περιγράψει την κατάσταση που προηγείται της εκλαμψίας (*Lindheimer et al., 2012*).

Η προεκλαμψία εκδηλώνεται σαν επιπλοκή στο 3-5% όλων των εγκυμοσυνών και αποτελεί την κύρια αιτία της μητρικής θνησιμότητας, των πρόωρων γεννήσεων και κατ' επέκταση της νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας (*Chaiworapongsa et al., 2014*). Αριθμεί 8.5 εκατομμύρια περιπτώσεις (*Lambert et al., 2014*) και περίπου 63.000 μητρικούς θανάτους ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα (*Khan et al., 2006*). Η προεκλαμψία μπορεί να προχωρήσει σε εκλαμψία, η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση έντονων γενικευμένων σπασμών και επηρεάζει 2.7-8.2 γυναίκες ανά 10.000 τοκετούς (*Mahmoudi et al., 1999; Chaiworapongsa et al., 2014*). Είναι γεγονός ότι ούτε οι επιπτώσεις, ούτε η θεραπεία της ασθένειας έχουν αλλάξει ουσιωδώς μέσα στον τελευταίο αιώνα και σε σοβαρές περιπτώσεις, η μόνη αποτελεσματική θεραπεία παραμένει ο πρόωρος τοκετός του μωρού (*Roberts, et al. 2002; 2001*).

Μέχρι πρότινος η προεκλαμψία οριζόταν ως μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την ξαφνική εκδήλωση υπέρτασης (συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg) και πρωτεϊνουρίας (> 300 mg / 24 h) στις ≥ 20 εβδομάδες κύησης σε μία γυναίκα που μέχρι τότε παρουσίαζε φυσιολογική αρτηριακή πίεση. Πλέον, το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων προτείνει ότι η πρωτεϊνουρία δεν απαιτείται για τη διάγνωση της προεκλαμψίας. Καθώς η πρωτεϊνουρία δε θεωρείται υποχρεωτικό διαγνωστικό κριτήριο της προεκλαμψίας, αυτή μπορεί να διαγνωσθεί ως εμφάνιση υπέρτασης σχετιζόμενη με θρομβοκυτταροπενία, αυξημένες τρανσαμινάσες στο ήπαρ και βλάβη της νεφρικής λειτουργίας η οποία διαπιστώνεται με μέτρηση της κρεατινίνης του ορού (*Lambert et al., 2014*). Αν και το οίδημα ιστορικά αποτελούσε κι αυτό μέρος της διαγνωστικής τριάδας για την προεκλαμψία,

συνιστά παράλληλα κοινό χαρακτηριστικό της εγκυμοσύνης, γεγονός που εξαλείφει τη χρησιμότητά του σαν ειδικό παθολογικό σύμπτωμα. Ωστόσο, η ξαφνική εκδήλωση σοβαρού οιδήματος, ειδικά στο πρόσωπο και τα χέρια, μπορεί να είναι σύμπτωμα λόγω προεκλαμψίας και πολλές φορές αποτελεί τη μοναδική ανιχνεύσιμη από την ασθενή αλλαγή (Maynard et al., 2011).

Όντας ένα πολυσυστηματικό σύνδρομο, η προεκλαμψία στοχεύει αρκετά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του ήπατος και του εγκεφάλου. Οι επιπλοκές της προεκλαμψίας ή της εκλαμψίας περιλαμβάνουν αγγειο-εγκεφαλικά επεισόδια, ρήξη ήπατος, πνευμονικό οίδημα ή οξεία νεφρική ανεπάρκεια που μπορούν να οδηγήσουν σε μητρικό θάνατο. Η ενδοθηλίωση των σπειραματικών σωληναρίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των πρωτεϊνών στα ούρα και θεωρείται χαρακτηριστική βλάβη της προεκλαμψίας, αλλά μπορεί επίσης να προκύψει σε υγιείς εγκύους (Chaiworapongsa et al., 2014). Στον εγκέφαλο, το ήπαρ και τα επινεφρίδια, η εξάπλωση της ενεργοποίησης και καταστροφής του ενδοθηλίου οδηγεί σε βλάβες που συνάδουν με υποξία των ιστών (Roberts et al., 2002). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων που οδηγούνται σε θάνατο οφείλονται σε εγκεφαλική αιμορραγία, η οποία αποτελεί επακόλουθο της μη ελεγχόμενης υπέρτασης (Cantwell et al., 2011; Khan et al., 2006). Άλλες επιπλοκές της προεκλαμψίας είναι οι επιληπτικές κρίσεις (στην εκλαμψία), η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, το σύνδρομο HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzyme levels, Low Platelet levels – αιμόλυση, αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων*), διαταραχές της όρασης και η αποκόλληση του πλακούντα (Lambert et al., 2014).

Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται ως μία ετερογενής διαταραχή και κατηγοριοποιείται σε πρώιμη που εκδηλώνεται πριν τις 34 εβδομάδες ή όψιμη που εμφανίζεται στις/μετά από τις 34 εβδομάδες, σύμφωνα με την ηλικία κύησης κατά τη διάγνωση ή τον τοκετό (von Dadelszen et al., 2003). Έχει παρατηρηθεί ότι ο σχετικός κίνδυνος για περιγεννητικό θάνατο και σοβαρή νεογνική νοσηρότητα αυξάνεται στην πρώιμη προεκλαμψία συγκριτικά με την όψιμη. Έτσι, οι ασθενείς που εμφανίζουν προεκλαμψία πρώιμα πριν τις 34 εβδομάδες κύησης αντιπροσωπεύουν περίπου μόνο το 10% των συνολικών περιστατικών, αλλά τη μεγαλύτερη ομάδα μητρικών και περιγεννητικών

επιπλοκών (*Lisonkova et al., 2013*). Η πρώιμη προεκλαμψία σχετίζεται συχνά με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και παρουσιάζει μη φυσιολογικό Doppler για τις μητριάιες και ομφάλιες αρτηρίες (*Park et al., 2015*). Επίσης, σημειώνεται ότι τα περιστατικά πρώιμης εμφάνισης προεκλαμψίας καταλήγουν πιο συχνά σε πρόωρο τοκετό και αναπτύσσουν σύνδρομο HELLP, ενώ στην όψιμη προεκλαμψία η κατάσταση της μητέρας είναι συγκριτικά ηπιότερη και η πρόγνωση για το νεογνό ευνοϊκότερη συνήθως (*Xie et al., 2014; Lisonkova et al., 2013*).

Το εάν η πρώιμη και όψιμη προεκλαμψία διαθέτουν διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς ή είναι απλώς διαβαθμίσεις της ίδιας υποκείμενης πάθησης παραμένει ασαφές (*Chaiworapongsa et al., 2014*). Επιπρόσθετα, φαίνεται να διαφέρουν όσον αφορά σε αρκετούς παράγοντες κινδύνου και να οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα, επομένως θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως διαφορετικές οντότητες από αιτιολογικής και προγνωστικής πλευράς (*Lisonkova et al., 2013*).

A2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Οι παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη προεκλαμψίας περιλαμβάνουν τη χρόνια υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη, την ηλικία της μητέρας (<20 ετών ή >35 ετών), την παχυσαρκία, το ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, τη θρομβοφιλία, αυτοάνοσες διαταραχές, αγγειακές παθήσεις, νεφροπάθειες, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, το οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας (μητέρα ή αδερφή), την εθνικότητα και τις πολύδυμες κυήσεις (*Sibai, 2006; Sargent et al., 2006; Chaiworapongsa et al., 2014*). Οι προϋπάρχοντες παράγοντες κινδύνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αλλάζοντας την ευαισθησία σε προσαρμοστικές αλλαγές που εμπλέκονται στην εγκυμοσύνη και αυξάνοντας έτσι την επιρρέπεια στην προεκλαμψία (*Jadli et al., 2015*).

Η προεκλαμψία συχνά προκύπτει σε γυναίκες που διανύουν την πρώτη τους εγκυμοσύνη. Αυτή η παρατήρηση έχει αποδοθεί σε έναν ανοσολογικό μηχανισμό, καθώς το σύστημα ανοσίας της μητέρας αναπτύσσει ανοχή στα πατρικά αλλοαντιγόνα, μετά την έκθεση στο σπερματικό υγρό και/ή το σπέρμα. Η παρατεταμένη έκθεση στο σπέρμα πιστεύεται ότι αυξάνει τον

κίνδυνο ανάπτυξης της προεκλαμψίας, γεγονός που πιθανά να εξηγεί τον αυξημένο κίνδυνο αυτής της κατάστασης σε γυναίκες όπου μεσολαβεί σύντομο χρονικό διάστημα μεταξύ της πρώτης συνουσίας και της σύλληψης, σε αυτές που υποβάλλονται σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, σε γυναίκες που επιλέγουν ως μέθοδο αντισύλληψης το διάφραγμα και σε μητέρες που έχουν διαφορετικό σύντροφο στην επόμενη εγκυμοσύνη (*Redman et al., 2010*). Έχει προταθεί επίσης υπόθεση συμβολής του πατρικού παράγοντα στην πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι υπό ορισμένες προϋποθέσεις, διαφορετικοί σύντροφοι του ίδιου άνδρα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν προεκλαμψία, εφόσον αυτό έχει συμβεί ήδη μία φορά (*Dekker et al., 2011*).

Όπως προαναφέρθηκε διαφορετικοί παράγοντες φαίνεται να σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με την προδιάθεση για εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας με έμφαση στην εμφάνιση προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, την προϋπάρχουσα υπέρταση και την εθνικότητα, ενώ για την όψιμη προεκλαμψία το αυξημένο ρίσκο μπορεί να συνδέεται με το οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία της μητέρας και την αφρικάνικη καταγωγή (*Cetin et al., 2011*).

A3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Η προεκλαμψία έχει χαρακτηριστεί ως η «νόσος των θεωριών», γεγονός που υποδηλώνει τη σύγχυση που συνοδεύει την αιτιολογία και την παθοφυσιολογία της (*Roberts et al., 2001*). Τα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας εμφανίζονται στο δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης, αλλά οι αρχικοί παθογενετικοί μηχανισμοί προκύπτουν πολύ νωρίτερα (*Lambert et al., 2014*). Οι ρίζες της προεκλαμψίας είναι πολύπλοκες και φαίνεται να βασίζονται σε αναντιστοιχία των εμβρυοπλακουντιακών απαιτήσεων και της μητροπλακουντιακής παροχής (*von Dadelszen et al., 2002*), μια κατάσταση που επίσης προκύπτει στην ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (*Khong et al., 1986*). Ο πλακούντας κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη της διαταραχής. Η προεκλαμψία μπορεί να προκύψει και χωρίς την ύπαρξη εμβρύου στην περίπτωση υδατιδώδους μύλης (*Franzas, 1958*). Στους παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην προεκλαμψία ανήκουν η

ατελής πλακουντιοποίηση, το οξειδωτικό στρες, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα αυτοαντισώματα για τον υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η παρουσία αντι-αγγειογενετικών συνθηκών (*Chaiworapongsa et al., 2014*). Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι μία εκτεταμένη φλεγμονώδης απόκριση της μητέρας στην εγκυμοσύνη με έντονη ενεργοποίηση του συστήματος φυσικής ανοσίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας (*Redman et al., 1999; Sacks et al., 1999*).

A3.1. Ατελής Πλακουντιοποίηση - Μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης, η ροή αίματος στον πλακούντα αυξάνει για να διευκολύνει την αιμάτωση στο μεσολάχνιο χώρο του πλακούντα και να υποστηρίξει την ανάπτυξη του εμβρύου. Η αυξημένη ροή αίματος επιτυγχάνεται από τη φυσιολογική μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών του πλακούντα, μία διαδικασία που ξεκινά στο πρώτο τρίμηνο και ολοκληρώνεται στις 18-20 εβδομάδες κύησης (*Brosens et al., 1967; Gerretsen et al., 1981*). Η τροφοβλάστη εισβάλλει στο αρτηριακό τοίχωμα και μετατρέπει τις σπειροειδείς αρτηρίες από αγγεία με μικρή διάμετρο σε αγγεία με μεγάλη διάμετρο, επιτρέποντας έτσι την επαρκή αιμάτωση του πλακούντα (*Brosens et al., 1967*). Οι σπειροειδείς αρτηρίες, οι οποίες είναι στενά αγγεία, διαστέλλονται εντυπωσιακά στα άκρα προς το φθαρτό, χάνοντας το ενδοθήλιο, το λείο μυϊκό ιστό και το εσωτερικό ελαστικό στρώμα τους. Αυτές οι τροποποιήσεις εκτείνονται ενδότερα, στο 1/3 του μυομητρίου έχοντας ως αποτέλεσμα την μετατροπή του τελικού τμήματος των σπειροειδών αρτηριών σε μεγάλης διαμέτρου αγγεία που δε μπορούν να συσταθούν σε απόκριση σε χυμικά ή νευρικά σήματα (*Pijnenborg et al., 2006*).

Η παθοφυσιολογική διαδικασία της προεκλαμψίας ξεκινά με ατελή εισβολή της τροφοβλάστης νωρίς στην εγκυμοσύνη, η οποία προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες συμβάλλοντας στην ανάπτυξη συστηματικής δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στις μεταγενέστερες φάσεις της ασθένειας, με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της προεκλαμψίας (*Valenzuela et al., 2012*). Στην προεκλαμψία (και εκλαμψία), οι σπειροειδείς αρτηρίες δεν

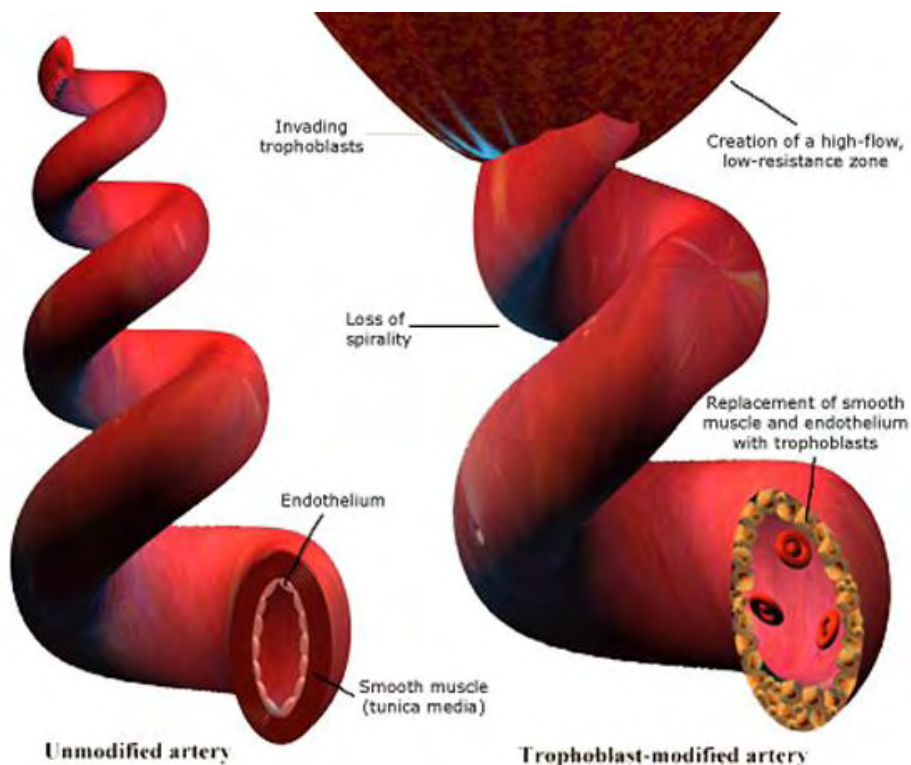
καταφέρνουν να πραγματοποιήσουν τη φυσιολογική μετατροπή που προαναφέρθηκε, γεγονός που θεωρείται ότι δικαιολογεί την μητροπλακουντιακή ισχαιμία κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου (*Chaiworapongsa et al., 2014*). Κάποια αγγεία υφίστανται αναδιαμόρφωση επιφανειακά, στα τμήματά που διέπουν το φθαρτό αλλά αυτή η αλλαγή δε φτάνει ποτέ στο μυομήτριο και κάποια αγγεία δε μετασχηματίζονται καθόλου (*Roberts et al., 2012*).



Εικόνα 1. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής πλακουντιοποίησης, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης σχηματίζουν μία άκρως εισβλητική εξωλαχνωτή τροφοβλάστη που μπορεί να μεταναστεύσει στο φθαρτό και να εισβάλει στο 1/3 του μυομητρίου, επάγοντας την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριδίων. Αυτές οι αλλαγές δε συμβαίνουν φυσιολογικά στην προεκλαμψία (*Valenzuela et al., 2012*). © Nuffield Department of Obstetrics

Επιπλέον, οι σπειροειδείς αρτηρίες που δεν έχουν υποστεί τη μετατροπή είναι επιρρεπείς σε αθηρωμάτωση, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία φορτωμένων με λιπίδια μακροφάγων μέσα στον αυλό, ινώδη νέκρωση του αρτηριακού τοιχώματος και περιαγγειακή διήθηση των μονοπύρηνων. Η αθηρωμάτωση μπορεί να παρακωλύει περαιτέρω τη ροή αίματος στον πλακούντα κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποτυχία της φυσιολογικής μετατροπής των αρτηριών δεν είναι ούτε ειδική για την προεκλαμψία, ούτε επαρκής για να την προκαλέσει, καθώς το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα γυναικολογικά σύνδρομα όπως η αυτόματη έκτρωση, η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, ο εμβρυϊκός

θάνατος, η ρήξη του πλακούντα, ο πρόωρος τοκετός και η πρόωρη ρήξη των υμένων (*Chaiworapongsa et al., 2014*).



Εικόνα 2. Διαδικασία μετατροπής των σπειροειδών αρτηριών. Σταδιακή απώλεια της φυσιολογικής μυϊκής ελαστικής δομής του αρτηριακού τοιχώματος και αντικατάσταση του λείου μυϊκού ιστού από κύτταρα τροφοβλάστης (<http://www.rcdrg.sgul.ac.uk/research/trophoblasts>).

A3.2. Ισχαιμία του πλακούντα

Η τροφοβλάστη αποτυγχάνει να αναδιαμορφώσει τις σπειροειδείς αρτηρίες, οδηγώντας σε υποαιμάτωση και ισχαιμία του πλακούντα (*Lambert et al., 2014*), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην απελευθέρωση παραγόντων στη μητρική κυκλοφορία, οι οποίοι είναι ικανοί να επάγουν τις κλινικές εκδηλώσεις της ασθένειας. Αυτή η αντίληψη προήλθε από παρατηρήσεις του ότι αποφράξεις του πλακούντα αποτελούν κοινό φαινόμενο σε ασθενείς με εκλαμψία. Το 1914, οι ερευνητές πρότειναν ότι οι αποφράξεις του πλακούντα οφείλονται σε παρεμβολή στη μητρική παροχή αίματος στον πλακούντα και ότι ένας νεκρωτικός πλακούντας απελευθερώνει διαλυτούς παράγοντες απευθείας στο μεσολάχνιο χώρο και τη μητρική κυκλοφορία. Αυτοί οι διαλυτοί

παράγοντες πιστεύεται ότι προκαλούν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ενδοαγγειακή φλεγμονή και ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού (*Chaiworapongsa et al., 2014*).

A3.3. Οξειδωτικό στρες

Μέχρι περίπου τις 10 εβδομάδες κύησης το έμβρυο βρίσκεται σε περιβάλλον χαμηλού οξυγόνου εφοδιαζόμενο με θρεπτικά συστατικά από τις εκκρίσεις των ενδομήτριων αδένων (*Burton et al., 2010*). Η φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου στον πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο είναι μόνο περίπου 3% O₂ (*Rodesch et al., 1992*). Στη φυσιολογική διαδικασία της πλακουντιοποίησης, η διείσδυση της τροφοβλάστης ρυθμίζεται από την κλίση της συγκέντρωσης οξυγόνου μεταξύ του πλακούντα και των αρτηριών της μητέρας (*Genbacev et al., 1997*). Η τροφοβλάστη αποκρίνεται στο αρχικά χαμηλό οξυγόνο με πολλαπλασιασμό και στο ακόλουθο περιβάλλον υψηλού οξυγόνου λόγω αιμάτωσης, με μειωμένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση προς ένα διεισδυτικό φαινότυπο (*Zhou et al., 1998*).

Το οξειδωτικό στρες είναι σχετικό με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, αφού επάγει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, καθώς επίσης και κυτταρικά κατάλοιπα από την τροφοβλάστη (*Cindrova-Davies et al., 2007a*). Η αιτία του οξειδωτικού στρες στους πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία πιστεύεται ότι είναι η εναλλαγή υποξίας και επανοξυγόνωσης, που πιθανώς προκύπτει σαν αποτέλεσμα της ατελούς μετατροπής του τμήματος των σπειροειδών αρτηριών στο μυομήτριο (*Burton et al., 2011*). Η παραμένουσα κατάσταση υποαιμάτωσης δημιουργεί υποξία στον πλακούντα και τοπικό οξειδωτικό στρες, έχοντας ως αποτέλεσμα μια συστηματική φλεγμονώδη απόκριση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (*Ness et al., 1996*). Η έκθεση στις αυξημένες ρίζες οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε καρβοξυλίωση των πρωτεϊνών, υπεροξειδωση των λιπιδίων και οξείδωση του DNA, όλα εκ των οποίων έχουν παρατηρηθεί σε πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία (*Burton et al., 2011*). Έχει βρεθεί ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων αυξάνεται πριν και μετά τον τοκετό σε γυναίκες με προεκλαμψία, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται υπό συνεχές οξειδωτικό στρες που συμβάλλει σε φλεγμονώδη απόκριση (*Barden et al.,*

2001). Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του πλακούντα διαταράσσονται σε ασθενείς με προεκλαμψία όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη (Vaughan et al., 2002).

A3.4. Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Οι στενές σπειροειδείς αρτηρίες δημιουργούν συνθήκες για ισχαιμία – βλάβη επαναιμάτωσης στο μεσολάχνιο χώρο. Η βλάβη αυτή μπορεί με τη σειρά της να οδηγήσει σε στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο ρυθμίζει την ομοιόσταση του κυττάρου μέσω της συμμετοχής του στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και το δίπλωμα των πρωτεϊνών (Zhang et al., 2008). Σε συνθήκες υποξίας, το ενδοπλασματικό δίκτυο αναστέλλει το δίπλωμα των πρωτεϊνών (απόκριση αποδιεταγμένης πρωτεΐνης, unfolded protein response - UPR). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι και απόπτωση (Burton et al., 2009). Η απόπτωση της τροφοβλάστης οδηγεί σε απελευθέρωση μικρο- και νανο-σωματιδίων στη μητρική κυκλοφορία, τα οποία μπορεί να διεγείρουν ενδοαγγειακή φλεγμονώδη απάντηση (Redman et al., 2007). Στοιχεία που υποστηρίζουν την εμπλοκή του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο στην προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της απόκρισης UPR όπως φαίνεται από την αύξηση παραγόντων που εμπλέκονται σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, χαρακτηριστικά της ενεργοποίησης της UPR, που ακολουθεί μετά το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο στον πλακούντα (Burton et al., 2009; Lian et al., 2011).

A3.5. Δυσλειτουργία του Ενδοθηλίου

Αν και η προεκλαμψία φαίνεται να πηγάζει από τον πλακούντα ο ιστός που επηρεάζεται περισσότερο είναι το μητρικό ενδοθήλιο (Maynard et al., 2011). Κοινή αντίληψη αποτελεί το γεγονός ότι το ενδοθήλιο των αγγείων συνιστά έναν πρώιμο στόχο της παθοφυσιολογικής τροποποίησης στην προεκλαμψία (Roberts, 1998). Η καταστροφή ή δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου εμπλέκεται σε διάφορες παθογενείς καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης και η προεκλαμψία, όπου παρατηρούνται αλλαγές στη σύνθεση -

απελευθέρωση από το ενδοθήλιο αγγειοδραστικών μεσολαβητών (όπως προστακυκλίνη, θρομβοξάνη, νιτρικό οξύ), κυτταρικών μορίων προσκόλλησης και κυτταροκινών και αλλαγές στη διαπερατότητα των αγγείων (*Roberts et al., 1989*). Επιπρόσθετα, στην προεκλαμψία είναι πλέον καλά καθορισμένη η μορφολογική αλλαγή του ενδοθηλίου των σπειροειδών τριχοειδών στα σπειραματικά σωληνάρια των νεφρών που συνοδεύει τη διαταραχή και έχουν προσδιοριστεί αλλαγές της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε αγγεία που έχουν εξεταστεί *in vitro* από γυναίκες με προεκλαμψία (*Roberts et al., 2001*).

A3.6. Αντι-αγγειογενετικές συνθήκες

Η αγγειογένεση και ο σχηματισμός νέων αιματοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα, είναι ουσιώδεις προϋποθέσεις για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη (*Ferrara et al., 1996*). Η μη σωστή αγγειογένεση έχει θεωρηθεί από παλιά ως ένα μονοπάτι προς την προεκλαμψία (*Torry et al., 1998*) και ενδελεχής έρευνα έδειξε ότι μία αντι-αγγειογενετική κατάσταση εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας (*Maynard et al., 2003*).

Ο ανθρώπινος πλακούντας παράγει μια ποικιλία αγγειογενετικών παραγόντων, με πιο σημαντικούς τους VEGF και PlGF (*Levine et al., 2004*). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) είναι ειδικό για το ενδοθήλιο μιτογόνο που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην προώθηση της αγγειογένεσης και στα ώριμα αγγεία σταθεροποιεί το ενδοθήλιο (*Maharaj et al., 2008*). Ο VEGF αλληλεπιδρά με δύο υψηλής συγγένειας υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, τους KDR και Flt-1, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (*Dvorak, 2002*). Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (Placental Growth Factor – PlGF) είναι επίσης ένας αγγειογενετικός παράγοντας αύξησης που ενισχύει τη σηματοδότηση του VEGF αποσυνδέοντας τον VEGF από τον Flt-1 και επιτρέποντάς του έτσι να συνδεθεί με τον πιο ενεργό KDR (*Autiero et al., 2003; Kendall et al., 1996*). Μελέτες έχουν δείξει ο πλακούντας απελευθερώνει διαλυτό Flt-1 (soluble Flt-1 - sFlt-1) στη μητρική κυκλοφορία, ο οποίος ανταγωνίζεται τόσο τον VEGF όσο και τον PlGF, προσδένοντάς τους και εμποδίζοντάς τους να αλληλεπιδράσουν με τους ενδογενείς υποδοχείς τους. Με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στην

υπέρταση, την πρωτεϊνουρία και τη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζονται με την προεκλαμψία (*Vitoratos et al., 2012*). Η κυρίαρχη πηγή των αυξημένων στο πλάσμα επιπέδων sFlt-1 στην προεκλαμψία είναι ο πλακούντας (*Maynard et al., 2003*), αν και ο sFlt-1 μπορεί επίσης να παράγεται από μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (*Rajakumar et al., 2005*).

Ένας δεύτερος αντι-αγγειογενετικός παράγοντας που εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας είναι η διαλυτή ενδογλίνη (soluble endoglin – sEng), ένας συνυποδοχέας των TGF-β1 και TGF-β3 που επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Venkatesha et al., 2006*). Το μόριο αυτό παρεμβαίνει στη σύνδεση του TGF-β1 με τον υποδοχέα του και με τον τρόπο αυτό επηρεάζει την παραγωγή νιτρικού οξέος, την αγγειοδιαστολή και το σχηματισμό των τριχοειδών από ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* (*Mutter et al., 2005*). Σε ζωικά μοντέλα, η sEng δρα μαζί με τον sFlt-1 επάγοντας μία σοβαρή κατάσταση που προσομοιάζει στην προεκλαμψία (*Levine et al., 2006*).

A3.7. Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανταποκρισιμότητα στην αγγειοτενσίνη II. Ωστόσο, οι εγκυμονούσες με προεκλαμψία έχουν αυξημένη ευαισθησία στις επιδράσεις της αγγειοτενσίνης II, μία διαφορά που μπορεί να εντοπιστεί στις 24 εβδομάδες κύησης (*Gant et al., 1974*). Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη φυσιολογική αντίσταση στην αγγειοτενσίνη II σε μία υγιή εγκυμοσύνη και για την ενισχυμένη απόκριση σε αυτή στην προεκλαμψία περιλαμβάνουν γενετική προδιάθεση, μη προσαρμοσμένες ανοσολογικές απαντήσεις και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (*Dechend et al., 2009*). Μία υποκατηγορία γυναικών έχουν ανιχνεύσιμα στον ορό αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II (αυτοαντισώματα AT₁) (*Wallukat et al., 1999*), τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα σε ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και μεσαγγειακά κύτταρα (*Chaiworapongsa et al., 2014*). Τα αυτοαντισώματα AT₁ μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση της οξειδάσης

NADPH, ένα βασικό ένζυμο στη σύνθεση των δραστικών ριζών οξυγόνου, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες (Xia et al., 2013). Αυτά τα αυτοαντισώματα επίσης μπορούν να διεγείρουν τον sFlt-1 και επομένως να οδηγήσουν σε μια αντι-αγγειογενετική κατάσταση (Parrish et al., 2010).

A3.8. Συμμετοχή του συστήματος ανοσίας στην προεκλαμψία

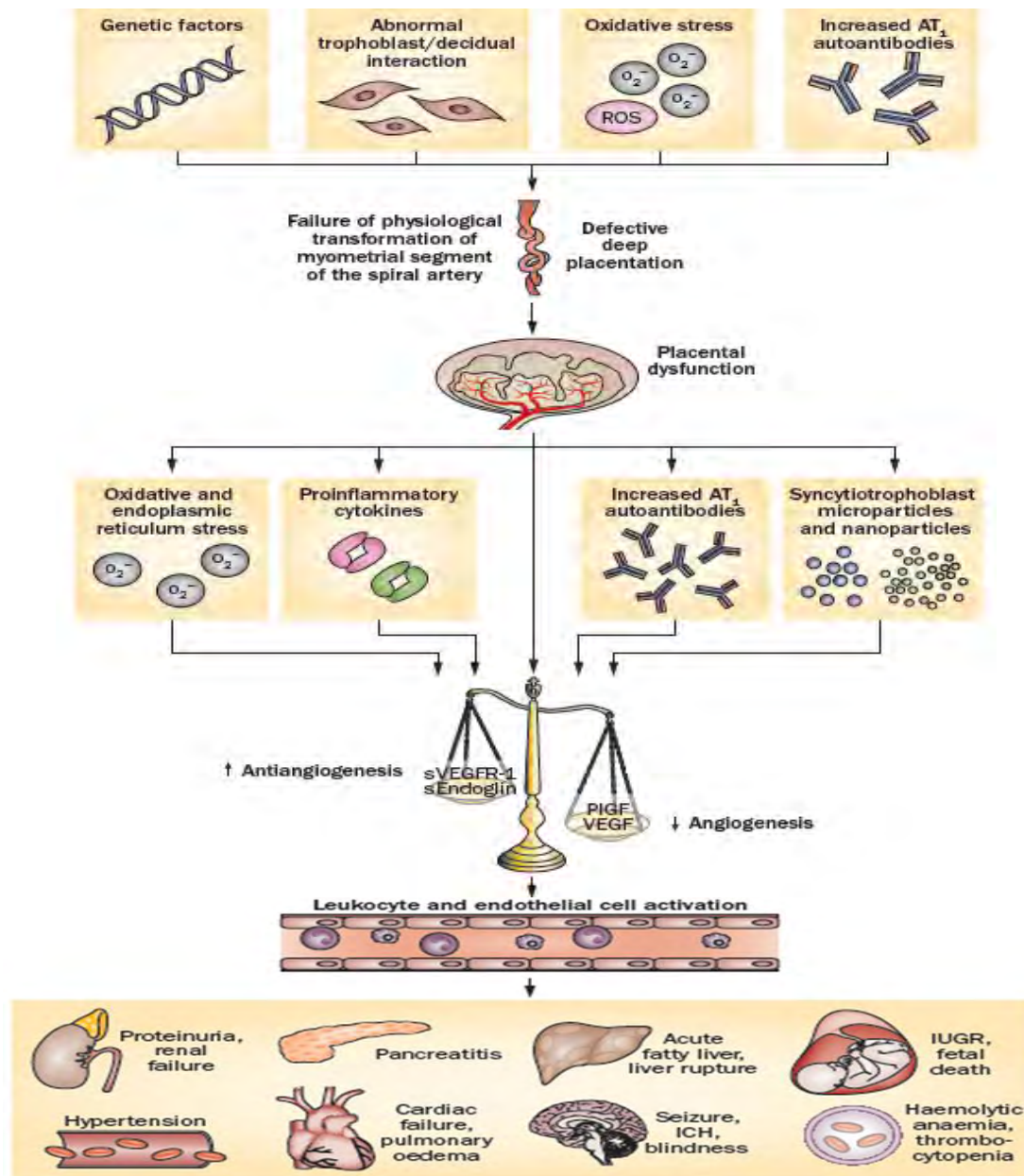
Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από ισχυρή ανοσολογική παρουσία στη διασύνδεση μητέρας – εμβρύου στην οποία κυριαρχούν κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας (Moffett et al., 2008). Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης, το 70% των λευκοκυττάρων του φθαρτού είναι κύτταρα φυσικοί φονείς, 20-25% είναι μακροφάγα και 1.7% είναι δενδριτικά κύτταρα. Από το σύστημα της ειδικής ανοσίας απουσιάζουν τα Β κύτταρα αλλά τα Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν το 1-3% των ανοσοκυττάρων του φθαρτού. Η παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος στο ενδομήτριο για επιτυχή εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου (Abrahams et al., 2005b; Koga et al., 2009).

Η εμφύτευση του εμβρύου αποτελείται από τρεις διαδοχικές φάσεις, την απόθεση, την προσκόλληση και την διείσδυση και σε κάθε ένα από αυτά τη βήματα η τροφοβλάστη αντιμετωπίζει διαφορετικού τύπου ανοσοκύτταρα και μικροπεριβάλλοντα. Επομένως, η ορθή επικοινωνία ανάμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας και την τροφοβλαστη είναι κρίσιμη και αλλαγές σε αυτή την επικοινωνία μπορεί να έχουν επιπλοκές στην εγκυμοσύνη. Επιπλέον, ενδομήτριες λοιμώξεις έχουν συσχετισθεί με περιπτώσεις πρόωρου τοκετού, ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης και προεκλαμψίας (Abrahams et al., 2005b).

Η ενεργοποίηση της απόκρισης του συστήματος φυσικής ανοσίας που παρατηρείται στη φυσιολογική εγκυμοσύνη εντείνεται στην προεκλαμψία (Redman et al., 2004; von Dadelszen et al., 2002). Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα είναι παρόντα στην εμβρυϊκή και πλακουντιακή κυκλοφορία σε υποξικές συνθήκες και μπορούν να συμβάλλουν στην αυξημένη αντίσταση των αγγείων και τη νοσηρότητα του εμβρύου που

παρατηρείται στην προεκλαμψία (*Mellembakken et al., 2001*). Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο αίμα μητέρων με προεκλαμψία (*Lau et al., 2013*). Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι κάποια χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας, όπως η υπέρταση και το οξειδωτικό στρες στον πλακούντα, μπορεί να προκαλούνται από μεσολάβηση του TNF, της IL-6 ή της IL-17 (*McCarthy et al., 2011; Dhillon et al., 2012*). Η μη φυσιολογική έκφραση των κυτταροκινών σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην εκτεταμένη φλεγμονώδη απόκριση και στη γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρούνται στην προεκλαμψία (*Sado et al., 2011*). Σημαντική θεωρείται και η απελευθέρωση μικρο- και νανοσωματιδίων από τη συγκυτιοτροφοβλάστη στη μητρική κυκλοφορία, που μαζί με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες που παράγονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες δημιουργούν ενδοαγγειακή φλεγμονή (*Redman et al., 2007; Cindrova-Davies et al., 2007a*).

Επίσης, έχει προταθεί ότι η ελαττωματική πλακουντιοποίηση μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα συνδυασμών ανοσολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τόσο το φθαρτό όσο και την τροφοβλάστη. Πράγματι, η εμφύτευση επιφέρει συνθήκες στις οποίες τα εμβρυικά κύτταρα (τα οποία φέρουν πατρικά αντιγόνα) έρχονται σε επαφή με τα μητρικά κύτταρα στο φθαρτό και είναι κρίσιμο το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας να μην απορρίψει την τροφοβλάστη. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς στο φθαρτό, τα μόρια HLA-C στην εμβρυική τροφοβλάστη και τα ρυθμιστικά T κύτταρα έχουν εμπλακεί στην κατάσταση ανοχής που σχετίζεται με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, καθώς επίσης και με την προεκλαμψία (*Redman et al., 2010*).



Εικόνα 3. Προτεινόμενο μοντέλο της πολύπλοκης παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας. Γενετικοί (συμπεριλαμβανομένης της ασυμβατότητας μητρικού-εμβρυικού γονοτύπου) και περιβαλλοντικοί (έκθεση στα πατρικά αντιγόνα πριν τη σύλληψη) παράγοντες διαταράσσουν την ανοσορύθμιση που επάγεται φυσιολογικά στην κύηση, οδηγώντας στην παθολογία τροφοβλάστης και φθαρού, την επιφανειακή εισβολή στο ενδομήτριο και την αποτυχία της φυσιολογικής μεταμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Ο βαθμός της ισχαιμίας της μήτρας καθορίζεται από τη σοβαρότητα της αποτυχίας της πλακουντοποίησης και τις απαιτήσεις του εμβρύου για παροχή αίματος. Οι μαιευτικές διαταραχές προκύπτουν όταν αυτοί οι δύο παράγοντες είναι ασύμφωνοι. Η χρονικότητα και η έκταση της ασυμφωνίας προσδιορίζουν την κλινική εκδήλωση (θάνατος του εμβρύου, προεκλαμψία με IUGR, IUGR μόνο και όψιμη προεκλαμψία). Η προεκλαμψία προκύπτει σαν αποτέλεσμα προσαρμοστικών απαντήσεων που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, αντι-AT₁ αντισώματα, αγγειογενετικούς και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες και σωματίδια προερχόμενα από τη συγκυτιοτροφοβλάστη στη μητρική κυκλοφορία. Συνολικά, αυτοί οι παράγοντες διεγείρουν την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, την ενδοαγγειακή φλεγμονή και τη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι συνέπειες αυτών των διαδικασιών στα διάφορα όργανα, οδηγούν στα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας (Chaiworapongsa et al., 2014).

A4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ

Μια ποικιλία μοριακών παραγόντων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας (*Haram et al., 2014*). Η πολυπαραγοντική και ετερογενής φύση της νόσου έχει προαγάγει τη χρήση συνδυασμού βιοχημικών και βιοφυσικών δεικτών για την -όσο είναι δυνατόν- έγκαιρη πρόβλεψή της (*Jadli et al., 2015*). Κανένας βιοδείκτης μέχρι τώρα δεν έχει από μόνος του επαρκή προγνωστική αξία για την προεκλαμψία, προκειμένου να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων βιοδεικτών, καθένας από τους οποίους αντιπροσωπεύει μια διαφορετική παθοφυσιολογική διαδικασία, θα μπορούσε δυνητικά να αυξήσει την πιθανότητα δημιουργίας κατάλληλων προγνωστικών αλγορίθμων (*Park et al., 2015*). Οι ερευνητές συνεχίζουν να βρίσκονται προς αναζήτηση ενός συνδυασμού βιοδεικτών που είτε να δουλεύει καλύτερα από το Doppler μητριάων αρτηριών, είτε συσχετιζόμενος με αυτό να διατηρήσει την υψηλή ευαισθησία και να βελτιώσει την ειδικότητα (*Harrington et al., 2011*). Παρακάτω παρουσιάζονται διάφοροι υποψήφιοι βιοδείκτες για την προεκλαμψία από τη διεθνή βιβλιογραφία.

A4.1. Παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση

Όπως προαναφέρθηκε, στην προεκλαμψία, παρατηρείται μια ανισορροπία ανάμεσα στους αγγειογενετικούς (VEGF και PlGF) και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες (sFlt1 και sEng). Οι παράγοντες αυτοί σε συνδυασμό με βιοφυσικούς δείκτες όπως το Doppler μητριάων αρτηριών και τη μέση αρτηριακή πίεση έχουν αναλυθεί για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας (*Jadli et al., 2015*). Ο ρόλος και ο πιθανός μηχανισμός δράσης τους περιγράφεται παραπάνω (βλ. σελ. 14).

Ενώ στη φυσιολογική εγκυμοσύνη τα επίπεδα του sFlt-1 είναι σχετικά χαμηλά, υπό υποξικές συνθήκες ο πλακούντας απελευθερώνει sFlt-1 και sEng (*Laresgoiti-Servitje, 2013*). Τα επίπεδα του sFlt-1 είναι υψηλότερα στην πρώιμη προεκλαμψία σε σχέση με την όψιμη, καθιστώντας το μόριο πιθανό βιοδείκτη για την εμφάνιση προεκλαμψίας πριν τις 34 εβδομάδες (*Van de Merwe et al., 2010*). Η πλακουντιακή έκφραση και τα επίπεδα στον ορό του sFlt-1 σε προεκλαμπτικές γυναίκες είναι αυξημένα συγκριτικά με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, ενώ τα επίπεδα του PlGF είναι χαμηλά λόγω της

πρόσδεσης στον sFlt-1. Αναλογία sFlt-1/PIGF ≥ 85 στο πλάσμα σχετίζεται με δυσμενή έκβαση και τοκετό μέσα σε δύο εβδομάδες παρουσίας (*Rana et al., 2014*). Ο συνδυασμός της αναλογίας sFlt-1/PIGF δευτέρου και τρίτου τριμήνου αποδίδει ένα ποσοστό ανίχνευσης 87,5% για την έγκαιρη πρόβλεψη της προεκλαμψίας σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (με πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων 10%) (*Park et al., 2014*). Τα επίπεδα στον ορό του sFlt-1 είναι άμεσα συνδεδεμένα με τη βαρύτητα της νόσου επομένως η αναλογία sFlt-1/PIGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της βαρύτητας της προεκλαμψίας και να παρέχει επιπλέον πολύτιμες πληροφορίες για την αντιμετώπιση των ασθενών (*Engels et al., 2013; Leaños-Miranda et al., 2013*). Όσον αφορά στη sEng, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδά της στην κυκλοφορία αυξάνονται σημαντικά 2-3 μήνες πριν την εμφάνιση προεκλαμψίας μαζί με αύξηση της αναλογίας sFlt-1/PIGF (*Levine et al., 2006*). Πρόσφατα, οι Sachan et al. επισήμαναν ότι τα μέσα επίπεδα sEng ήταν σχεδόν 7 φορές υψηλότερα σε σοβαρή προεκλαμψία αναφορικά με την ομάδα ελέγχου, προτείνοντας τη sEng ως ένα αποτελεσματικό πιθανό προγνωστικό δείκτη για την προεκλαμψία (*Sachan et al., 2016*).

Ένας άλλος αντι-αγγειογενετικός παράγοντας είναι η ενδοστατίνη, η οποία *in vitro* εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, ενώ επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. *In vivo*, τα ίδια τα τροφοβλαστικά κύτταρα προκειμένου να καταστείλουν τη διείσδυσή τους, παράγουν πρωτεάσες που απελευθερώνουν τοπικά ενδοστατίνη από το φθαρτό. Γυναίκες με ακόλουθη πρώιμη προεκλαμψία εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ενδοστατίνης από το πρώτο τρίμηνο, ωστόσο η ενδοστατίνη έχει φτωχή προγνωστική αξία για κλινική χρήση. Είναι απαραίτητες μεγαλύτερες έρευνες που θα αναλύουν το ρόλο της ενδοστατίνης σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες στην πρόβλεψη της προεκλαμψίας (*Thissier-Levy et al., 2013*).

Πρωτεΐνες με αγγειογενετική δραστικότητα έχουν επίσης συσχετισθεί με την προεκλαμψία. Η αγγειοποιητίνη-1 και -2 εμπλέκονται στην εμφύτευση και την πλακουντιακή αγγειογένεση και έχει προταθεί ότι τα επίπεδά τους στο πλάσμα διαφοροποιούνται πριν την εμφάνιση προεκλαμψίας (*Maynard et al., 2011*).

A4.2. Κορίνη

Το κολπικό νατριουρητικό πεπτιδίο (ANP) είναι μια καρδιακή πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και της ομοιόστασης του νατρίου (*Wu et al., 2009; Zhou et al., 2009*). Η κορίνη είναι μία διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης και μετατρέπει το πρόδρομο ANP σε ενεργό ANP. Τόσο η κορίνη όσο και το ANP θεωρούνται βιοδείκτες για καρδιοαγγειακές παθήσεις και διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει αυξημένα επίπεδα ANP σε προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες (*Khalil et al., 2015*). Έχει βρεθεί ότι η κορίνη προωθεί τη διείσδυση τροφοβλάστης και την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών και τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της κορίνης στη μήτρα είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με προεκλαμψία συγκριτικά με γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη (*Cui et al., 2012*). Πλέον η κορίνη θεωρείται από πολλούς ένας πιθανός χρήσιμος βιοδείκτης για την προεκλαμψία (*Khalil et al., 2015; Liu et al., 2015*).

A4.3. Ελεύθερο Εμβρυικό DNA

Η αρχική πηγή του έλευθερου εμβρυικού DNA (cell-free fetal DNA – cffDNA) θεωρείται η απόπτωση των κυττάρων του πλακούντα ως αποτέλεσμα της φυσιολογικής ανανέωσης των κυττάρων. Η αυξημένη ποσότητα cffDNA που παρατηρείται ανάμεσα στις γυναίκες που αναπτύσσουν προεκλαμψία μπορεί έμμεσα να παρέχει πληροφορίες για τις συνθήκες που επικρατούν στον πλακούντα. Τα επίπεδα cffDNA αυξάνονται πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων και μπορεί να οφείλονται σε υποξία και οξειδωτικό στρες που οδηγούν σε αυξημένη απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων του πλακούντα, αντανακλώντας την ανεπάρκεια του πλακούντα γυναικών που εμφανίζουν προεκλαμψία σε πρώιμη ηλικία κύησης. Επομένως, το cffDNA συνιστά έναν υποσχόμενο δείκτη για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας, ειδικά της πρώιμης (*Martin et al., 2014*).

A4.4. Εμβρυική αιμοσφαιρίνη

Η εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF έχει προταθεί σαν ένας νέος προγνωστικός βιοδείκτης για την προεκλαμψία και ως υποψήφιος αιτιολογικός παράγοντας (*Park et al. 2015*). Έχει διαπιστωθεί αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της

HbF και συσσώρευση εξωκυττάριας HbF στον αυλό των αγγείων σε πλακούντες με προεκλαμψία (*Centlow et al., 2008*). Υπό υποξικές συνθήκες στον πλακούντα, η έκφραση των γονιδίων και των πρωτεϊνών HbF αυξάνεται και προκαλεί το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου, οξειδωτικής καταστροφής και διαρροής στον εμβρυομητρικό φραγμό, καταλήγοντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, υπέρταση και πρωτεϊνουρία, τα οποία είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της προεκλαμψίας (*Olsson et al., 2010*). Οι Anderson et al. έχουν βρει σημαντικά αυξημένα επίπεδα της HbF σε γυναίκες με προεκλαμψία και την έχουν προτείνει σαν προγνωστικό βιοχημικό δείκτη πρώτου και δευτέρου τριμήνου (*Anderson et al, 2015a; 2015b; 2011*).

A4.5. PAPP-A

Η αύξηση του πλακούντα και του εμβρύου προωθούνται από την παρουσία της PAPP-A στον πλακούντα, η οποία είναι μία πρωτεάση της IGFBP4 (insulin-like growth factor binding protein 4) και παράγεται από τα αναπτυσσόμενα τροφοβλαστικά κύτταρα (*Lawrence et al., 1999*). Με την πρωτεολυτική της δράση η PAPP-A ρυθμίζει θετικά τη βιοδιαθεσιμότητα των insulin-like growth factors (*Lawrence et al., 1999*), των οποίων η διαφοροποιημένη δραστηριότητα νωρίς στην εγκυμοσύνη έχει συσχετισθεί με απώλεια της κύησης, υπέρταση, προεκλαμψία, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό και θάνατο του εμβρύου (*Yliniemi et al., 2015*). Χαμηλά επίπεδα PAPP-A στον ορό σχετίζονται με την εμφάνιση προεκλαμψίας, αντανακλώντας πιθανώς βλάβη στην πλακουντιοποίηση (*Poon et al., 2010*). Τα επίπεδα της PAPP-A στο πρώτο τρίμηνο μαζί με αυτά των fhCGβ, AFP, PIGF, και sTNFR1 και σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά της μητέρας είναι προγνωστικά της ανάπτυξης πρόωρης προεκλαμψίας (*Yliniemi et al., 2015*).

A4.6. Βασοπρεσσίνη – Copeptin

Η προεκλαμψία διακρίνεται από μία χαμηλή σε ρενίνη υπερτασική κατάσταση σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη. Καθώς άλλες ανάλογες υπερτασικές διαταραχές εκτός εγκυμοσύνης συχνά παρουσιάζουν και κάποιες φορές εξαρτώνται από την έκκριση αυξημένων επιπέδων βασοπρεσσίνης (arginine vasopressin - AVP), προέκυψε η υπόθεση πιθανής χρήσης των μετρήσεων

της AVP στο πλάσμα για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας (*Santillan et al., 2014*). Η AVP έχει μικρό χρόνο ημιζωής (5-20 min στην κυκλοφορία), γεγονός που δυσχεραίνει την εκτίμηση της έκκρισής της με απευθείας μέτρηση της ορμόνης. Η copeptin είναι το αδρανές καρβοξυτελικό άκρο της πρόδρομης πρωτεΐνης από την οποία προκύπτει η AVP. Η copeptin βρίσκεται σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με την AVP και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από αυτή, πράγμα που την καθιστά ένα χρήσιμο βιοδείκτη για την έκκριση της AVP (*Dobša et al., 2013; Santillan et al., 2014*). Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αύξηση της copeptin στην κυκλοφορία στο δεύτερο τρίμηνο και στις αρχές του τρίτου (*Zulfikaroglu et al., 2011*), αλλά και κατά τον τοκετό σε προεκλαμπτικές γυναίκες (*Foda et al., 2012*). Υπερέκκριση της AVP παρατηρήθηκε και στις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης σε γυναίκες που τελικώς εμφάνισαν προεκλαμψία και η copeptin βρέθηκε σημαντικά προγνωστική για την προεκλαμψία από την έκτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης (*Santillan et al., 2014*).

A4.7. PP-13

Η PP-13 (γαλεκτίνη 13) είναι μέλος της υπεροικογένειας των γαλεκτινών στη συγκυτιοτροφοβλάστη (*Than et al., 2009*). Ο ρόλος της στην ανάπτυξη του πλακούντα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως αλλά αρκετές μελέτες αναφέρουν τη συμμετοχή της στη διείσδυση τροφοβλάστης και πιθανώς στην αναδιαμόρφωση των μητρικών σπειροειδών αρτηριών μέσω της επαγωγής της απελευθέρωσης προστακυκλίνης (*De Muro et al., 2016*). Η PP-13 στον ορό φτάνει σε διπλάσιες και τριπλάσιες τιμές πριν τον τοκετό στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (*Huppertz, 2008*). Έχει βρεθεί ότι από τις 5-7 εβδομάδες κύησης, τα επίπεδα της PP-13 στον ορό είναι σημαντικά χαμηλότερα σε γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία (*Huppertz et al., 2008; Gonen et al., 2008*). Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι και τα επίπεδα του mRNA της PP-13 είναι μειωμένα, ειδικά στην πρώιμη προεκλαμψία (*Than et al., 2008*). Μία πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι τα μειωμένα επίπεδα της PP-13 από το πρώτο κιάλας τρίμηνο αντιπροσωπεύουν ένα παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη προεκλαμψίας και μπορεί να αποτελέσουν πρώιμο δείκτη για την εμφάνιση υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου (*Muro et al., 2016*).

A4.8. Κυστατίνη C

Η κυστατίνη C είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης που χρησιμοποιείται ευρέως από τους κλινικούς σαν ένας ευαίσθητος δείκτης της λειτουργίας των νεφρών και για την εκτίμηση του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης (*Grubb, 2000*). Η πλακουντιακή έκφραση της κυστατίνης C αυξάνεται στην προεκλαμψία τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας αυξημένη σύνθεση και έκφραση του μορίου της κυστατίνης C, η οποία με τη σειρά της δικαιολογεί και τα αυξημένα επίπεδα της στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (*Kristensen et al., 2007*). Η κυστατίνη C έχει προταθεί ως ένας αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης πρώτου τριμήνου για την προεκλαμψία (*Kolialexi et al., 2015; Ćabarkapa, 2015; Lopez-Hernandez et al., 2016*).

A4.9. miRNAs

Τα miRNAs είναι μη κωδικοποιούντα για πρωτεΐνες RNAs που ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση των γονιδίων και η απορύθμιση της έκφρασης τους σχετίζεται με διάφορες ασθένειες αλλά και με δυσμενείς επιπλοκές στην εγκυμοσύνη όπως οι αυτόματες αποβολές (*Ventura et al., 2013*). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα miRNAs μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας, χρησιμεύοντας παράλληλα και σαν πιθανοί βιοδείκτες για τη νόσο (*Gilad et al., 2008*). Γενικά στον υγιή πλακούντα έχουν ταυτοποιηθεί πολλά miRNAs και αλλαγές στην έκφραση αυτών σε περιπτώσεις πλακουντιακής ανεπάρκειας υποδηλώνουν ένα ρόλο για τη σηματοδότηση μέσω miRNA στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (*Park et al., 2015*). Αρκετά miRNAs όπως τα miR-210, miR-155, miR-196, miR-195, miR-26 και miR-181a, έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στην προεκλαμψία ενώ σε άλλα όπως τα miR-144 και miR-223 παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση. Επιπλέον, έχουν παρουσιαστεί και αντικρουόμενα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη ρύθμιση άλλων miRNAs στην προεκλαμψία. Η διαφορετικότητα στην έκφραση των miRNAs φαίνεται επίσης να σχετίζεται με τη σοβαρότητα και την χρονική έναρξη της νόσου. Από τα 120 miRNAs που έχουν αναφερθεί σε μέχρι τώρα μελέτες να εμπλέκονται στην προεκλαμψία, το miR-210 είναι αυτό που δείχνει να έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική πλακουντιοποίηση και να αποτελεί ένα πιο πιθανό βιοδείκτη για την προεκλαμψία (*Jairajpuri et*

al., 2016). Το miR-210 αυξάνεται σε υποξικές συνθήκες και έχει συσχετισθεί με γεγονότα που αποτελούν αναπόσπαστα παθογενετικά στάδια της προεκλαμψίας όπως την απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην υποξία, τη δημιουργία τριχοειδών δομών, την καθοδηγούμενη από το VEGF μετανάστευση των κυττάρων, την κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση (*Enquobahrie et al.*, 2011).

Τα miRNAs είναι ένας υποσχόμενος προγνωστικός δείκτης αλλά είναι η αξιολογούμενη η αντιφατική φύση των προφίλ έκφρασής τους από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες. Υπάρχουν διαφορετικές μεταβλητές που χρειάζονται προσοχή για την τυποποίηση της μεθοδολογίας για τη μελέτη της έκφρασης των miRNAs και τη συσχέτισή τους με την προεκλαμψία (*Zhao et al.*, 2013).

A4.10. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η προεκλαμψία είναι μια νόσος με ισχυρή οικογενειακή προδιάθεση, η οποία ποικίλει σύμφωνα με γεωγραφικά και φυλετικά χαρακτηριστικά. Φαίνεται να υπάρχει μία γενετική συσχέτιση με μία πολυπαραγοντική πολυγονιδιακή κληρονομικότητα στην ανάπτυξη αυτής της ασθένειας (*Valenzuela et al.*, 2012). Σε μελέτες διδύμων, οι εκτιμήσεις της κληρονομησιμότητας της προεκλαμψίας παρουσιάζουν ένα εύρος από 22-47% (*Thornton et al.*, 1999). Πολλά γονίδια και πολυμορφισμοί έχουν εξετασθεί σε ότι αφορά τη σχέση τους με την προεκλαμψία και οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία πρόβλεψης εμφάνισης της νόσου (*Valenzuela et al.*, 2012). Υποψήφια γονίδια από ποικίλα βιολογικά μονοπάτια όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, ο έλεγχος της αγγειακής αντίστασης, η πήξη του αίματος, καθώς και διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και τις μεταβολικές διαδικασίες, έχουν υπάρξει αντικείμενο μελέτης πολλών εργασιών γενετικής συσχέτισης (*Park et al.*, 2015).

Μπορεί κάποιος πολυμορφισμοί να σχετίζονται με την προεκλαμψία, όμως δε σημαίνει ότι αυτό ισχύει για όλους τους πληθυσμούς (*Roberts*, 2000). Για παράδειγμα, μία παραλλαγή του *MTHFR* είναι παρούσα σε προεκλαμπτικές

γυναίκες στην Ιαπωνία και την Ιταλία αλλά όχι σε δύο πληθυσμούς των Ηνωμένων Πολιτειών όπου μελετήθηκε (*Powers et al., 1999*).

Γενετικοί πολυμορφισμοί των κυτταροκινών έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί δείκτες επιρρέπειας στην προεκλαμψία, ο C590T της IL-4, ο G1108A στο γονίδιο της IL-10, ο A874G της ιντερφερόνης γ και ο G308A του TNF- α (*Fraser et al., 2008*).

Ο πολυμορφισμός G1377A στο γονίδιο του υποδοχέα Fas φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου (*Huang et al., 1997*) και ο γονότυπος Fas-1377AA εντοπίστηκε με στατιστικά σημαντική διαφορά σε ασθενείς με προεκλαμψία. Ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να κατέχει αιτιολογικό ρόλο στη δημιουργία προεκλαμψίας και περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να επιβεβαιώσει το ρόλο αυτό (*Masoumi et al., 2016*).

Το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης συμβάλλει στη διείσδυση τροφοβλάστης και τη μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το σύστημα έχει το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης και με βάση μία μελέτη όπου ελέγχθηκε ο γονότυπος 106 γυναικών με προεκλαμψία, ο πολυμορφισμός του γονιδίου ACE I/D σε γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας επηρεάζει τη μητροπλακουντιακή και ομφάλια ροή αίματος και την επανεμφάνιση προεκλαμψίας (*Mello et al., 2003*).

Έχουν βρεθεί στοιχεία γενετικής συσχέτισης με την προεκλαμψία για τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (*ERAP1* και 2). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος μέσω του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης μαζί με το σύστημα φυσικής ανοσίας. Το προϊόν του γονιδίου *ERAP1* κόβει τους υποδοχείς για τις ιντερλευκίνες 1 και 6 και τον TNF- α στην επιφάνεια των κυττάρων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη σηματοδότησή τους και έχοντας με αυτό τον τρόπο προφλεγμονώδεις επιδράσεις (*Johnson et al., 2009*).

Το γονίδιο του υποδοχέα τύπου 2 της ακτιβίνης *ACVR2A* στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q22) έχει συσχετισθεί με την επιρρέπεια στην προεκλαμψία. Το γονίδιο *ACVR2A* μπορεί να επηρεάζει τη

δραστηριότητα της ακτιβίνης A, η οποία εμπλέκεται στη διείσδυση της τροφοβλάστης στο φθαρτό και στις σπειροειδείς αρτηρίες καθώς επίσης και στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών (*Roten et al., 2009*).

Ο πολυμορφισμός Tyr113His στο εξώνιο 3 του *EPHX* (γονίδιο της μικροσωματικής εποξικής υδρολάσης) σχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου και έχει βρεθεί ότι μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ενδογενών ή εξωγενών ενώσεων, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει σε αυξημένη επιρρέπεια στην προεκλαμψία (*Zusterzeel et al., 2001*).

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η ορμονική αναπροσαρμογή οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου της λεπτίνης. Γυναίκες με προεκλαμψία εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης στον ορό από τις υγιείς εγκυμονούσες. Τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης σχετίζονται με την πίεση του αίματος (*Anim-Nyame et al., 2000*). Ο υποδοχέας της λεπτίνης ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων κυτταροκινών και το γονίδιο του (*LEPR*) μεταγράφεται στις λάχνες και την τροφοβλάστη. Τα επίπεδα του υποδοχέα στον ορό συσχετίζονται με τη συγκέντρωση της λεπτίνης στο περιφερικό αίμα (*Henson et al., 1998*). Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της λεπτίνης (*Muy-Rivera et al., 2005*) αλλά και του υποδοχέα της (*Rigo et al., 2006*) έχουν συνδεθεί με αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης προεκλαμψίας.

Τέλος, μελέτες υποψηφίων γονιδίων έχουν δείξει σημαντικές συσχετίσεις πολυμορφισμών και προεκλαμψίας για ακόμη κάποια γονίδια στο μητρικό γονιδίωμα. Στα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνονται η α1(I) και α2(IV) αλυσίδα του κολλαγόνου (*COL1A1*), η IL-1α (*IL1A*), η λυμφοτοξίνη α (*LTA*), ο παράγοντας von Willebrand (*VWF*), ο παράγοντας πήξης V (*F5*), η ομάδα των θρομβοφιλικών γονιδίων, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (*LPL*), ο αναστολέας πεπτιδάσης σερίνης 1 (*SERPINE*) (*Chaiworapongsa et al., 2014; Park et al., 2015*).

A5. TOLL – LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

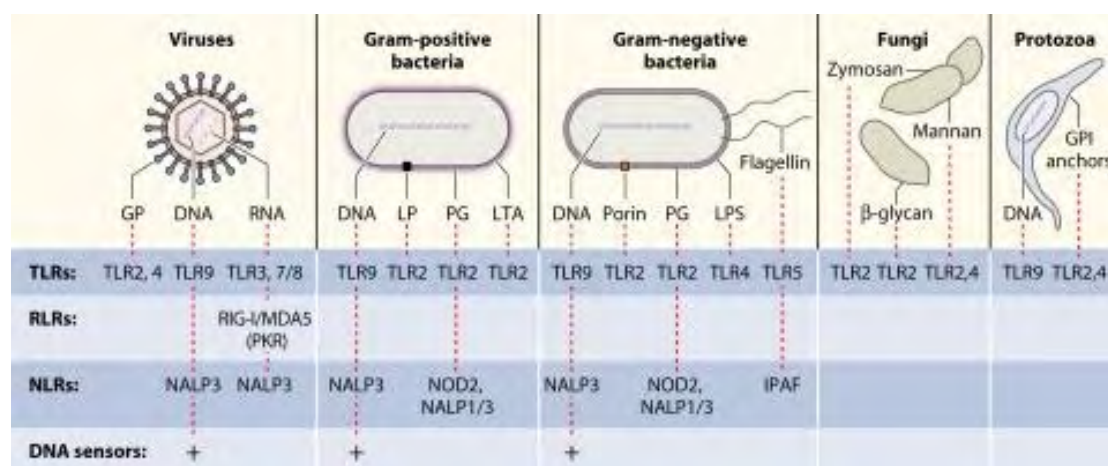
Το γονίδιο *Toll* αρχικά ανακαλύφθηκε στη *Drosophila* με σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του ραχαιοκοιλιακού άξονα κατά την εμβρυογένεση του εντόμου. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το *Toll* διαθέτει επίσης αντιμικητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες στην ενήλικη μύγα (*Abrahams et al., 2005a*). Στα θηλαστικά έχει ταυτοποιηθεί μια οικογένεια γονιδίων ομόλογων του *Toll*, τα οποία ονομάστηκαν υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors - TLRs) (*Kumazaki et al., 2004*).

Οι TLRs αποτελούν μέρος του συστήματος φυσικής ανοσίας που παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι στα εισβάλλοντα παθογόνα. Αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν σε μία τάξη υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων (Pattern-Recognition Receptors - PRRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω εξελικτικά συντηρημένων δομών που δεν υπάρχουν στον ξενιστή και είναι γνωστές ως «μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών» (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) (*Kawai et al., 2009*). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι PRRs αναγνωρίζουν και ενδογενή ιστικά σήματα κινδύνου (Danger Associated Molecular Patterns - DAMPs), όπως δραστικές ρίζες οξυγόνου, DNA, ATP, υαλουρονικό οξύ και ολιγοσακχαρίτες, ινωδογόνο, οξειδωμένη LDL και πρωτεΐνες θερμικού σοκ που προέρχονται από κύτταρα που βρίσκονται σε συνθήκες στρες ή έχουν υποστεί τραυματισμό (*Abrahams et al., 2005a; Μαυρούλη & συν., 2014*). Σύνδεση των TLRs με μικροβιακά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα μια φλεγμονώδη ανοσολογική απάντηση που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κυτταροκινών και αντιμικροβιακών παραγόντων (*Medzhitov et al., 1997*).

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I που μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή αλλά και ετεροδιμερή και εκφράζονται σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και κυττάρων που δεν ανήκουν σε αυτό (*Kawai et al., 2009*). Αποτελούνται από εξωκυττάρια δομές που περιέχουν ποικίλους αριθμούς επαναλαμβανόμενων μοτίβων πλούσιων σε λευκίνη μέσω των οποίων αναγνωρίζονται τα παθογόνα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική σηματοδοτική επικράτεια

ομόλογη με αυτή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (Toll/IL-1 receptor domain - TIR) (Bowie et al., 2000). Η επικράτεια TIR είναι μια συντηρημένη αλληλουχία διακοσίων αμινοξέων (O'Neill, 2008) και είναι κρίσιμη στη σηματοδότηση μέσω των TLRs (Kawai et al., 2009).

Πλέον γίνεται συζήτηση για μία αυξανόμενη οικογένεια δεκατριών TLRs στα θηλαστικά, δέκα από τους οποίους εκφράζονται στους ανθρώπους. Έχουν προσδιοριστεί όλοι οι συνδέτες για τους ανθρώπινους TLRs εκτός του TLR-10 (Riley et al., 2010). Κάθε υποδοχέας διαφέρει ως προς το συνδέτη που προσδέεται σε αυτόν. Έτσι ενώ, ξεχωριστά κάθε TLR απαντά σε περιορισμένους συνδέτες, συνολικά η οικογένεια των TLRs μπορεί να ανταποκριθεί σε ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που σχετίζονται με βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα (Abrahams et al., 2005a).



Εικόνα 4. Οι Toll-like υποδοχείς και οι συνδέτες τους. Χαρακτηριστικοί συνδέτες είναι τα νουκλεϊκά οξέα, όπως το DNA, το dsRNA, το ssRNA και το 5'-τριφωσφορικό RNA, καθώς και οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες-GP, λιποπρωτεΐνες-LP και τα συστατικά της μεμβράνης (πεπτιδογλυκάνη-PG, λιποτειχοϊκό οξύ-LTA, λιποσακχαρίτες LPS και άγκυρες GPI) (Mogensen, 2009).

Οι TLRs 1, 2, 4, 5, 6, και 10 βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και αναγνωρίζουν συστατικά της μεμβράνης των μικροβίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες. Οι TLRs 3, 7, 8, και 9 είναι παρόντες στο κυτταρόπλασμα, εντοπίζονται αποκλειστικά σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα και τα ενδολυσοσώματα και διαδραματίζουν ρόλο κλειδί στην αναγνώριση κυτάρων μολυσμένων από ιό εντοπίζοντας ξένα νουκλεϊκά οξέα προκειμένου να πυροδοτήσουν την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (Riley, 2010;

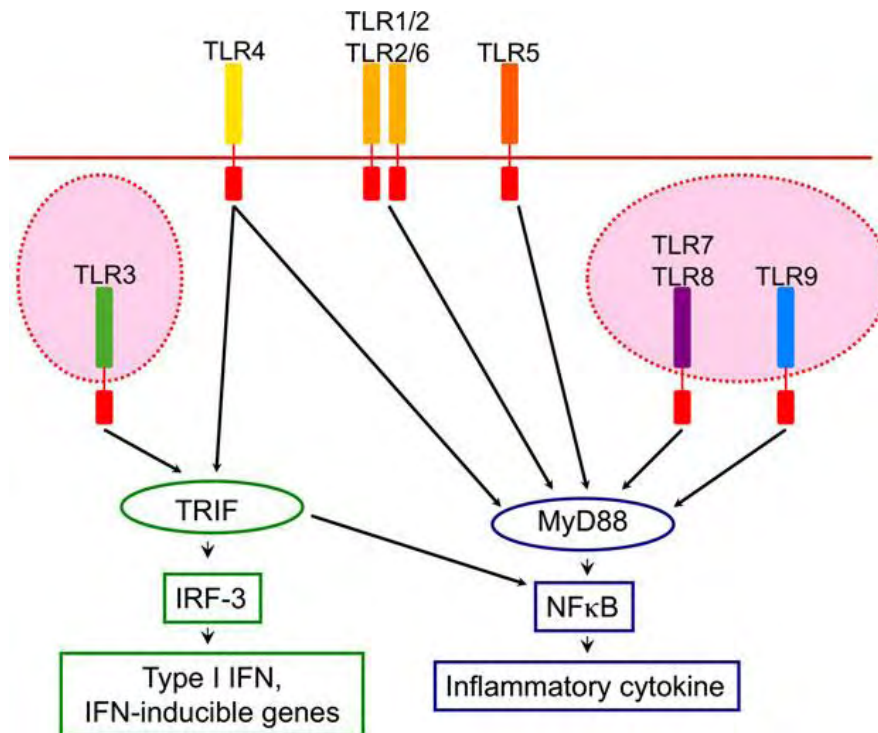
Amirchaghmaghi et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, ο TLR-3 αναγνωρίζει δίκλωνο RNA, οι TLR-7 και TLR-8 αναγνωρίζουν ιούς με μονόκλωνο RNA ενώ ο TLR-9 μεσολαβεί στις αποκρίσεις των κυττάρων στο βακτηριακό DNA μέσω αναγνώρισης ζευγαριών κυτοσίνης – γουανίνης και επιπλέον ενεργοποιείται από τον ιό του έρπητα (*Koga et al., 2014*).

Η πρόσδεση των συνδετών στους TLRs συχνά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών κι αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω ενός κοινού ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού. Με το που αναγνωρίζουν το μόριο συνδέτη, οι TLRs στρατολογούν την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη MyD88, που οδηγεί σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων κινασών, ο οποίος πυροδοτεί την ενεργοποίηση του NFκB μονοπατιού και τη δημιουργία τελικώς φλεγμονώδους απόκρισης (*Akira et al., 2003*).

Οι TLR-3 και TLR-4 μπορούν επίσης να επάγουν σηματοδότηση μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από το MyD88, μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα TRIF, το οποίο όχι μόνο μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του NFκB, αλλά επίσης οδηγεί και στη φωσφορυλίωση του ρυθμιστικού παράγοντα 3 της ιντερφερόνης IRF-3. Αυτό το εναλλακτικό μονοπάτι δημιουργεί μία αντιϊκή απάντηση που σχετίζεται με την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και γονίδια που επάγονται από τις ιντερφερόνες (*Yamamoto et al., 2003; Takeuchi et al., 2000*).

A5.1. Υποδοχέας TL-2 (TLR-2)

Από όλους τους TLRs που έχουν ταυτοποιηθεί, ο TLR-2 έχει την ευρύτερη ειδικότητα. Ο TLR-2 προσδέεται με λιποπρωτεΐνες Gram-θετικών, Gram-αρνητικών και μυκοβακτηρίων, με πεπτιδογλυκάνες Gram-θετικών βακτηρίων καθώς επίσης και με τη ζυμοσάνη των μυκήτων. Φαίνεται ότι η αναγνώριση ορισμένων μικροβιακών προϊόντων από τον TLR-2 υποδοχέα εξαρτάται από το σχηματισμό ετεροδιμερών είτε με τον TLR-1 είτε με τον TLR-6. Το σύμπλοκο TLR-2/TLR-1 αναγνωρίζει βακτηριακές τριακυλιωμένες πρωτεΐνες ενώ το ετεροδιμερές TLR-2/TLR-6 αναγνωρίζει διακυλιωμένες λιποπρωτεΐνες των μυκοβακτηρίων (*Abrahams et al., 2005a*).



Εικόνα 5. Μοριακή σηματοδότηση μέσω των TLRs (Koga et al., 2014).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TLR-2 εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q32) (Rock et al., 1998). Ανάμεσα στους διάφορους πολυμορφισμούς του *TLR-2*, ο Arg753Gln (G2258A) είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος και έχει συσχετισθεί με ευαισθησία στη φυματίωση (Ogus et al., 2004). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει ως αποτέλεσμα υποκατάσταση της αργινίνης σε γλουταμίνη στο κατάλοιπο 753, οδηγώντας σε εξασθενημένη απάντηση των μακροφάγων στα βακτηριακά πεπτιδία και κατ' επέκταση εξασθενημένη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Lorenz et al., 2000). Ο πολυμορφισμός Arg677Trp του *TLR-2* (C2029T) οδηγεί σε υποκατάσταση της αργινίνης σε τρυπτοφάνη στη θέση 677 και έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζει την ικανότητα του TLR-2 να μεσολαβεί στην απόκριση στα συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος (Bochud et al., 2003).

A5.2. Υποδοχέας TL-4 (TLR-4)

Ο TLR-4 εκφράζεται από πολλούς τύπους κυττάρων, κυρίως από τα κύτταρα που μετέχουν στη φυσική ανοσία όπως τα μακροφάγα, από τα κοκκιοκύτταρα και από τα δενδριτικά κύτταρα (Rehli, 2002). Ο TLR-4 συμμετέχει στην

αναγνώριση των λιποσακχαριτών , οι οποίοι αποτελούν βασικό συστατικό των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*Hoshino et al., 1999*). Η αποτελεσματική ενεργοποίηση του TLR-4 από τους λιποσακχαρίτες απαιτεί την αλληλεπίδρασή τους με το CD14 και τη βοηθητική πρωτεΐνη MD-2. Ο TLR-4 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από άλλα είδη μορίων όπως το λιποτεχοϊκό οξύ των Gram-θετικών βακτηρίων, τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP60 και HSP70 και κυτταρικά θραύσματα φιμπρονεκτίνης (*Koga et al., 2014*).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TLR-4 εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9q32–q33) (*Rock et al., 1998*). Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί για το ανθρώπινο γονίδιο του TLR-4, από τους οποίους οι Asp299Gly και Thr399Ile φαίνεται να έχουν λειτουργική σημασία και έχουν διερευνηθεί πιο εκτεταμένα σε μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly αντιστοιχεί σε μία μετάβαση από αδενίνη σε γουανίνη στο νουκλεοτίδιο 896 (A896G) οδηγώντας σε υποκατάσταση του ασπαρτικού οξέος από τη γλυκίνη στη θέση 299. Ο πολυμορφισμός Thr399Ile είναι μία μετάβαση από κυτοσίνη σε θυμίνη στο νουκλεοτίδιο 1196 (C1196T) που έχει ως αποτέλεσμα μια αμινοξική αλλαγή από θρεονίνη σε ισολευκίνη στη θέση 399 (*Arbour et al., 2000*). Και οι δύο πολυμορφισμοί είναι λιγότερο δραστικοί από το φυσικού τύπου αλληλόμορφο. *In vitro* έλεγχοι έδειξαν μειωμένη δραστικότητα σε ποσοστό 5-10% για τον πολυμορφισμό Asp299Gly και 20-30% για τον Thr399Ile, συγκριτικά με το φυσικό τύπο (*Dembic, 2013*). Οι δύο πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile φαίνεται να είναι συνδεδεμένοι και να συνκληρονομούνται στον πληθυσμό (*Lorenz et al., 2002*). Ειδικότερα, στους δυτικούς πληθυσμούς ο διπλά πολυμορφικός γονότυπος παρατηρείται σε ποσοστό 98%. Στοιχειομετρική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών έδειξε ότι καθένας από αυτούς οδηγεί σε ξεχωριστές δομικές αλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του υποδοχέα (*Rallabhandi et al., 2006*). Οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν συσχετισθεί με παθογενείς καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση (*Kiechl et al., 2002*) και η κολίτιδα (*Manolakis et al., 2013*). Ο πρόωρος τοκετός μπορεί να προκύψει ως συνέπεια ουρογεννητικής μόλυνσης, η οποία συχνά προκαλείται από Gram - αρνητικά βακτήρια. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό (*Dembic, 2013*).

A6. TOLL – LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ & ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας πρέπει να επιδείξει ανοχή στο αλλογενές κατά το ήμισυ έμβρυο, ενώ παράλληλα να υπερασπίζεται το σώμα έναντι στα παθογόνα. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν υποθέσει ότι μία ανεπαρκής ανοχή του εμβρύου από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να εκδηλωθεί ως προεκλαμψία. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλει στην αιτιολογία της προεκλαμψίας παραμένει απροσδιόριστος (*Chatterjee et al., 2012*).

Το σύστημα φυσικής ανοσίας που εξαρτάται από τους TLRs έχει βασικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή, επομένως η ενεργοποίηση των TLRs στα τροφοβλαστικά κύτταρα επιδρά στη στρατολόγηση ανοσοκυττάρων, στην προφλεγμονώδη έκκριση κυτταροκινών και σε αποκρίσεις του φθαρτού στα εισβάλλοντα παθογόνα κατά την κύηση (*Riley et al., 2010*). Οι TLRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο κυτταρικό στρες κατά την εγκυμοσύνη λόγω πλακουντιοποίησης και τοκετού (*Cindrova-Davies et al., 2007b*) και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η έκφραση τους ρυθμίζεται με ένα παροδικό και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (*Koga et al., 2010*). Η ενεργοποίησή τους από τους συνδέτες τους στα πλακουντιακά κύτταρα πρώτου και τρίτου τριμήνου επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των κυττάρων του συστήματος φυσικής ανοσίας (*Dabagh-Gorjan et al., 2014*). Παρόλο που τα κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας είναι απαραίτητα, όπως έχει αναφερθεί πιο πριν, για μία επιτυχή εμφύτευση και προστασία από μολύνσεις, τα ίδια αυτά κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν σε ορισμένες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένης και της προεκλαμψίας, η οποία χαρακτηρίζεται σαν μία κατάσταση συνεχούς φλεγμονής (*Abrahams et al., 2005b; Riley et al., 2010*).

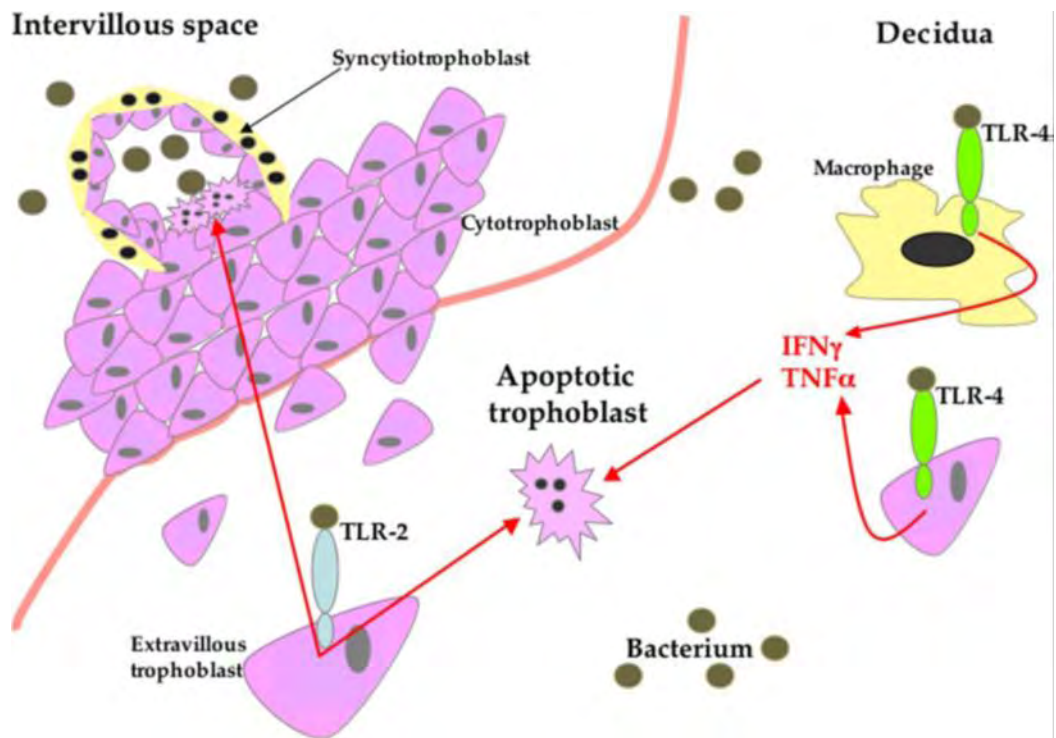
Αλλαγές στην έκφραση των TLRs αποτελούν μία πιθανή σύνδεση μεταξύ του συστήματος φυσικής ανοσίας και της μη φυσιολογικής πλακουντιοποίησης στην προεκλαμψία (*Kim et al., 2005*). Αυξημένη έκφραση του mRNA του TLR-4 έχει αναφερθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα παθολογικών αγγείων του

πλακούντα (*Wang et al., 2005*), καθώς επίσης έχει σημειωθεί και αυξημένη έκφραση του TLR-4 αλλά όχι του TLR-2 επίσης στα διάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα γυναικών με προεκλαμψία (*Kim et al., 2005*). Ωστόσο, αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Pineda et al., οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένη έκφραση στην τροφοβλάστη τόσο του TLR-4 όσο και του TLR-2 (*Pineda et al., 2011*). Άλλοι TLRs που έχουν συσχετισθεί σε επίπεδο πρωτεϊνών με την προεκλαμψία, είναι οι TLR-3, TLR-7, και TLR-8 των οποίων τα επίπεδα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε πλακούντες προεκλαμπτικών γυναικών κατά τον τοκετό (*Chatterjee et al., 2012*).

Σε γυναίκες με προεκλαμψία η έντονη απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ που εκφράζονται υπό συνθήκες στρες όπως η ισχαιμία και η παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών, παρέχουν εύρος συνδετών για πρόσδεση και ενεργοποίηση των TLRs, οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονή, η οποία θεωρείται από τους κύριους συντελεστές στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (*Ishihara et al., 2002; Borzychowski et al., 2006; Kregel, 2002; Kumazaki et al., 2004*). Επίσης και βακτηριακά συστατικά (λιποσακχαρίτες) που συνδέονται με τον TLR-2 και TLR-4 έχουν εμπλακεί στην αιτιολογία κάποιων μορφών προεκλαμψίας (*Chatterjee et al., 2012*).

Δεδομένου ότι οι TLR-4 και TLR-2 εκφράζονται στα κύτταρα της τροφοβλάστης πρώτου τριμήνου επάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών και την απόπτωση αντίστοιχα, οι Abrahams et al. πρότειναν ότι ένα παθογόνο ή ενδογενές σήμα κινδύνου μπορεί μέσω του TLR-2 να επάγει αυξημένη απόπτωση στην τροφοβλάστη, μία κατάσταση που παρατηρείται σε διάφορες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, προτείνοντας ένα μηχανισμό παθογένεσης λόγω μόλυνσης και για την προεκλαμψία (*Abrahams et al., 2005a*).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι σε ζωικά μοντέλα έχει δειχθεί ότι η συνεχής διέγερση μέσω TLR στα τροφοβλαστικά κύτταρα επάγει την παραγωγή μεσολαβητών φλεγμονής και ειδικά έκκριση του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα sFlt1 (*Nakada et al., 2009*).



Εικόνα 6. Ένα μοντέλο για την επαγωγή της απόπτωσης της τροφοβλάστης σε εγκυμοσύνες που επιβαρύνονται από μολύνσεις. Η κυτταρική απόπτωση μπορεί να προκύπτει απευθείας από την ενεργοποίηση του TLR-2. Εναλλακτικά, η αυξημένη απόπτωση της τροφοβλάστης μπορεί να πυροδοτείται έμμεσα από την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών που παράγονται από τον TLR-4 που εκφράζεται στα ανοσιακά ή τροφοβλαστικά κύτταρα (Abrahams *et al.*, 2005a).

Γνωστές γενετικές διαφορές στους TLRs και/ή στους μεσολαβητές που ακολουθούν στο μονοπάτι μετά από αυτούς ίσως εξηγούν τη διαφορετικότητα ανάμεσα στις αποκρίσεις γυναικών στη μόλυνση και μπορεί να συμβάλλουν σε δυσμενείς εκβάσεις της εγκυμοσύνης (αποβολή, πρόωρος τοκετός, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και προεκλαμψία) (Gonzalez *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2014).

Οι van Rijn *et al.* πρώτοι το 2008 έδειξαν ότι η προδιάθεση της μητέρας για προεκλαμψία συνδέεται με παραλλαγές αλληλομόρφων γονιδίων που επηρεάζουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Οι ερευνητές συσχέτισαν τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-4*, Asp299Gly και Thr399Ile που επηρεάζουν στο εξωκυττάριο πρότυπο αναγνώρισης του TLR-4 και κατ' επέκταση τη φλεγμονώδη απόκριση στους λιποσακχαρίτες, με ιστορικό πρώιμης προεκλαμψίας και υπέθεσαν ότι γενετικά κωδικοποιούμενες ατομικές διαφορές στη φλεγμονώδη απόκριση μπορεί να επιδράσουν στην προδιάθεση στη διαταραχή (van Rijn *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά οι Molvarec *et al.*

υπέθεσαν ότι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί μπορεί να σχετίζονται με μειωμένο ρίσκο για προεκλαμψία όντας αλληλόμορφα του *TLR-4* με απώλεια λειτουργίας, την οποία δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν σε δείγμα πληθυσμού Καυκάσιων από την Ουγγαρία (*Molvarec et al., 2008*). Για τον πολυμορφισμό Arg753Gln του *TLR-2*, οι Fraser et al. δεν βρήκαν συσχέτιση με την παθογένεση της προεκλαμψίας οπότε δεν τον θεώρησαν σημαντικό δείκτη ανίχνευσης της νόσου (*Fraser et al., 2008*). Οι Xie et al. βρήκαν αυξημένη έκφραση των *TLR-2* και *TLR-4* στα ουδετερόφιλα (*Xie et al., 2010a*) και επιβεβαίωσαν την παρουσία των πολυμορφισμών Arg753Gln (*TLR-2*) και Asp299Gly και Thr399Ile (*TLR-4*) σε γυναίκες με πρώιμη αλλά όχι όψιμη προεκλαμψία (*Xie et al., 2010b*).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του *TLR-4* και Arg753Gln του *TLR-2* έχουν συσχετιστεί και με τον πρόωρο τοκετό (*Koga et al., 2014; Krediet et al., 2007*), στον οποίο, όπως και στην προεκλαμψία, επίσης εμπλέκονται τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου και δημιουργίας φλεγμονής που ενεργοποιούν οι *TLRs* (*Abrahams et al., 2004; Kakinuma et al., 1997*).

A7. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η καταγραφή πολυμορφισμών των υποδοχέων TLR-2 και TLR-4 αναγνωρισμένης κλινικής αξίας (Arg753Gln, Arg677Trp και Asp299Gly, Thr399Ile αντίστοιχα) σε ομάδα γυναικών από την Κεντρική Ελλάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 20 γυναίκες που εμφάνισαν συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg και ποσότητα πρωτεΐνης > 300 mg σε ούρα εικοσιτετραώρου πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και 20 γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη ως ομάδα ελέγχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B1.1. Χημικά Αντιδραστήρια

- Πρωτεΐνάση K, QIAGEN
- Διάλυμα λύσης AL, QIAGEN
- Αιθανόλη 100%
- Διάλυμα έκπλυσης AW1, QIAGEN
- Διάλυμα έκπλυσης AW2, QIAGEN
- Διάλυμα έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA AE, QIAGEN
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (100mM Tris-βορικό, 2mM Na₂EDTA), gibco®
- Αγαρόζη UltraPure™ Agarose, Invitrogen
- DNA ladder 50bp (DNA "μάρτυρας"), New England Biolabs
- HotStartTaq® Master Mix (Taq Πολυμεράση), QIAGEN
- Εκκινητές για τα γονίδια TLR2 & TLR4 (Forward & Reverse), Invitrogen
- RNAase free H₂O, QIAGEN

B1.2. Χρωστικές Ουσίες

- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/mL, Invitrogen
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/15% Ficoll Type 400 σε ddH₂O), QIAGEN & New England Biolabs

B1.3. Όργανα - Συσκευές

- Συσκευή Vortex, VELP SCIENTIFICA
- Υδατόλουτρο, BLOLine
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5415 R
- Ηλεκτρονικός ζυγός, DHAUS
- Αποστακτήρας νερού, Heal Force ®
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Thermo EC
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με ενσωματωμένη κάμερα, OVItec

- Θερμικός κυκλοποιητής PCR, PCT 200 MJ RESEARCH
- Μικροπιπέτες διαφορετικών όγκων (τύπου Gilson)

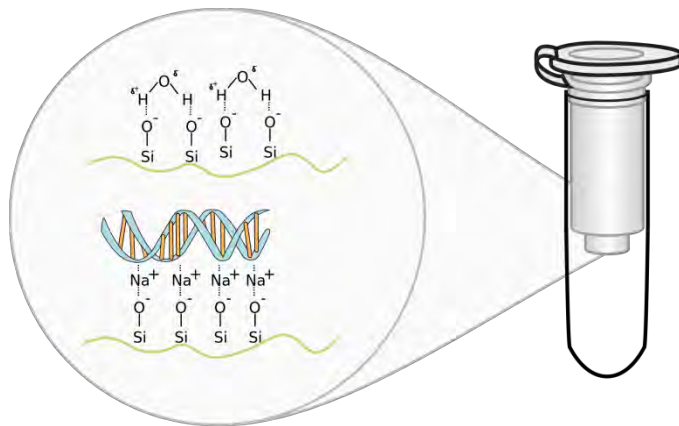
B1.4. Αναλώσιμα

- Σωληνάρια erpendorf των 1,5mL & 0,2 mL
- QIAamp Mini spin columns & σωληνάρια συλλογής των 2mL
- Ρύγχη για πιπέτες τύπου Gilson
- Σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό EDTA

B2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B2.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα με το QIAamp Mini Kit (QIAGEN)

Η μέθοδος βασίζεται στη χρησιμοποίηση στηλών που φέρουν φίλτρα/μεμβράνες από πηκτική σιλικόνης (silica membrane gel), η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή σε πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την DNA πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR. Αρχικά, γίνεται κατακρήμνιση του DNA σε υδατικό διάλυμα με την προσθήκη αιθανόλης υπό την παρουσία αλάτων (*Birnboim et al., 1979*) δημιουργώντας ένα διάλυμα δέσμευσης (binding solution), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται σε στήλη (spin column) και φυγοκεντρείται. Με την φυγοκέντρηση το διάλυμα δέσμευσης περνά μέσα από τη στήλη όπου εάν το pH και η συγκέντρωση αλάτων είναι βέλτιστες, τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται στη μεμβράνη σιλικόνης. Με διαδοχικές εκπλύσεις απομακρύνονται όλες οι πιθανές προσμίξεις, προκειμένου στη στήλη να μείνει μόνο το DNA, το οποίο με την προσθήκη ενός διαλύματος έκλουσης και φυγοκέντρηση, θα αποδεσμευτεί από τη μεμβράνη και θα συλλεχθεί στο σωληνάριο (*Matson, 2008; Kumar, 2006*).

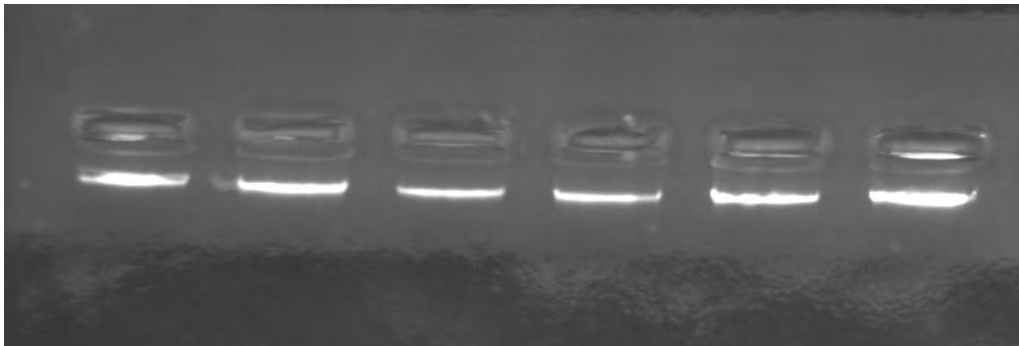


Εικόνα 7. Στη μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού και μόρια DNA παρουσία διαλύματος υψηλής αλατότητας (Wikimedia Commons).

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Μετάγγιση 200 μL αίματος από σωληνάριο αιμοληψίας σε Eppendorf.
- Προσθήκη 20 μL πρωτεΐνάσης K.
- Προσθήκη 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης AL.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 15 min.
- Προσθήκη 200 μL αιθανόλης 100%.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 70°C για 15 min.
- Μετάγγιση του διαλύματος σε στήλη (QIAamp Mini spin column) μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2 mL.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min.
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2mL.
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος έκπλυσης AW1.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min.
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2mL.
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος έκπλυσης AW2.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 3 min.
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 mL.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 1 min .

- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 mL.
- Προσθήκη 60 - 70 μ L διαλύματος έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA ΑΕ.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 3 min.
- Μετάγγιση του DNA από το σωληνάριο συλλογής των 2 mL σε καθαρό eppendorf 1,5 mL το οποίο φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από απόμωωση DNA.

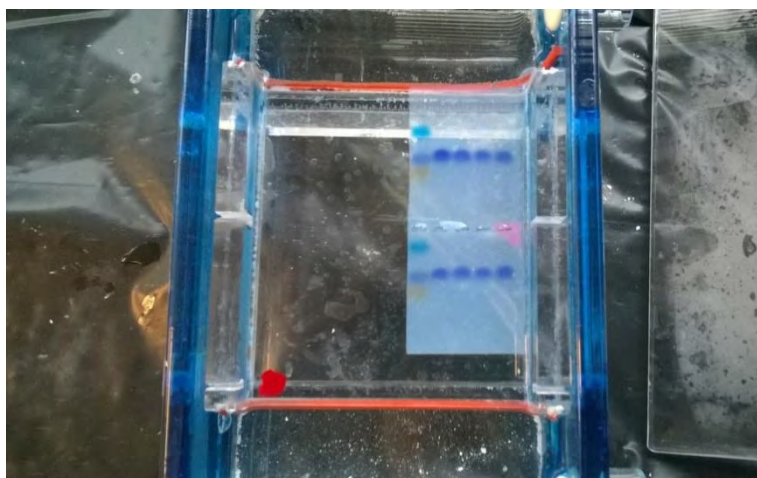
B2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA με βάση το μέγεθός τους. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικές οπές (wells) στο πήκτωμα αγαρόζης και υπό την επίδραση σταθερού ηλεκτρικού πεδίου κινούνται διαμέσου του πηκτώματος προς το θετικό ηλεκτρόδιο, καθώς το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Τα μεγαλύτερα τμήματα μεταναστεύουν βραδύτερα και το αντίστροφο και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός (*Alberts et al., 2004*).

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

Αρχικά για την παρασκευή 1,5% πηκτώματος αγαρόζης:

- Σε κωνική φιάλη προστίθονται 1,5 g αγαρόζης και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE.
- Γίνεται ανακίνηση και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5 min, μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει).
- Προστίθεται έπειτα βρωμιούχο αιθίδιο 5 μL από διάλυμα με συγκέντρωση 10mg/mL ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και βοηθά στον άμεσο προσδιορισμό της θέσης του DNA στο πήκτωμα με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος φθάσει στους 60°C, το διάλυμα μεταφέρεται στη συσκευή αγαρόζης, αφού προηγουμένως έχει τοποθετηθεί κάθετα στην κατάλληλη θέση και σε απόσταση 0.5 mm από την επιφάνεια της πλάκας η "χτένα" που θα δημιουργήσει θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη.
- Όταν πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται προσεκτικά η χτένα και το πήκτωμα είναι έτοιμο προς ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 9. Συσκευή ηλεκτροφόρησης με πήκτωμα αγαρόζης.

Στη συνέχεια για την ηλεκτροφόρηση του DNA:

- Το πήκτωμα αγαρόζης βυθίζεται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πηκτώματος (1xTBE).
- Γίνεται ανάμιξη 5 μL κάθε δείγματος με 3 μL από το διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και φόρτωμα των δειγμάτων στις θέσεις του πηκτώματος. Αν το δείγμα είναι προϊόν PCR, φορτώνεται και μία θέση με 4 μL DNA μάρτυρα (φέρει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους) και 3 μL από το διάλυμα χρωστικής, προκειμένου να γίνει έμμεσος προσδιορισμός του μεγέθους του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (15 min συνήθως) , με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός γίνεται παρατήρηση της θέσης των τμημάτων DNA στο πήκτωμα και ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος σε ειδική συσκευή με ενσωματωμένη κάμερα.

B2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR (*Mullis et al., 1987*) βασίζεται στον *in vitro* ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές – ολιγονουκλεοτίδια (primers). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι Taq πολυμεράση, μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: αποδιάταξη του εκμαγείου - DNA (denaturation), σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing), επιμήκυνση των συνδεδεμένων

εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'- 3' (extension). Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από η κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2ⁿ δίκλιωνα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που οριοθετείται από τους εκκινητές (Σάτρα, 2015).

Για τη σύνθεση με PCR των περιοχών που περιλαμβάνουν τους υπό διερεύνηση πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών

5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3' και 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3' για τη σύνθεση κωδικής περιοχής μήκους 340bp του γονιδίου *TLR-2*

και το ζεύγος

5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' και

5'- TGAAACTCACTCATTTGTTTCAA-3'

για τη σύνθεση περιοχής μήκους 438bp του εξονίου 3 του γονιδίου *TLR-4*.

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν είναι:

B2.3.1. Πρωτόκολλο PCR για *TLR-2* με HOTSTART

Σε κάθε erpendorf 0.2 mL προσθέτουμε 6μL DNA, 24μL MIX με τελικό όγκο 30μL.

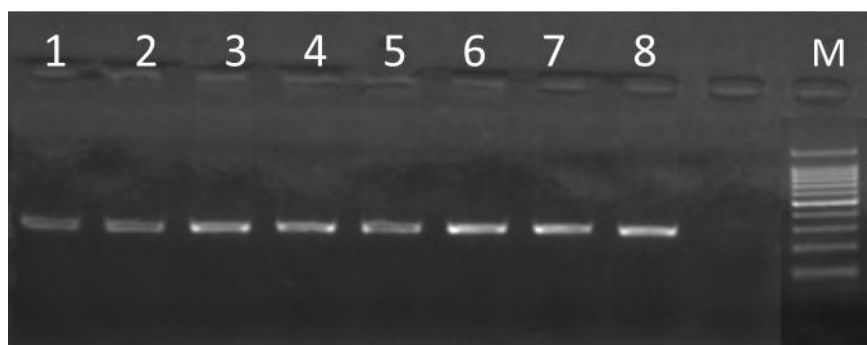
Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μL		
F primer	1μL		
R primer	1μL		
H2O	7μL		

Το πρόγραμμα της PCR (*TLR-2*) είναι το ακόλουθο:

- 95°C 10min
- **35 cycles of:** 95°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec
- 72°C 5min
- 18°C overnight

Το τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μήκος 340bp.



Εικόνα 10. Προϊόν PCR για το γονίδιο *TLR-2* μήκους 340bp.

B2.3.2. Πρωτόκολλο PCR για *TLR-4* με HOTSTART

Σε κάθε erpendorf 0.2 mL προσθέτουμε 7μL DNA, 23μL MIX με τελικό όγκο 30μL.

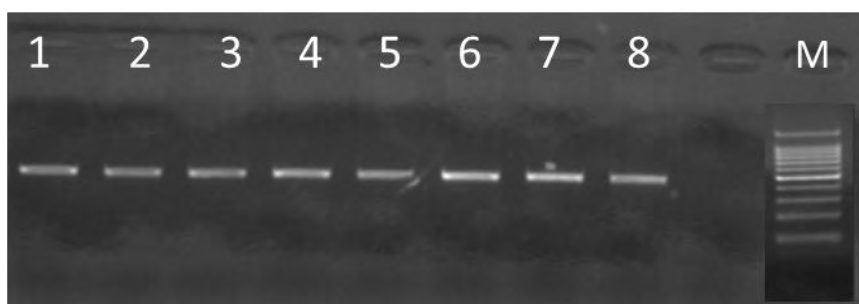
Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μL		
F primer	2μL		
R primer	2μL		
H2O	4μL		

Το πρόγραμμα του PCR (*TLR-4*) έχει ως εξής:

- 95°C 10min
- **35 cycles of:** 95°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec
- 72°C 5min
- 18°C overnight

Πολλαπλασιάζεται τμήμα μήκους 440bp.



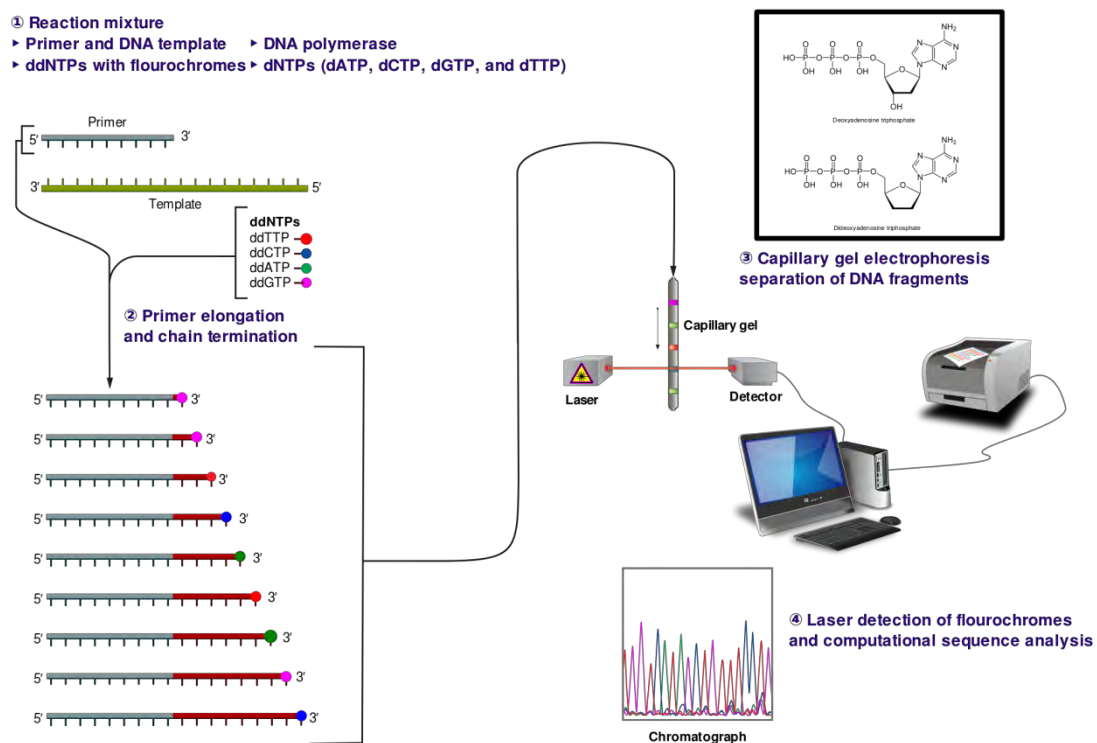
Εικόνα 11. Προϊόν PCR του γονιδίου *TLR-4* μήκους 440bp.

B2.4. Αλληλούχιση DNA κατά Sanger

Τα προϊόντα της PCR στέλνονται για αλληλούχιση (sequencing) σε εξωτερικό εργαστήριο (CeMIA SA), όπου ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA γίνεται με τη μέθοδο Sanger (*Sanger et al., 1975;1977*) προκειμένου να ανιχνευθούν πολυμορφισμοί στα κλινικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας γίνεται σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης DNA ABI Prism 3700 Automated Sequencer (PE Biosystems) και προκύπτει απευθείας η παρουσία ή απουσία νουκλεοτιδικών μεταβολών στις αναμενόμενες θέσεις από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης. Η μέθοδος βασίζεται στη χρησιμοποίηση τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων, δηλαδή παραγώγων των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων χωρίς την 3'-υδροξυλομάδα. Το DNA αποδιατάσσεται και κάθε μονόκλωνη αλυσίδα λειτουργεί ως εκμαγείο και υποβάλλεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις πολυμερισμού. Σε κάθε αντίδραση υπάρχουν ένα εκ των τεσσάρων τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων σε χαμηλή συγκέντρωση, καθώς

επίσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις των φυσιολογικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων. Σε κάθε αντίδραση το εκάστοτε διδεοξυριβονουκλεοσίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε θέση του αντίστοιχου δεοξυριβονουκλεοσιδίου. Αυτή η προσθήκη του διδεοξυριβονουκλεοσιδίου οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού καθώς η απουσία της 3'-υδροξυλομάδας εμποδίζει την προσθήκη επόμενου νουκλεοτιδίου. Το μίγμα της αντίδρασης τελικά θα παράγει μια ομάδα μορίων DNA με διαφορετικό μήκος, τα οποία θα είναι συμπληρωματικά με το DNA – εκμαγείο που αναλύεται και θα τερματίζουν σε ένα από τα τέσσερα διδεοξυριβονουκλεοσίδια (Alberts et al., 2004; Lodish et al. 2001). Τα νεοσυντιθέμενα τμήματα διαχωρίζονται μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και ανιχνεύονται με τη χρήση φθοριοχρωμάτων με τα οποία είναι σημασμένα τα διδεοξυριβονουκλεοσίδια μέσω laser σε αυτόματο αναλυτή (Smith, et al., 1986).

Η ανάλυση των χρωματογραφήματων από την αλληλούχηση του DNA και ο προσδιορισμός της ύπαρξης ή μη των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chromas (Technelysium).



Εικόνα 12. Αλληλούχηση DNA με τη μέθοδο Sanger (Wikimedia Commons).

B2.5. Μέθοδοι για Στατιστική Ανάλυση και Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για τις συχνότητες των διαφορετικών αλληλομόρφων στο δείγμα πληθυσμού που εξετάζεται. Χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, για να γίνει σύγκριση μεταξύ των γονοτυπικών συχνοτήτων ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα των ατόμων με προεκλαμψία που συμμετείχαν στη μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από 40 συνολικά γυναίκες (20 με προεκλαμψία και 20 στην ομάδα ελέγχου) συλλέχθηκε περιφερικό αίμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA. Στη συνέχεια τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων *TLR-2* και *TLR-4* στα οποία υπάγονται οι προς μελέτη πολυμορφισμοί ενισχύθηκαν με PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης στάλθηκαν προς αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Chromas και οι γονότυποι τόσο της ομάδας ελέγχου όσο και των ασθενών για τα γονίδια *TLR-2* και *TLR-4* παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες:

A/A	ID	Genotype TLR2_a (C/T)	Genotype TLR2_b (G/A)
CONTROL GROUP		TTCATAAG C/T	CAAGCTGC G/A
1	1	CC	GG
2	2	CC	GG
3	7	CC	GG
4	10	CC	GG
5	11	CC	GG
6	33	CC	GG
7	35	CC	GG
8	39	CC	GG
9	40	CC	GG
10	41a	CC	GG
11	42	CC	GG
12	43	CC	GG
13	44	CC	GG
14	46	CC	GG
15	47	CC	GG
16	48	CC	GG
17	49	CC	GG
18	52	CC	GG
19	54	CC	GG
20	55	CC	GG

Πίνακας 1. Γονότυποι της ομάδας ελέγχου ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-2*.

Σημειώνεται ότι το ID είναι ο κωδικός αριθμός κάθε δείγματος στο εργαστήριο και ως TLR2_a χαρακτηρίζεται ο πολυμορφισμός C2029T (Arg677Trp) ενώ η ονομασία TLR2_b αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό G2258A (Arg753Gln). Οι γονότυποι χωρίς τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται ως CC και GG αντίστοιχα.

A/A	ID	Genotype TLR2_a (C/T)	Genotype TLR2_b (G/A)
PREECLAMPSIA GROUP		TTCATAAG C/T	CAAGCTGC G/A
1	13	CC	GG
2	14	CC	GG
3	15	CC	GG
4	16	CC	GG
5	17	CC	GG
6	18	CC	GG
7	19	CC	GG
8	20	CC	GG
9	21	CC	GG
10	22	CC	GG
11	23	CC	GG
12	24	CC	GG
13	25	CC	GG
14	26	CC	GG
15	27	CC	GG
16	37	CC	GG
17	38	CC	GG
18	45	CC	GG
19	50	CC	GG
20	56	CC	GG

Πίνακας 2. Γονότυποι της ομάδας ασθενών με προεκλαμψία ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-2*.

Τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση του DNA δείχνουν ότι για το γονίδιο του *TLR-2* δεν ανιχνεύτηκε κανένας από τους δύο πολυμορφισμούς ούτε στην ομάδα ελέγχου ούτε στις γυναίκες με προεκλαμψία.

Ο γονότυπος TLR4_a αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό A896G (Asp299Gly) και ο γονότυπος TLR4_b αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό C1196T (Thr399Ile). Οι γονότυποι χωρίς τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται ως AA και CC αντίστοιχα.

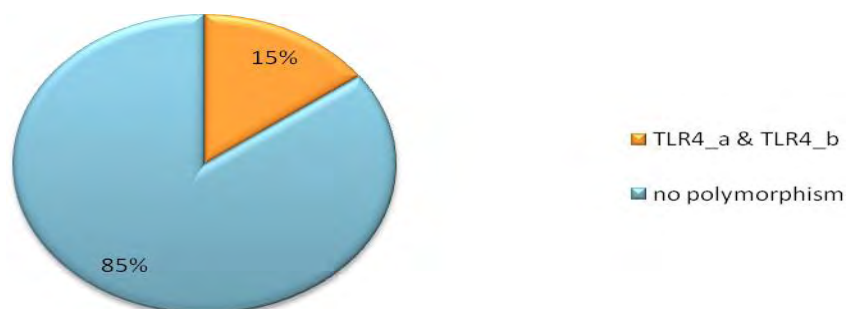
A/A	ID	Genotype TLR4_a (A/G)	Genotype TLR4_b (C/T)
CONTROL GROUP		CCTCGATG A/G TATTATT	GGGACAA C/T CAGCCT
1	1	AA	CC
2	2	AA	CC
3	7	AA	CC
4	10	AA	CC
5	11	AA	CC
6	33	AA	CC
7	35	AA	CC
8	39	AA	CC
9	40	AA	CC
10	41a	AA	CC
11	42	AA	CC
12	43	AA	CC
13	44	AA	CC
14	46	AA	CC
15	47	AA	CC
16	48	AA	CC
17	49	AA	CC
18	52	AA	CC
19	54	AA	CC
20	55	AA	CC

Πίνακας 3. Γονότυποι της ομάδας ελέγχου ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-4*.

A/A	ID	Genotype TLR4_a (A/G)	Genotype TLR4_b (C/T)
PREECLAMPSIA GROUP		CCTCGATG A/G TATTATT	GGGACAA C/T CAGCCT
1	13	AA	CC
2	14	AA	CC
3	15	AA	CC
4	16	AA	CC
5	17	GA	TC
6	18	AA	CC
7	19	AA	CC
8	20	GA	TC
9	21	AA	CC
10	22	AA	TC
11	23	AA	CC
12	24	AA	CC
13	25	AA	CC
14	26	AA	CC
15	27	AA	CC
16	37	GA	TC
17	38	AA	CC
18	45	AA	CC
19	50	AA	CC
20	56	AA	CC

Πίνακας 4. Γονότυποι της ομάδας ασθενών με προεκλαμψία ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-4*.

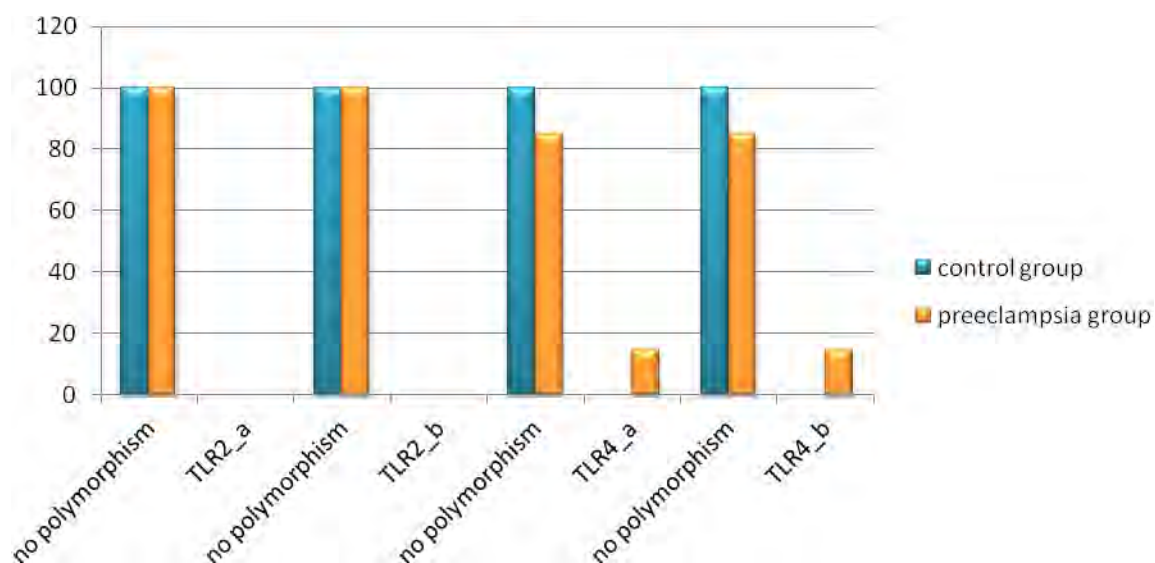
Και οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR-4* εντοπίστηκαν μαζί στο γονίδιο τριών ασθενών από την ομάδα της προεκλαμψίας, αλλά σε καμία γυναίκα από την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 1. Στην ομάδα των προεκλαμπτικών γυναικών και οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR-4* ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 15%.

Έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το Fisher's exact test για τη συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης προεκλαμψίας πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και των πολυμορφισμών του γονιδίου *TLR-4*, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν μόνο στην ομάδα με προεκλαμψία σε ποσοστό 15%.

Το Fisher's exact test δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης προεκλαμψίας και των πολυμορφισμών του *TLR-4* ($p=0.163$). Με άλλα λόγια, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το ότι οι πολυμορφισμοί διαφέρουν μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με προεκλαμψία. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μία τάση και οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR-4* να εμφανίζονται μαζί στο γονίδιο ορισμένων προεκλαμπτικών γυναικών, αφού το 15% των γυναικών με πρώιμη προεκλαμψία βρέθηκε να είναι φορείς των πολυμορφισμών του *TLR4*,



Διάγραμμα 2. Συνολική διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών των γυναικών με ή χωρίς τους πολυμορφισμούς των *TLR-2* και *TLR-4* στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα με προεκλαμψία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *TLR-2* και της εμφάνισης πρώιμης προεκλαμψίας σε γυναίκες από την Κεντρική Ελλάδα, καθώς οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί (*Arg753Gln* και *Arg677Trp*) δεν εντοπίστηκαν ούτε στην ομάδα των ασθενών αλλά ούτε στην ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά στο γονίδιο *TLR-4*, διαφαίνεται μία τάση συσχέτισης των δύο πολυμορφισμών (*Asp299Gly* και *Thr399Ile*) με την εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας.

Οι TLRs θεωρούνται η πιο σημαντική τάξη υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων, που συμμετέχουν στη άμυνα του ξενιστή ενάντια σε ένα εύρος παθογόνων επάγοντας και ρυθμίζοντας το σύστημα φυσικής ανοσίας (*Beutler et al., 2006*) και πλέον η άποψη ότι το σύστημα ανοσίας της μητέρας κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη σοβαρών υπερτασικών διαταραχών της κύησης, έχει πολλούς υποστηρικτές (*van Rijn et al., 2008*). Η φλεγμονή αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας. Δεδομένου ότι οι πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορεί να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι ίσως συμβάλλουν στην επιρρέπεια στην προεκλαμψία (*Franchim et al., 2011*).

Είναι γεγονός ότι τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για το αν τελικά οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *TLR-2* και *TLR-4* συνδέονται με την εμφάνιση προεκλαμψίας είναι αντικρουόμενα.

Από τη μία πλευρά οι *van Rijn et al.* το 2008 μελέτησαν και συσχέτισαν τους δύο συνκληρονομούμενους πολυμορφισμούς του *TLR-4* με την εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και οι *Xie et al.* το 2010, που υποστήριξαν ότι οι συγκεκριμένες παραλλαγές των αλληλομόρφων του *TLR-4* αλλά και ο πολυμορφισμός *Arg753Gln* του *TLR-2*, συμβάλλουν σε ένα χαμηλότερο κατώφλι για την ανάπτυξη πρώιμης προεκλαμψίας αλλά όχι όψιμης.

Οι ερευνητές πρότειναν ένα πιθανό ρόλο της απόκρισης σε λιποσακχαρίτες στην επιρρέπεια για προεκλαμψία. Οι λιποσακχαρίτες μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδη απόκριση και διαταραχές στα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών όπως υπέρταση, πρωτεϊνουρία και ενδοθηλίωση των

σπειραματικών σωληναρίων, μία κατάσταση που προσομοιάζει στο κλινικό σύνδρομο της προεκλαμψίας. Σε συνδυασμό με δεδομένα που δείχνουν αυξημένους διαλυτούς και κυτταρικούς δείκτες του συστήματος φυσικής ανοσίας σε γυναίκες με πρώιμη προεκλαμψία, δημιουργείται το εύλογο ερώτημα αν γενετικά κωδικοποιούμενες διαφορές μεταξύ των ατόμων σε σχέση με τη φλεγμονώδη απόκριση στους λιποσακχαρίτες θα μπορούσε να επηρεάσει τη μητρική προδιάθεση στην ανάπτυξη προεκλαμψίας. Επιπλέον, η καταστροφή ιστού (είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς παράγοντες) περιλαμβάνει την απελευθέρωση σηματοδοτικών μορίων που είναι ικανά να προκαλούν μια άμεση αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην προεκλαμψία, τα αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία κυτταρικών και υποκυτταρικών υπολειμμάτων του πλακούντα όπως τμήματα από τη μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης, ελεύθερο εμβρυικό DNA και ο sFlt-1, προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο και προηγούνται της έναρξης του κλινικού συνδρόμου. Είναι πιθανό οι παράγοντες αυτοί να λειτουργούν σα συνδέτες για τους TLRs (*van Rijn et al., 2008; Xie et al., 2010b*).

Από την άλλη πλευρά, οι Franchim et al. το 2011 μελέτησαν τους πολυμορφισμούς Arg753Gln (*TLR-2*) και Asp299Gly (*TLR-4*) μαζί με πολυμορφισμούς γονιδίων διαφόρων ιντερλευκινών αλλά δε βρήκαν κάποια συσχέτιση με την ανάπτυξη προεκλαμψίας. Συσχέτιση επίσης δε βρέθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου *TLR-4* και προεκλαμψίας στη μελέτη των Molvarec et al. το 2008 και στο ίδιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και οι Fraser et al. (2008) για τον έναν πολυμορφισμό του γονιδίου *TLR-2* (Arg753Gln). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτές τις μελέτες δεν πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την πρώιμη ή όψιμη εμφάνιση προεκλαμψίας (*Franchim et al., 2011; Molvarec et al., 2008; Fraser, 2008*).

Οι γενετικές μελέτες είναι πολύπλοκες, ειδικά όταν πολυσυστηματικές ασθένειες, όπως η προεκλαμψία, βρίσκονται υπό ανάλυση. Ωστόσο μπορεί να αποκαλύψουν πληροφορίες που θα μπορούσαν πιθανώς να οδηγήσουν στην ανάπτυξη χρήσιμων προγνωστικών δοκιμασιών στο μέλλον. Ακόμη και τα αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να συμβάλλουν στην κατανόηση της παθογένεσης των ασθενειών. Η συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών ενός

νουκλεοτιδίου και πολύπλοκων ασθενειών θα πρέπει να αναλύεται με προσοχή. Τα θετικά ευρήματα δε σημαίνουν απαραίτητα ότι η μεταβλητή που μελετάται κατέχει κάποια λειτουργική επίδραση. Ομοίως, τα αρνητικά αποτελέσματα δε θα πρέπει να ερμηνεύονται ως έλλειψη φυσιολογικού ρόλου για το μελετώμενο παράγοντα, αλλά σαν πιθανή έλλειψη στατιστικής συσχέτισης. Εκτός από την αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων, συμπεριφορικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι πιθανό να επηρεάζουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην προεκλαμψία, οδηγώντας σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η πιθανή συμβολή του εμβρυικού γονοτύπου στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (*Franchim et al., 2011*).

Η έγκαιρη ταυτοποίηση γυναικών με ρίσκο ανάπτυξης προεκλαμψίας θα μπορούσε να διευκολύνει την άμεση παρέμβαση, τη στοχευμένη θεραπεία και την αυστηρή παρακολούθηση. Καθώς η αποτυχία της διείσδυσης της τροφοβλάστης προκύπτει στο μέσο του δεύτερου τριμήνου, φαίνεται ότι οποιοδήποτε επιτυχές προληπτικό μέτρο πρέπει να εφαρμοσθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα. Έτσι, η πρόγνωση στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είναι υποχρεωτική για να διευκολύνει επαρκείς προφυλακτικές παρεμβάσεις στο μέλλον. Στην περίπτωση της προεκλαμψίας, ένας ιδανικός βιοδείκτης θα έπρεπε ήδη να επιτρέπει μια ακριβή πρόβλεψη κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, όταν η πλακουντιοποίηση βρίσκεται σε εξέλιξη και το σύστημα έχει την πλαστικότητα που απαιτείται για αναδιαμόρφωση ή τουλάχιστον επιτρέπει τη χρήση πιθανών φαρμακευτικών αγωγών όπως η ασπιρίνη (*De Muro et al., 2016*).

Λόγω της πολύπλοκης αιτιολογίας της νόσου και της μη επάρκειας των μέχρι τώρα δεικτών, η εφαρμογή του δυναμικού των γενετικών δεικτών κερδίζει έδαφος, καθώς η χρήση τους θα επέτρεπε την πολύ έγκαιρη κλινικά παρέμβαση. Η γενετική ανίχνευση θα μπορούσε να ταυτοποιήσει γυναίκες υψηλού κινδύνου ακόμη και πριν την κύηση, επιτρέποντας πιθανώς καινοτόμες παρεμβάσεις όπως η ανοσορυθμιστική θεραπεία στο πρώτο τρίμηνο. Επιπλέον, η ταυτοποίηση τέτοιων γενετικών δεικτών θα μπορούσε ίσως να αποβεί χρήσιμη στην κατηγοριοποίηση της ασθένειας και την

εφαρμογή πιο αποτελεσματικών στοχευμένων θεραπευτικών στρατηγικών (Fraser et al., 2008).

Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν στο μέλλον μεγάλες πολυκεντρικές προοπτικές μελέτες με πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων και μεγάλο αριθμό περιστατικών, χρησιμοποιώντας τελευταίες τεχνολογίες, όπως συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό συστοιχιών (array CGH) και μαζική παράλληλη αλληλούχιση, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι γενετικές αλλαγές που υπάρχουν σε ολόκληρο το γονιδίωμα γυναικών με προεκλαμψία. Οι μικροσυστοιχίες με υψηλό αριθμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών φαίνονται επίσης πολλά υποσχόμενες. Η χρήση των νουκλεϊκών οξέων βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες που θα εφαρμόζουν μετρήσεις DNA, RNA, και miRNA. Είναι πιθανό ότι η μαζική παράλληλη αλληλούχιση μπορεί να συμβάλει σε καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας (Haram et al., 2014; Jadli et al., 2015).

Καταλήγοντας, ενώ τα αποτελέσματά μας είναι ενθαρρυντικά, λόγω της διαφαινόμενης τάσης συσχέτισης των πολυμορφισμών του *TLR-4* με την πρώιμη προεκλαμψία, τονίζεται ότι για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει να εξετασθεί μεγαλύτερος αριθμός τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrahams et al. (2004). Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol.* 173(7), σσ. 4286-4296.
- Abrahams et al. (2005a). Toll-like Receptors and their Role in the Trophoblast. *Placenta* (26), σσ. 540-547.
- Abrahams et al. (2005b). Role for TLRs in the Regulation of Immune Cell Migration by First Trimester Trophoblast Cells. *The Journal of Immunology* 175, σσ. 8096-8104.
- Akira et al. (2003). Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 187(Suppl 2), σσ. 356–363.
- Amirchaghmaghi et al. (2013). The Role of Toll Like Receptors in Pregnancy. *Int J Fertil Steril.* 7(3), σσ. 147-154.
- Anderson et al. (2011). Fetal hemoglobin and α1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for pre-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, σσ. 521-525.
- Anderson et al. (2015a). The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin is overwhelmed during pre-eclampsia-New biomarkers and potential targets for therapy. *Pregnancy Hypertens.* 5.
- Anderson et al. (2015b). Free fetal hemoglobin and hemoglobin-scavenging proteins are predictive first and second trimester biochemical markers for pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 5.
- Anim-Nyame et al. (2000). Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Human Reproduction, vol. 15, no. 9,* σσ. 2033–2036.
- Arbour et al. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. . *Nat Genet* (25), σσ. 187–191.

- Autiero et al. (2003). Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no. 7, σσ. 1356–1370.
- Barden et al. (2001). Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension* 38, σσ. 803–808.
- Beutler et al. (2006). Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24, σσ. 353–389.
- Birnboim et al. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6), σσ. 1513-1523.
- Bochud et al. (2003). Cutting edge: a toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol.* (170), σσ. 3451-3454.
- Borzychowski et al. (2006). Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonat M.* 11, σσ. 309-316.
- Bowie et al. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 67(4), σσ. 508-514.
- Brosens et al. (1967). The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J. Pathol. Bacteriol.* 93, σσ. 569–579.
- Burton et al. (2009). Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 30 (Suppl. A), σσ. 43–48.
- Burton et al. (2010). The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol* 54(2-3), σσ. 303–312.

- Burton et al. (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, σσ. 287–299.
- Čabarkapa et al. (2015). CYSTATIN C - MORE THAN THE MARKER OF THE GLOMERULAR FILTRATION RATE. *Med Pregl.* 68, σσ. 173-179.
- Cantwell et al. (2011). Saving Mothers' Lives : Reviewing maternal deaths to make motherhood safer : 2006-2008. The Eighth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. *BJOG*, 118 Suppl 1, σσ. 1-203.
- Centlow et al. (2008). Placental expression profiling in pre-eclampsia: Local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertil. Steril.* 90, σσ. 1834–1843.
- Cetin et al. (2011). Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta* 32 (Suppl. 1), σσ. 4-16.
- Chaiworapongsa et al. (2014). Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, σσ. 466–480.
- Chatterjee et al. (2012). Activation Contributes to Preeclampsia in Humans and Mice. *PLoS ONE* 7(7).
- Cindrova-Davies et al. (2007a). Nuclear factor- κ B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am. J. Pathol.* 170, σσ. 1511–1520.
- Cindrova-Davies et al. (2007b). Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol.* 171, σσ. 1168-1179.
- Cui et al. (2012). Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* 484, σσ. 246–250.

- Dabagh-Gorjan et al. (2014). Differences in the Expression of TLRs and Inflammatory Cytokines in Pre-Eclamptic Compared with Healthy Pregnant Women. *Iran J Immunol* 11(4), σσ. 233-245.
- von Dadelszen et al. (2002). Activated protein C in normal human pregnancy and pregnancies complicated by severe preeclampsia: a therapeutic opportunity? *Crit Care Med* 30, σσ. 1883–1892.
- von Dadelszen et al. (2003). Subclassification of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*. 22(2), σσ. 143-148.
- Dechend et al. (2009). Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Elsevier*, σσ. 287–296.
- Dekker et al. (2011). The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J. Reprod. Immunol.* 89, σσ. 126–132.
- Dembic. (2013). The Function of Toll-Like Receptors. Στο *Madame Curie Bioscience Database* .
- Dhillon et al. (2012). IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol.* 303, σσ. 53-58.
- Dobša et al. (2013). Copeptin and its potential role in diagnosis and prognosis of various diseases. *Biochemia Medica* 23(2), σσ. 172-192.
- Dvorak. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 21, σσ. 4368–4380.
- Engels et al. (2013). Automated measurement of sFlt1, PlGF and sFlt1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. *Hypertens Pregnancy* 32, σσ. 459-473.
- Enquobahrie et al. (2011). Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 204, σσ. 12-21.

- Ferrara et al. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, σσ. 439–442.
- Foda et al. (2012). Maternal and neonatal copeptin levels at cesarean section and vaginal delivery. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 165, σσ. 215-218.
- Franchim et al. (2011). Inflammatory Mediators Gene Polymorphisms in Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 30, σσ. 338–346.
- Franzas et al. (1958). Hydatidiform mole and pre-eclampsia. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae*, vol. 47, no. 81, σσ. 11-16.
- Fraser et al. (2008). Interleukin-4 2590 (C>T), toll-like receptor-2 +2258 (G>A) and matrix metalloproteinase-9 -1562 (C>T) polymorphisms in pre-eclampsia. *BJOG*, σσ. 1052–1056.
- Gant et al. (1974). The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 43.
- Genbacev et al. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, vol. 277, no. 5332, σσ. 1669–1672.
- Gerretsen et al. (1981). Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *BJOG* 88, σσ. 876–881.
- Gilad et al. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 3.
- Gonen et al. (2008). Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: A prospective longitudinal study. *BJOG* 115, σσ. 1465–1472.
- Gonzalez et al. (2007). Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? *Am J Obstet Gynecol* 197.
- Grubb et al. (2000). Cystatin C-Properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 35, σσ. 63–99.

- Haram et al. (2014). Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. *Journal of Pregnancy*.
- Harrington et al. (2011). Early screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 37, σσ. 623–624.
- Henson et al. (1998). Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstetrics and Gynecology*, vol. 92, no. 6, σσ. 1020–1028.
- Hertig et al. (1945). Vascular pathology in hypertensive albuminuric toxemias of pregnancy. *Clinics* 4, σσ. 1011–1015.
- Hoshino et al. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR-4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR-4 as the Lps gene product. . *J Immunol* (162), σσ. 3749-3752.
- Hu et al. (2009). Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47, σσ. 923–929.
- Huang et al. (1997). Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 34, σσ. 577–582.
- Huppertz et al. (2008). Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of pre-eclampsia. *Fetal Diagn. Ther.* 24, σσ. 230–236.
- Huppertz. (2008). Placental origins of pre-eclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension* 51, σσ. 970-975.
- Ishihara et al. (2002). Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 186, σσ. 158-166.
- Jadli et al. (2015). Promising prognostic markers of Preeclampsia: New avenues in waiting. *Thrombosis Research* 136, σσ. 189–195.

- Jairajpuri et al. (2016). MicroRNA expression pattern in pre-eclampsia (Review). *Molecular Medicine Reports*.
- Johnson et al. (2009). The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Human Genetics*, vol. 126, no.5, σσ. 655–666.
- Kakinuma et al. (1997). Trophoblastic apoptosis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor. *Obstet Gynecol* 90, σσ. 117-124.
- Kawai et al. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21, σσ. 317–337.
- Kendall et al. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 226, no. 2, σσ. 324–328.
- Khalil et al. (2015). Longitudinal changes in maternal corin and mid-regional proatrial natriuretic peptide in women at risk of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45, σσ. 190–198.
- Khan et al. (2006). WHO analysis of causes of maternal death: A systematic review. *Lancet* 367, σσ. 1066–1074.
- Khong et al. (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93, σσ. 1049–1059.
- Kiechl et al. (2002). Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. (347), σσ. 185–192.
- Kim et al. (2005). Toll-like receptor 4: a potential link between 'danger signals,' the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*, σσ. 921–927.

- Koga et al. (2009). Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J ObstetGynaecol Res.* 35, σσ. 191-202.
- Koga et al. (2010). Toll-Like Receptors at the Maternal–Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *Am J Reprod Immunol.* 63, σσ. 587-600.
- Koga et al. (2014). Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications. *AmJ Reprod Immunol (72)*, σσ. 192–205.
- Kolialexi et al. (2015). Validation of serum biomarkers derived from proteomic analysis for the early screening of preeclampsia. *Dis Markers.* .
- Krediet et al. (2007). Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res.* 62(4), σσ. 474-476.
- Kregel. (2002). Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92, σσ. 2177-2186.
- Kristensen et al. (2007). Increased cystatin C expression in the pre-eclamptic . *Mol. Hum. Reprod.* 13, σσ. 189–195.
- Kumar. (2006). *Genetic Engineering.* New York: Nova Science Publishers.
- Kumazaki et al. (2004). Immunohistochemical Distribution of Toll-Like Receptor 4 in Term and Preterm Human Placentas From Normal and Complicated Pregnancy Including Chorioamnionitis. *HUMAN PATHOLOGY Volume 35.*
- Lambert et al. (2014). Preeclampsia : an update. *Acta Anaesth. Belg.*(65), σσ. 137-149.
- Laresgoiti-Servitje et al. (2013). A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Leukoc. Biol.* 94, σσ. 247–257.

- Lau et al. (2013). Tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, σσ. 412–427.
- Lawrence et al. (1999). The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, σσ. 3149–3153.
- Leaños-Miranda et al. (2013). Circulating Angiogenic Factors and Urinary Prolactin as Predictors of Adverse Outcomes in Women With Preeclampsia. *Hypertension* 61, σσ. 1118-1125.
- Levine et al. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 7, σσ. 672–683.
- Levine et al. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre-eclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, σσ. 992–1005.
- Lian et al. (2011). Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta* 32, σσ. 823–829.
- Lindheimer et al. (2012). The History of Preeclampsia and Eclampsia as Seen by a Nephrologist. Στο *Seminar on History*.
- Lisonkova et al. (2013). Incidence of pre-eclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. . *American journal of obstetrics and gynecology*.
- Liu et al. (2015). Increased serum soluble corin in mid pregnancy is associated with hypertensive disorders of pregnancy. *J Womens Health (Larchmt)*. 24(7), σσ. 572-577.
- Lodish et al. (2001). *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company.

- Lopez-Hernandez et al. (2016). Nested case-control study reveals increased levels of urinary proteins from human kidney toxicity panels in women predicted to develop preeclampsia. *Int Urol Nephrol.* .
- Lorenz et al. (2000). A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* (68), σσ. 6398-6401.
- Lorenz et al. (2002). Relevance of Mutations in the TLR4 Receptor in Patients With Gram-Negative Septic Shock. *Arch Intern Med.* 162(9), σσ. 1028-1032.
- Maharaj et al. (2008). VEGF and TGF- β are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 2, σσ. 491–501.
- Mahmoudi et al. (1999). Eclampsia:A 13-year experience at a United States tertiary care center. *J Womens Health Gender Based Med* 8, σσ. 495-500.
- Manolakis et al. (2013). Readressing the role of Toll-like receptor-4 alleles in inflammatory bowel disease: colitis, smoking, and seroreactivity. *Dig Dis Sci* (58), σσ. 371-380.
- Martin et al. (2014). Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenatal Diagnosis* 34, σσ. 685–691.
- Masoumi et al. (2016). Relationship between Fas and Fas Ligand gene polymorphisms and pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*
- Matson. (2008). *Microarray Methods and Protocols*. Florida: Boca Raton.
- Maynard et al. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. . *J. Clin. Invest.* 111, σσ. 649–658.
- Maynard et al. (2011). Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol* 31(1), σσ. 33–46.

- McCarthy et al. (2011). Animal models of preeclampsia: uses and limitations. *Placenta* 32, σσ. 413–419.
- Medzhitov et al. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* (91), σσ. 295 - 298.
- Mellembakken et al. (2001). Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension* 38, σσ. 394–398.
- Mello et al. (2003). Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension*, vol. 41, no. 4,, σσ. 932–937.
- Van de Merwe et al. (2010). Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease—what does the placenta reveal? *Hypertens. Pregnancy* 29, σσ. 457–467.
- Moffett et al. (2008). The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta* 25, σσ. 1–8.
- Mogensen. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.*22(2), σσ. 240-273.
- Molvarec et al. (2008). Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms and Preeclampsia: Lack of Association in a Caucasian Population. *Hypertens Res* 31, σσ. 859–864.
- Mullis et al. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, σσ. 335-350.
- Muro et al. (2016). Plasma PP13 and urinary GAGs/PGs as early markers of pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* .
- Mutter et al. (2005). Molecular mechanisms of pre-eclampsia. *Microvasc. Res.* 75, σσ. 1-8.
- Muy-Rivera et al. (2005). Leptin, soluble leptin receptor and leptin gene polymorphism in relation to preeclampsia risk. *Physiological Research*, vol. 54, no. 2, σσ. 167–174.

- Nakada et al. (2009). Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. *Placenta* 30, σσ. 774–779.
- Ness et al. (1996). Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* vol. 175, no. 5, σσ. 1365–1370.
- Ogus et al. (2004). The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* (23), σσ. 219-223.
- Olsson et al. (2010). Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger α(1)-microglobulin in pre-eclampsia. *Free Radic. Biol. Med.* 48, σσ. 284–291.
- O'Neill et al. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 226, σσ. 10–18.
- Park et al. (2014). Screening models using multiple markers for early detection of late-onset pre-eclampsia in low-risk pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth*.
- Park et al. (2015). Combined Screening for Early Detection of Pre-Eclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 16, σσ. 17952-17974.
- Parrish et al. (2010). The effect of immune factors, tumor necrosis factor-α, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *Am. J. Hypertens.* 23, σσ. 911–916.
- Pijnenborg et al. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27(9-10), σσ. 939-958.
- Pineda et al. (2011). Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 Is Increased in Placentas from Patients with Preeclampsia. *Archives of Medical Research* 42, σ. 382e391.

- Poon et al. (2010). Hypertensive disorders in pregnancy: Screening by biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 35, σσ. 662–670.
- Powers et al. (1999). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate and susceptibility to preeclampsia. . *J Soc Gynecol Investig* 6, σσ. 74-79.
- Rajakumar et al. (2005). Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* 26, σσ. 563–573.
- Rallabhandi et al. (2006). Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 177, σσ. 322–332.
- Rana et al. (2014). Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension* 63, σσ. 198-202.
- Redman et al. (1999). Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180, σσ. 499–506.
- Redman et al. (2004). Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol* 24, σσ. 565–570.
- Redman et al. (2007). Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 76, σσ. 61–67.
- Redman et al. (2010). Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, σσ. 534–543.
- Rehli. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. . *Trends Immunol* (23), σσ. 375–378.
- Rigo et al. (2006). Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. *Gynecological Endocrinology*, vol. 22, no. 9, σσ. 521–525.

- van Rijn et al. (2008). Maternal TLR4 and NOD2 Gene Variants, Pro-Inflammatory Phenotype and Susceptibility to Early-Onset Preeclampsia and HELLP syndrome. *PLoS ONE*. 3(4).
- Riley et al. (2010). Toll-like Receptors in Pregnancy Disorders and Placental Dysfunction. *Clinic Rev Allerg Immunol* 39, σσ. 185–193.
- Roberts et al. (1989). Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Obstet Gynecol* 161, σσ. 1200-1204.
- Roberts. (1998). Endothelial dysfunction in preclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16, σσ. 5–15.
- Roberts et al. (2000). Preeclampsia: What We Know and What We Do Not Know. *Seminars in Perinatology, Vol 24, No 1*, σσ. 24-28.
- Roberts et al. (2001). Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 357, σσ. 53-56.
- Roberts et al. (2002). Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 23, σσ. 359-372.
- Roberts et al. (2012). The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health* 2, σσ. 72–83.
- Rock et al. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(2), σσ. 588–593.
- Rodesch et al. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, vol. 80, no. 2, σσ. 283–285.
- Roten et al. (2009). Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (theHUNT study). *European Journal of Human Genetics* vol. 17, no. 2, σσ. 250–257.

- Sachan et al. (2016). Diagnostic and prognostic significance of serum soluble endoglin levels in preeclampsia and eclampsia. *Adv Biomed Res.* 5.
- Sacks et al. (1999). An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 20, σσ. 114–118.
- Sado et al. (2011). Inflammatory pattern recognition receptors and their ligands: factors contributing to the pathogenesis of preeclampsia. *Inflamm. Res.* 60, σσ. 509–520.
- Sanger et al. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3), σσ. 441–448.
- Sanger et al. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), σσ. 5463–5467.
- Santillan et al. (2014). Vasopressin in Preeclampsia: A Novel Very-Early Human Pregnancy Biomarker and Clinically-Relevant Mouse Model. *Hypertension* 64(4), σσ. 852–859.
- Sargent et al. (2006). Immunoregulation in normal pregnancy and preeclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 13, σσ. 680–686.
- Shennan et al. (2012). Are most maternal deaths from pre-eclampsia avoidable? *Lancet* 379, σσ. 1686–1687.
- Sibai. (2006). Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near-term) births. *Semin Perinatol* 30, σσ. 16–19.
- Smith et al. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 321 (6071), σσ. 674–679.
- Takeuchi et al. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165, σσ. 5392–5396.

- Than et al. (2008). 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. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 453(4), σσ. 387-400.
- Than et al. (2009). A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, σσ. 9731–9736.
- Thissier-Levy et al. (2013). Endostatin levels and the risk of subsequent preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 170, σσ. 396–400.
- Thornton et al. (1999). Twin mothers, pregnancy hypertension and preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 106, σσ. 570–575.
- Torry et al. (1998). Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179, σσ. 1539–1544.
- Valenzuela et al. (2012). Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *Journal of Pregnancy.*
- Vaughan et al. (2002). Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 21, σσ. 205–223.
- Venkatesha et al. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, σσ. 642–649.
- Ventura et al. (2013). Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 169, σσ. 28-32.
- Vitoratos et al. (2012). Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Journal of Pregnancy.*
- Wallukat et al. (1999). Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J. Clin. Invest.* 103, σσ. 945–952.

- Wang et al. (2005). Placental vascular disease and toll-like receptor 4 gene expression. *American Journal of Obstetrics and Gynecology Volume 192, Issue 3*, σσ. 961–966.
- Wu et al. (2009). Corin: new insights into the natriuretic peptide system. *Kidney International 75(2)*, σσ. 142–146.
- Xia et al. (2013). Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. *Circ. Res. 113*, σσ. 78–87.
- Xie et al. (2010a). Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG 117*, σσ. 99–108.
- Xie et al. (2010b). Toll-like Receptor Gene Polymorphisms and Preeclampsia Risk: A Case-Control Study and Data Synthesis. *Hypertension in Pregnancy 29*, σσ. 390–398.
- Xie et al. (2014). CMV Infection, TLR-2 and -4 Expression, and Cytokine Profiles in Early-Onset Preeclampsia with HELLP syndrome. *Am J Reprod Immunol. 71(4)*, σσ. 379–386.
- Yamamoto et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science 301*, σσ. 640–643.
- Yliniemi et al. (2015). Combination of PAPP_A, fhCG β , AFP, PIGF, sTNFR1, and Maternal Characteristics in Prediction of Earlyonset Earlyonset. *Reproductive Health 9*, σσ. 13–20.
- Young et al. (1914). The aetiology of eclampsia and albuminuria and their relation to accidental haemorrhage: (an anatomical and experimental investigation.). *Proc. R. Soc. Med. 7*, σσ. 307–348.
- Zhang et al. (2008). From endoplasmic reticulum stress to the inflammatory response. *Nature 454*, σσ. 455–462.
- Zhao et al. (2013). Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem 46*, σσ. 953–960.

- Zhou et al. (1998). Oxygen regulates for endovascular invasion in normal pregnancy and in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 39(1-2), σσ. 197–213.
- Zhou et al. (2009). Corin, atrial natriuretic peptide and hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 24, σσ. 1071–1073.
- Zulfikaroglu et al. (2011). Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in pre-eclampsia. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 37, σσ. 1198–1202.
- Zusterzeel et al. (2001). A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia. *J Med Genet* 38, σσ. 234–237.
- Μαυρούλη & συν. (2014). Ο ρόλος των Toll-like υποδοχέων στη φυσική ανοσία. *Ελληνική Μικροβιολογική και Υγιεινολογική Ένωση* ΤΟΜΟΣ 59, Τεύχος 4.
- Σάτρα. (2015). *Εργαστηριακός Οδηγός: Διαγνωστική Μεθοδολογία Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας*. Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνες από:

Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology.

Wikimedia Commons.

Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group St George's University of London (<http://www.rcdrg.sgul.ac.uk/research/trophoblasts>).