



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ: Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Συσχέτιση πολυμορφισμών των γονιδίων AGT1R (A1166C, rs5186)
και AGT2R (C3123A, rs11091046) με την προεκλαμψία»

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΜΠΑΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2018

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Μαρία Σάτρα
ΕΔΙΠ Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**2^{ος} Εξεταστής
(Σύμβουλος)**

Μαρία Σαμαρά
Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**3^{ος} Εξεταστής
(Μέλος)**

Αλέξανδρος Δαπόντε
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας έγινε στο πλαίσιο υλοποίησης της διπλωματικής εργασίας του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ημερολογιακό έτος 2017-2018.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επιστημονική επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Σάτρα (Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας).

Ολοκληρώνοντας αυτή τη προσπάθεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση του παρόντος θέματος όσο και για την καθοδήγηση, το αμείωτο ενδιαφέρον της και τη συνεχή παροχή των γνώσεων και της εμπειρίας της, η σημασία των οποίων ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της εργασίας αλλά και για τη μετέπειτα πορεία μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Σαμαρά για τις συμβουλές της και το χρόνο που αφιέρωσε στη διόρθωση της εργασίας, καθώς επίσης και το Καθηγητή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος αλλά και μέλος της εξεταστικής επιτροπής κ. Αλέξανδρο Δαπόντε.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου βιολογίας και τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά αμέριστη ευγνωμοσύνη οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους για την συνεχή στήριξη τους σε αυτή μου την προσπάθεια.

Αλεξάνδρα Μπάκα
Λάρισα, Οκτώβριος 2018

Περίληψη

Η προεκλαμψία είναι ένα κλινικό σύνδρομο που παρατηρείται περίπου στο 5% των κυήσεων και σχετίζεται με αυξημένο ποσοστό μητρικής και εμβρυικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Βασικός παθογενετικός μηχανισμός της προεκλαμψίας είναι η μη φυσιολογική πλακουντοποίηση και το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η αρτηριακή υπέρταση, η πρωτεϊνουρία και κάποιες φορές η δυσλειτουργία διαφόρων οργάνων.

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές πίεσης και ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών. Η δυσλειτουργία του, που παρατηρείται στην περίπτωση της προεκλαμψίας οδηγεί σε ισχαιμία του πλακούντα, υπέρταση και ανικανότητα αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Η εξέλιξη των ερευνών σχετικά με τους παθογενετικούς μηχανισμούς έχει συμβάλει στην διερεύνηση διαφόρων γονιδίων που θα μπορούσαν μελλοντικά να αποτελέσουν ακριβείς γενετικούς δείκτες που θα συνεισφέρουν στην έγκαιρη διάγνωση και διαχείριση της νόσου. Συνήθως, τα γονίδια που εξετάζονται είναι γονίδια που συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και σε μεταβολικές διαδικασίες. Η προεκλαμψία πιστεύεται ότι σχετίζεται με διάφορους πολυμορφισμούς στα γονίδια του συστήματος RAAS.

Στη παρούσα μελέτη, διερευνάται η πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT1R (A1166C, rs5186) και AGT2R (C3123A, rs 11091046). Τα συγκεκριμένα γονίδια κωδικοποιούν τους υποδοχείς τύπου I (AGT1R) και τύπου II (AGT2R) μέσω των οποίων πραγματοποιούνται οι κυριότερες δράσεις της αγγειοτενσίνης II του συστήματος RAAS.

Για τον σκοπό αυτό, απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα 42 γυναικών με προεκλαμψία και 42 γυναικών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Τα γονίδια AGT1R και AGT2R πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις των ενζύμων DdeI και AluI, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα μας μελετήθηκαν συμπεριλαμβανομένων των κλινικών στοιχείων των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν και υποδηλώνουν μια συσχέτιση του πολυμορφισμού A1166C του γονιδίου AGT1R με την προεκλαμψία, καθώς και μια συσχέτιση και των δύο πολυμορφισμών με τον πρόωρο τοκετό στις προεκλαμπτικές γυναίκες που τους φέρουν. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή ερευνών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Summary

Preeclampsia is a clinical syndrome that occurs in about 5% of pregnancies and is associated with an increased maternal and fetal morbidity and mortality rate. The main pathogenetic mechanism of pre-eclampsia is abnormal placentation and its main feature is arterial hypertension, proteinuria and dysfunction of various organs. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is one of the most important fluid and electrolyte pressure and balance regulators. Its dysfunction, observed in the case of pre-eclampsia, leads to placenta ischaemia, hypertension and abnormal spiral artery invasion. The scientific research evolution has contributed to the exploration of various genes that could possibly be biomarkers for the early diagnosis and management of the disease. Typically, the genes examined are those involved in various cell signaling pathways and metabolic processes. Pre-eclampsia is believed to be related to various polymorphisms in the RAAS system genes. In this study, we investigate the possible correlation of polymorphisms of the AGT1R (A1166C, rs5186) and AGT2R (C3123A, rs 11091046) genes. These genes encode Type I (AGT1R) and Type II (AGT2R) receptors. For this purpose, DNA was isolated from the peripheral blood of 42 women with pre-eclampsia and 42 women who were the control group. The AGT1R and AGT2R genes were amplified by the PCR technique using appropriate primers, then digesting with the enzymes DdeI and AluI, respectively. Our statistical results included the female clinical data of the women and suggest a correlation of AGT1R gene polymorphism with pre-eclampsia, as well as a correlation of both polymorphisms with preterm delivery in the group of pre-eclamptic women. Our results are consistent with existing literature, however, it is necessary to conduct researches on a larger number of samples in order to deduce safer conclusions.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
A1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ.....	9
A2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	9
A3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ.....	11
A4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	13
A4.1 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....	15
A4.1.1 ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	18
A4.1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	18
A4.1.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	19
A4.1.3.1 ΠΡΟ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	20
A4.1.3.2 ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	21
A4.2 ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ.....	22
A4.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	23
A4.4 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....	24
A.4.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ.....	26
A4.6 ΣΥΣΤΗΜΑ RENΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ (RAAS).....	27
A4.6.1 ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗ.....	27
A4.6.2 RENΙΝΗ.....	28
A4.6.3 ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΟΓΟΝΟ.....	29
A4.6.4 ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ.....	30
A4.6.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΤ1 ΚΑΙ ΑΤ2.....	31
A4.7 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΥΠΟΥ-1 ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ II.....	33
A5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ-ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	35
A5.1 ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΙ-ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	35
A5.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	36
A5.2.1 PAPP-A.....	36
A5.2.2 PIGFs.....	37
A5.2.3 sFlt-1.....	37
A5.2.4 sFlt-1/PIGF.....	37
A5.2.5 ΑΛΛΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	38
A5.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	39
A5.3.1 miRNAs.....	40

A6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....	41
A6.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ AT1 ΚΑΙ AT2.....	42
A7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
B1. ΥΛΙΚΑ.....	46
B1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	46
B1.2 ΧΡΩΣΤΙΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	46
B1.3 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	47
B2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
B2.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ QIAAMP® MINI KIT (QIAGEN).....	47
B2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	49
B2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ - PCR(POLYMERASE CHAIN REACTION)	51
B2.3.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PCR ΓΙΑ AGT 1 R ΜΕ HOTSTART.....	52
B2.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PCR ΓΙΑ AGT 2 R ΜΕ HOTSTART.....	53
B2.4 ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ.....	54
B2.4.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΨΗΣ ΤΟΥ AGT1R ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ DdeI.....	55
B2.4.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΨΗΣ ΤΟΥ AGT2R ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ AluI.....	56
B2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	56
B2.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
Γ1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ AT1R ΚΑΙ AT2R.....	57
Γ2. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ.....	59
Γ2.1 ΠΕΨΕΙΣ ΓΙΑ AT1R.....	60
Γ2.2 ΠΕΨΕΙΣ ΓΙΑ AT2R.....	60
Γ3. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	61
Γ4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	64
Γ4.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	64
Γ4.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ.....	64
Γ4.3 ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

❖ ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Η εκλαμψία περιγράφηκε πρώτη φορά πριν από περίπου 4000 χρόνια σαν μία σπασμώδης διαταραχή της κήσεως. Ο όρος προέρχεται από την ελληνική λέξη έκλαμψις (του ρήματος εκλάμπειν), υποδηλώνοντας 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 είναι μια πολυπαραγοντική και πολυσυστηματική διαταραχή της εγκυμοσύνης με παγκόσμιο επιπολασμό 5-8% (Gathiram et al., 2016). Αποτελεί μια από τις βασικές αιτίες μητρικής και εμβρυικής νοσηρότητας και θνησιμότητας αντιπροσωπεύει περίπου 50.000-60.000 μητρικών θανάτων ανά έτος παγκοσμίως (Aung et al., 2017). Με άλλα λόγια, αντιπροσωπεύει το 10-15% όλων των μητρικών θανάτων, ποσοστό που κυμαίνεται ανάλογα με την εθνικότητα και εμφανίζει υψηλότερες τιμές στις αναπτυσσόμενες χώρες (Duley et al., 2009; Aung et al. 2017).

Η προεκλαμψία αποτελεί μια διαδικασία δύο σταδίων (Chaiworarongsa et al., 2014). Το πρώτο στάδιο είναι κλινικά ασυμπτωματικό και χαρακτηρίζεται από παθολογικό πλακούντα. Αυτό οδηγεί στη παραγωγή προϊόντων που εισέρχονται μητρική κυκλοφορία και προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Το δεύτερο στάδιο αρχίζει μετά τις 20 εβδομάδες κύησης και οδηγεί σε κλινική εκδήλωση της νόσου με χαρακτηριστικά συμπτώματα την αρτηριακή πίεση την πρωτεϊνουρία και το γενικευμένο οίδημα (Roberts et al., 2001).

A2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα βασικά διαγνωστικά κριτήρια της προεκλαμψίας μέχρι πρότινος χαρακτηρίζονταν από ξαφνική εκδήλωση υπέρτασης (συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg σε μετρήσεις που απέχουν 4-6 ώρες) και πρωτεϊνουρίας (> 300 mg / 24 h) στις ≥ 20 εβδομάδες κύησης σε προηγουμένως νορμοτασικές εγκύους.

Πλέον από το 2014 και έπειτα, η Διεθνής Εταιρεία Μελέτης της Υπέρτασης στην Εγκυμοσύνη (ISSHP) ορίζει την προεκλαμψία ως διαταραχή με ξαφνική εμφάνιση υπέρτασης μετά από 20 εβδομάδες κύησης σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία (300 ml/ ημέρα), δυσλειτουργία κάποιου μητρικού οργάνου (πχ νευρολογική ή αιματολογική), αυξημένες τρανσαμινάσες στο ήπαρ και βλάβη της νεφρικής λειτουργίας, δυσλειτουργία του πλακούντα, ελάττωση αμνιακού υγρού, μειωμένη

οξυγόνωση και περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου (Tranquilli et al., 2014, Lambert et al., 2014). Η εκδήλωση οιδήματος στο πρόσωπο αν και αποτελεί την μοναδική ανιχνεύσιμη από την εγκυμονούσα αλλαγή, μπορεί να είναι σύμπτωμα λόγω προεκλαμψίας αλλά αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό της εγκυμοσύνης επομένως δεν φέρει τη βαρύτητα του παθολογικού συμπτώματος της διαταραχής αλλά αποτελεί μια ένδειξη που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Maynard et al., 2011). Εφόσον πλέον η πρωτεϊνουρία δεν αποτελεί υποχρεωτικό διαγνωστικό κριτήριο της προεκλαμψίας, η πρωτεϊνουρική και η μη πρωτεϊνουρική προεκλαμψία αποτελούν δυο διαφορετικές κατηγορίες (Mol et al., 2015).

Στις περιπτώσεις εμφάνισης προεκλαμψίας χωρίς την παρουσία πρωτεϊνουρίας, η υπέρταση συνοδεύεται από επίμονη κεφαλαλγία ως αποτέλεσμα σπασμού των αγγείων του εγκεφάλου και του οιδήματος. Επιπλέον μπορεί να παρουσιαστούν διαταραχές στην όραση, επιγαστραλγία (ως αποτέλεσμα διαταραχής του ήπατος ή αιμορραγίας), ναυτία, έμετοι και διαταραχές όρασης (Sibai et al., 2003).

Ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων η προεκλαμψία μπορεί να διακριθεί σε ήπιας και βαριάς μορφής (Sibai et al., 2003). Ως βαριάς μορφής χαρακτηρίζεται η προεκλαμψία με σοβαρή αρτηριακή υπέρταση (>160/110 mmHg) σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία, ή όταν η υπέρταση συνοδεύεται από μια υψηλού βαθμού πρωτεϊνουρία (>2 gr σε συλλογή 24ώρου) (Sibai et al., 2003). Επίσης βαριάς μορφής προεκλαμψία θεωρείται η προεκλαμψία που συνοδεύεται από γενικευμένο οίδημα άνω άκρων και προσώπου, πνευμονικό οίδημα, συμπτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος (κεφαλαλγία, διαταραχές όρασης), θρομβοπενία (αιμοπετάλια <100.000/μL), αυξημένα ηπατικά ένζυμα, άλγος στομάχου και καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης (Sibai et al., 2005). Σε ορισμένες περιπτώσεις η προεκλαμψία μπορεί να εξελιχθεί σε εκλαμψία δηλαδή στην εκδήλωση γενικευμένων τονικών και κλονικών σπασμών οι οποίοι ακολουθούν τις οπτικές παραισθήσεις και την επίμονη κεφαλαλγία.

Η αύξηση των ηπατικών ενζύμων και η θρομβοπενία σε συνδυασμό με την αιμόλυση συνιστούν μια σοβαρή επιπλοκή της προεκλαμψίας που ονομάζεται σύνδρομο HELLP. Το σύνδρομο HELLP επιπλέκεται στο 5-8% των περιστατικών της προεκλαμψίας και συνδέεται με υψηλά ποσοστά μητρικής θνησιμότητας ιδιαίτερος στις περιπτώσεις βαριάς μορφής προεκλαμψίας (Sibai et al., 2003).

Πέρα από την διάκριση σύμφωνα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων, η προεκλαμψία λόγω της ετερογένειας της, κατηγοριοποιείται σε πρώιμη (πριν τις 34 εβδομάδες) και όψιμη που εμφανίζεται μετά τις 34 εβδομάδες (Dadelszen et al., 2003). Στην πρώιμη

προεκλαμψία ο κίνδυνος περιγεννητικού θανάτου και σοβαρής νεογνικής νοσηρότητας είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την όψιμη. Σχετίζεται συχνά με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και παρουσιάζει μη φυσιολογικό Doppler για τις μητριάιες και ομφάλιες αρτηρίες (Park et al., 2015).

Τα περιστατικά πρώιμης προεκλαμψίας αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα μητρικών και περιγεννητικών επιπλοκών και καταλήγουν πιο συχνά σε πρόωρο τοκετό ή στο σύνδρομο HELLP, σε αντίθεση με την όψιμη προεκλαμψία στην οποία η κατάσταση της μητέρας είναι ηπιότερη και η πρόγνωση για το νεογνό ευνοϊκότερη (Lisonkova et al., 2013; Xie et al., 2014).

Δεν έχει εξακριβωθεί το αν η πρώιμη και όψιμη προεκλαμψία είναι διαφορετικές μορφές της ίδιας πάθησης ή αν οφείλονται σε διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς (Chaiworapongsa et al., 2014), ωστόσο διαφέρουν σε αρκετούς παράγοντες και οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα, επομένως αντιμετωπίζονται σαν δυο διαφορετικές κατηγορίες ως προς την αιτιολογία την πρόγνωση και την αντιμετώπιση (Lisonkova et al., 2013).

A3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Αν και η αιτία της προεκλαμψίας παραμένει αδιευκρίνιστη, έχουν περιγράψει αρκετοί κλινικοί παράγοντες κινδύνου που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην εμφάνιση της. Ανάμεσα σε αυτούς είναι η ηλικία της μητέρας, η εθνικότητα, η πολλαπλή κυοφορία, η παχυσαρκία, οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, το οικογενειακό ιστορικό ή το ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη κύηση (Duckitt et al., 2005).

Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες με ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών έχουν σχεδόν διπλάσια πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας είτε η κύηση είναι πρωτότοκη είτε όχι. Ο κίνδυνος προεκλαμψίας αυξάνεται κατά 30% για κάθε επιπλέον έτος μετά τα 34 έτη. Όσον αφορά την μικρή ηλικία εμφάνισης υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι δεν παίζει ρόλο (Duckitt et al., 2005), αλλά και μελέτες που υποστηρίζουν ότι υπάρχει αυξημένη επίπτωση της προεκλαμψίας σε εγκυμονούσες κάτω των 20 ετών λόγω χρονικά περιορισμένης έκθεσης στο σπέρμα (Einarsson et al., 2003).

Σχετικά με το ιστορικό προεκλαμψίας, οι γυναίκες που σε πρώτη εγκυμοσύνη εμφάνισαν προεκλαμψία έχουν επτά φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν στη δεύτερη εγκυμοσύνη (Duckitt et al., 2005). Αντίθετα, σε γυναίκες χωρίς ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνει όταν το χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο κυήσεις είναι μεγάλο (Skjaerven et al.,

2004). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι το ιστορικό φυσιολογικής κύησης ή προηγούμενης αποβολής μειώνει τον κίνδυνο για προεκλαμψία ωστόσο η αλλαγή του συντρόφου καταργεί αυτή την προστατευτική δράση (Saftlas et al., 2003). Η παρατήρηση αυτή έχει αποδοθεί σε έναν ανοσολογικό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο το σύστημα ανοσίας της μητέρας αναπτύσσει ανοχή στα πατρικά αλλοαντιγόνα μετά την έκθεση στο σπερματικό υγρό (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). Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση στο σπέρμα αυξάνει τον κίνδυνο προεκλαμψίας γεγονός που πιθανώς εξηγεί τον αυξημένο κίνδυνο της κατάστασης αυτής και σε γυναίκες που επιλέγουν ως μέθοδο αντισύλληψης το διάφραγμα, σε μητέρες που έχουν διαφορετικό σύντροφο στην επόμενη εγκυμοσύνη και σε γυναίκες που υποβάλλονται σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Πέρα από την συσχέτιση των τεχνικών αναπαραγωγής με την αυξημένη έκθεση στο σπέρμα και συνεπώς την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας, η υπογονιμότητα και οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο προεκλαμψίας είτε λόγω χρήσης δωρητών γαμετών (σπέρμα, ωάρια, έμβρυα) που οδηγούν σε μεταβολές του ανοσολογικού συστήματος είτε λόγω του ιστορικού των γυναικών που καταφεύγουν σε αυτές τις τεχνικές (γυναίκες άνω των 40 ετών, πολλαπλές προηγούμενες αποβολές, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, παχυσαρκία). Παράλληλα, μέσω των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυξάνονται οι πολύδυμες κύσεις στις οποίες έχει καταγραφεί τριπλασιασμός του κινδύνου εμφάνισης της προεκλαμψίας (Coonord et al., 1999; Duckitt et al., 2005, Wen et al., 2004).

Ωστόσο, υπάρχουν και προϋπάρχουσες ιατρικές καταστάσεις που βρέθηκε ότι συσχετίζονται με την εμφάνιση της προεκλαμψίας όπως η χρόνια υπέρταση, νεφρική νόσος, αυτοάνοσα νοσήματα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, η θρομβοφιλία και η παχυσαρκία (Sibai, 2006; Sargent et al., 2006; Chaiworapongsa et al., 2014, Duckitt et al., 2005; Jadli et al., 2015). Πιθανή αιτία αποτελεί η υπερδραστικότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, αύξηση της έκκρισης κυτταροκινών και το οξειδωτικό στρες ή η απευθείας επίδραση της

υπερσουλιναιμίας στη πλακουντοποίηση (Wolf et al., 2002; Wen et al., 2004; Lawler et al., 2007).

Διαφορετικοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν πρώιμη προεκλαμψία και όψιμη προεκλαμψία. Όσον αφορά τη πρώιμη οι βασικοί παράγοντες είναι η εμφάνιση προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, η προυπάρχουσα υπέρταση και η εθνικότητα, ενώ για την όψιμη προεκλαμψία το αυξημένο ρίσκο μπορεί να συνδέεται περισσότερο με το οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία της μητέρας και την καταγωγή (Cetin et al., 2011).

Εκτός από τους παράγοντες που μπορεί να αυξάνουν το ρίσκο σε κλινικό επίπεδο, σημαντική είναι και η παρουσία γενετικής προδιάθεσης εμφάνισης της νόσου τόσο στη μητέρα όσο και στον πατέρα (Nillson et al., 2004). Η γενετική προδιάθεση και ο εντοπισμός των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση της προεκλαμψίας μπορεί να οδηγήσει στη κατανόηση του μηχανισμού της παθογένεσης και να συμβάλλει στη πιθανή ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων με επιγενετική τροποποίηση. Οι μέχρι τώρα έρευνες δηλώνουν ότι η εμφάνιση της διαταραχής είναι πιθανό να συσχετίζεται με διαφορές στην έκφραση διαφόρων γονιδίων τα οποία μπορούν να ρυθμιστούν μέσω μεθυλίωσης (Yan et al., 2013).

A4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας ξεκινά κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης πολύ πριν εμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα (Gathiram et al., 2016). Είναι γνωστό ότι ο πλακούντας κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη της διαταραχής και διαπιστώνεται ότι οι ρίζες της προεκλαμψίας βασίζονται σε αναντιστοιχία των εμβρυοπλακουντιακών απαιτήσεων και της μητροπλακουντιακής παροχής (Dadelszen et al., 2002).

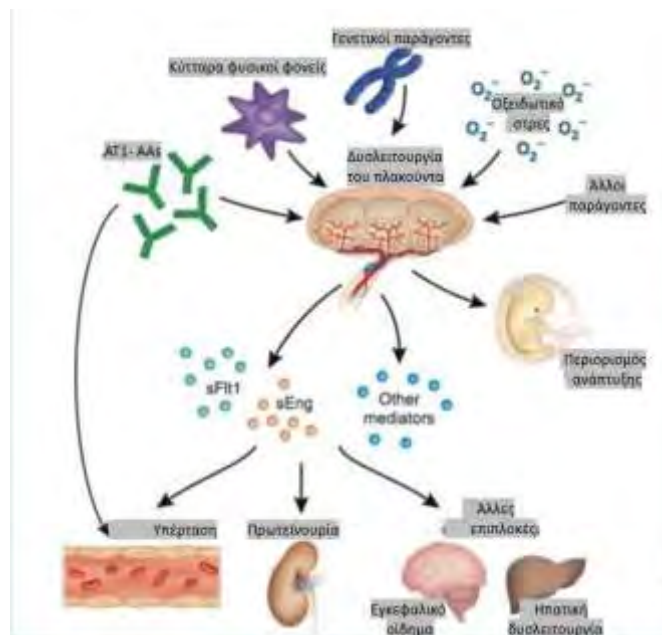
Καθώς εξελίσσεται η εγκυμοσύνη η ανεπαρκής αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας μαζί με πολλαπλούς αιμοδυναμικούς και μητροπλακουντιακούς παράγοντες συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και καρδιαγγειακού συστήματος της μητέρας (James et al., 2010).

Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες που εστιάζουν στην άποψη ότι η μητροπλακουντιακή ισχαιμία και η βλάβη του ενδοθηλίου αποτελούν τις βασικές προϋποθέσεις εκδήλωσης της διαταραχής (James et al., 2010). Η μητροπλακουντιακή ισχαιμία μπορεί να είναι αποτέλεσμα προυπάρχουσας ιατρικής κατάστασης της μητέρας (πχ διαβήτη) και μεγάλης διάτασης του μυομητρίου (πχ λόγω δίδυμου κύησης) αλλά κυρίως απόρροια αδυναμίας φυσιολογικής ανάπτυξης του πλακούντα

η οποία οφείλεται σε ανικανότητα προσαρμογής του ανοσολογικού μηχανισμού της μητέρας στα αντιγόνα της εμβρυϊκής τροφοβλάστης (Boucharitou et al., 2008). Η πλακουντιακή ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία μεταξύ αντιαγγειογόνων και προαγγειογόνων παραγόντων η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία επηρεάζοντας όλα τα μητρικά συστήματα και κατ' επέκταση να περιορίσει την ανάπτυξη του εμβρύου (Gathiram et al., 2016). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μπορεί να ερμηνεύσει όλα τα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας (υπέρταση, πρωτεϊνουρία, νεφρική ανεπάρκεια, εκλαμψία) (Chaouat et al., 2003).

Με την εξέλιξη των ερευνών σχετικά με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, διαπιστώνεται ότι η ανάπτυξη πρώιμης και όψιμης προεκλαμψίας και ο περιορισμός της ενδομήτριας ανάπτυξης δεν προκύπτει αναγκαστικά από την ίδια παθοφυσιολογία και είναι πιθανό να διαφέρουν ως προς του παθογενετικούς μηχανισμούς και τις αιτιολογικές οδούς (James et al., 2010; Gathiram et al., 2016).

Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της πρώιμης προεκλαμψίας είναι η ατελής διαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών με αποτέλεσμα την υποδιάχυση του πλακούντα και τη μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο (Dadelszen et al., 2003; Gathiram et al., 2016). Ενώ στην όψιμη προεκλαμψία οι σπειροειδείς αρτηρίες έχουν ελαφρώς μειωμένη διάμετρο (Huppertz et al., 2008). Αυτό συμβαίνει γιατί η πρώιμη προεκλαμψία σχετίζεται με την υποπλασία του πλακούντα ενώ στην όψιμη δεν υπάρχει καμία τροποποίηση των σπειροειδών αρτηριών γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε διάχυση του πλακούντα (Sohlberg et al., 2014). Η ακριβής αιτιολογία παραμένει ασαφής ωστόσο διερευνώνται παράγοντες που πιθανώς έχουν σημαντικό ρόλο στο αιτιολογικό μονοπάτι μεταξύ αυτών προαγγειογόνοι και αντιαγγειογόνοι παράγοντες, ανοσολογικές διεργασίες, φλεγμονικές αποκρίσεις, ρόλος κυτοκινών και χημειοκινών, οξειδωτικό στρες, η υποξία, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η λειτουργία του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης και αλδοστερόνης και τα αυτοαντισώματα για τον υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II (Chaiworapongsa et al., 2014; Gathiram et al., 2016) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Προτεινόμενοι παράγοντες που ενδέχεται να προκαλέσουν δυσλειτουργία του πλακούντα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση αντι-αγγειογόνων παραγόντων (sFlt-1 και sEng) και άλλων μεσολαβητών που μπορούν να οδηγήσουν σε προεκλαμψία (Parikh et al., 2008).

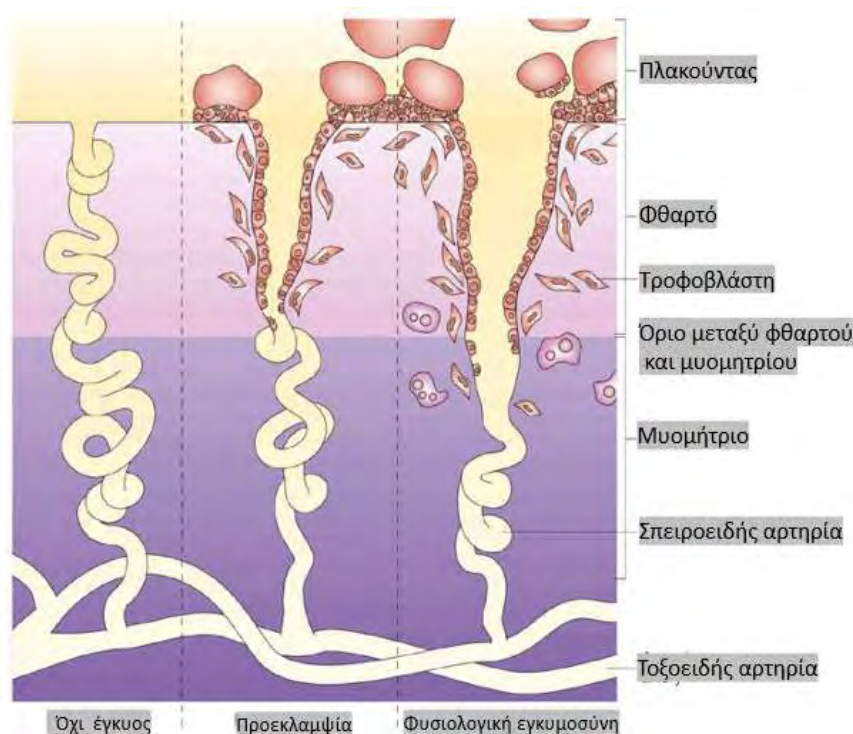
A4.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Ο πλακούντας είναι ο κεντρικός παράγοντας της παθογένειας της προεκλαμψίας. Άλλωστε έχει διαπιστωθεί ότι προεκλαμψία μπορεί να εμφανιστεί μόνο παρουσία πλακούντα ακόμα και αν δεν υπάρχει έμβρυο όπως στη περίπτωση υδατιδώδους μύλης (Mihran et al., 2013). Σε μια φυσιολογική κύηση ο πλακούντας σχηματίζεται από την τροφοβλάστη, η οποία αποτελεί την εξωκυτταρική στιβάδα της εμφυτευόμενης βλαστοκύστης. Το τμήμα της τροφοβλάστης που περιβάλλει την εμβρυοβλάστη προσκολλάται στο ενδομήτριο, κατά την πέμπτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, διαβρώνοντας το με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων μέχρι να εισχωρήσει ολοκληρωτικά. Στη συνέχεια τα τροφοβλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν λαχνωτές προεκβολές (Red-horse et al., 2004). Οι λαχνωτοί σχηματισμοί εμφανίζουν μια εξωτερική στιβάδα τη συγκυτιοτροφοβλάστη η οποία περιβάλλει τη στιβάδα των μονοπύρηνων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων που βρίσκονται ακριβώς κάτω από το συγκύτιο. Υπάρχουν δύο πληθυσμοί εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων, τα διάμεσα και τα ενδοαγγειακά κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Τα διάμεσα μεταναστεύουν στο φθαρτό όπου και εκκρίνουν

αγγειοδιασταλτικές ουσίες (οξείδιο αζώτου), οι οποίες επιδρούν στις σπειροειδείς αρτηρίες πριν την αναδιαμόρφωση τους από τα ενδοαγγειακά. Μέχρι την 9^η εβδομάδα κύησης, τα ενδοαγγειακά εισέρχονται στον αυλό των σπειροειδών αρτηριών και σχηματίζουν ενδοαυλικές βαλβίδες που ελέγχουν τη ροή του αίματος στους μεσολάχιους χώρους εμποδίζοντας την αυξημένη αιματική ροή προς το έμβρυο (Lyal et al., 2005). Η διαδικασία που περιγράφηκε αποτελεί το πρώτο κύμα τροφοβλαστικής διείσδυσης.

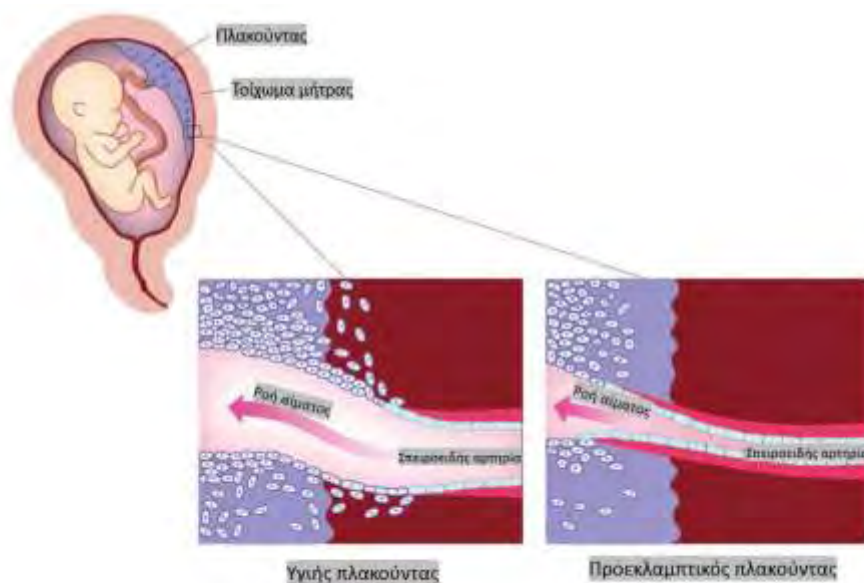
Το δεύτερο κύμα παρατηρείται κατά το δεύτερο τρίμηνο κύησης (μέχρι 16^η-20^η εβδομάδα) κατά το οποίο τα ενδοαγγειακά κύτταρα επενδύουν το τοίχωμά τους αντικαθιστώντας το ενδοθήλιο και την μυϊκή και ελαστική στιβάδα γεγονός που προκαλεί εντυπωσιακή διαστολή στα άκρα προς το φθαρτό. Η αναδιαμόρφωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αγγειακής αντίστασης και την απώλεια της δυνατότητας των αγγείων να αντιδρούν στα ερεθίσματα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Red-horse et al., 2004).

Η προεκλαμψία αποτελεί αποτυχία του δεύτερου μεταναστευτικού κύματος της τροφοβλάστης κι έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της μυϊκής και ελαστικής στιβάδας (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Διαταραχές διείσδυσης της τροφοβλάστης στην προεκλαμψία. (Nature Immunology, 2008).

Η διατήρηση τους προκαλεί αυξημένες αγγειακές αντιστάσεις, αύξηση του οξειδωτικού στρες και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Valenzuela et al., 2012). Η αποτυχία τροποποίησης των σπειροειδών αρτηριών που περιγράφηκε οδηγεί σε μητροπλακουντιακή ισχαιμία που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του δεύτερου τριμήνου (Chaiworapongsa et al., 2014). Αξίζει να αναφερθεί ότι η αδυναμία μορφοποίησης των σπειροειδών αρτηριών δεν είναι επαρκής για να προκαλέσει προεκλαμψία καθώς αποτελεί χαρακτηριστικό κι άλλων γυναικολογικών παθολογικών καταστάσεων όπως η αυτόματη έκτρωση, ο περιορισμός ενδομήτριας ανάπτυξης, η ρήξη του πλακούντα ο πρόωρος τοκετός και η πρόωρη ρήξη των υμένων (Chaiworapongsa et al., 2014). Ωστόσο, πιστεύεται ότι η μειωμένη ροή αίματος του πλακούντα θα μπορούσε να οδηγήσει σε υποξία του πλακούντα η οποία έχει προτεθεί ως τελική αιτία της προεκλαμψίας (Redman et al., 2005) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μια σχηματική σύγκριση των δομών των ανθρώπινων πλακούντων σε φυσιολογική κύηση και σε προεκλαμψία (Wang et al., 2009)

Ωστόσο διαπιστώνεται ότι η μειωμένη ροή αίματος ή η χρόνια υποξία χωρίς κάποια άλλη παθολογική κατάσταση δεν αποτελεί αιτία των βλαβών του πλακούντα στη προεκλαμψία αλλά η εναλλαγή ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και υποξίας-επανοξυγόνωσης είναι αυτή που φαίνεται να έχει τον κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της (Gathiram et al., 2016).

Ο ισχαιμικός και δυσλειτουργικός πλακούντας θεωρείται ότι εκκρίνει παράγοντες κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου κύησης που επάγουν τη συστηματική δυσλειτουργία και την κλινική εκδήλωση του συνδρόμου της προεκλαμψίας (Gathiram et al., 2016;

Duckitt et al., 2005). Τέτοιοι παράγοντες είναι προϊόντα πλακουντιακής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες και αγγειογενετικοί παράγοντες (Stepan et al., 2006; Gathiram et al., 2016).

A4.1.1 ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Σε κάθε φυσιολογική κύηση παρατηρούνται αποπτωτικά συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα λόγω της ανανέωσης του συγκυτίου (Huppertz et al., 1998). Ωστόσο, στη προεκλαμψία εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα. Παράλληλα, έχουν εντοπιστεί υψηλές συγκεντρώσεις εμβρυικού DNA και κυτοκερατίνης. Στις γυναίκες που πρόκειται να εμφανίσουν προεκλαμψία η αύξηση του εμβρυικού DNA παρατηρείται ήδη από την 16-18^η εβδομάδα. Τα παραπάνω είδη αποπτωτικών κυττάρων αντικατοπτρίζουν την μειωμένη αιμάτωση και την μητροπλακουντιακή ισχαιμία (Levine et al., 2004) και συμμετέχουν στην παθογένεια της προεκλαμψίας λόγω της ικανότητάς τους να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση στη μητέρα (Davies et al., 1985; Gathiram et al., 2016).

A4.1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξειδωτικό στρες έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Η αιτία εμφάνισης οξειδωτικού στρες σε γυναίκες με προεκλαμψία έγκειται στην εναλλαγή υποξίας-επανοξυγόνωσης που προκύπτει λόγω της αδυναμίας τροποποίησης των σπειροειδών αρτηριών (Burton et al., 2011). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μέχρι τις 10 εβδομάδες κύησης η συγκέντρωση οξυγονου στον πλακούντα είναι περίπου 3% (Rodesch et al., 1992). Το ποσοστό αυτό αρχίζει να αυξάνεται όταν στη φυσιολογική διαδικασία πλακουντοποίησης, η εισχώρηση της τροφοβλάστης δημιουργεί μια αυξανόμενη διαβάθμιση συγκέντρωσης από τις αρτηρίες της μητέρας στον πλακούντα. Γύρω στις 10-12 εβδομάδες κύησης αυξάνεται η ενδοκυτταρική ροή αίματος γεγονός που οδηγεί στην έκθεση της τροφοβλάστης σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης οξυγόνου (Caniggia et al., 2000). Το οξειδωτικό στρες στην προεκλαμψία μπορεί να προκαλείται είτε από τη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου είτε από την βλάβη του μηχανισμού αντίχενωσης του οξυγόνου στους πλακούντες γεγονός που οδηγεί στην υπερέκφραση ενός παράγοντα επαγόμενου από την προεκλαμψία που ονομάζεται HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha). Η έκφραση αυτού του παράγοντα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης συγχρονίζεται με την έκφραση ενός άλλου παράγοντα του TGF3 (Transforming growth factor beta-3) ο οποίος αποτελεί

αναστολέα της πρώιμης διαφοροποίησης των τροφοβλαστών. Η έκφραση και των δύο μορίων είναι αυξημένη στη πρώιμη εγκυμοσύνη (μέχρι την 10^η εβδομάδα) όπου επικρατούν συνθήκες υποξίας και μειώνεται όταν τα επίπεδα οξυγόνου στον πλακούντα αυξάνονται. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε προεκλαμπτικούς πλακούντες, παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση του TGF3 . Επομένως αν η συγκέντρωση οξυγόνου στον πλακούντα δεν αυξηθεί ή οι τροφοβλάστες δεν αντιληφθούν την αύξηση η έκφραση των παραγόντων HIF-1a και TGF3 θα παραμείνει υψηλή γεγονός που θα οδηγήσει σε πλημμελή εισβολή των τροφοβλαστών στον πλακούντα και κατά συνέπεια σε επερχόμενη προεκλαμψία (Cannigia et al., 2000; Gathiram et al., 2016).

Επιπλέον σε περιπτώσεις υποξίας ή οξειδωτικού στρες έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου της αιμογλοβίνης (Hb) γεγονός που έχει διαπιστωθεί και στις περιπτώσεις προεκλαμψίας (Hansson et al., 2014). Η Hb και η Hbf (εμβρυική αιμοσφαιρίνη) πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη παθογένεση της προεκλαμψίας. Σε μελέτη τους ο Hansson και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ελεύθερη Hb εκτός από οξειδωτικό στρες προκάλεσε βλάβη τόσο στον πλακούντα όσο και στα νεφρά (Hansson et al., 2014).

Παράλληλα, σε πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία, έχει παρατηρηθεί καρβοξυλίωση των πρωτεϊνών, υπεροξειδωση των λιπιδίων και οξείδωση του DNA λόγω της έκθεσης σε αυξημένες ρίζες οξυγόνου (Burton et al., 2011). Επιπλέον στις ασθενείς παρατηρείται μειωμένη έκφραση δισμουτάσης υπεροξειδίου και υπεροξειδάσης γλουταθειόνης, γεγονός που αποτυπώνει την επιρροή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του πλακούντα στο σύνδρομο αυτό. (Vaughan et al., 2002).

Συμπερασματικά, η υποξία και το τοπικό οξειδωτικό στρες που επικρατούν στον πλακούντα σε συνδυασμό με την υποαιμάτωση οδηγούν στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Ness et al., 1996).

A4.1.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Είναι γνωστό ότι η αγγειογένεση αποτελεί προϋπόθεση μιας επιτυχημένης έκβασης μιας εγκυμοσύνης και ότι η ανικανότητα άρτιας πραγματοποίησης της αποτελεί ένα παθολογικό μονοπάτι προς την εκλαμψία (Torry et al., 1998). Μια πληθώρα αγγειογενετικών παραγόντων παράγεται από των ανθρώπινο πλακούντα οι οποίοι χωρίζονται σε προαγγειογενετικούς και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες.

A4.1.3.1 ΠΡΟ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι προαγγειογενετικοί παράγοντες που έχουν βασικό ρόλο στην αγγειογένεση του πλακούντα είναι ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (PIGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF) και η ενδογλίνη (Eng) (Jardi m et al., 2015;Gothiram et al.,2016).

Ο VEGF είναι ένα ενδοθηλιακό μιτογόνο που σταθεροποιεί το ενδοθήλιο και προωθεί την αγγειογένεση στα ώριμα αγγεία (Maharaj et al., 2008). Θεωρείται απαραίτητος παράγοντας και την ακεραιότητα των μητρικών ενδοθηλίων (Gothiram et al., 2016). Ο VEGF παράγεται από μακροφάγα, καρκινικά κύτταρα και κυταροτροφοβλάστες (Jardim et al.,2015). Ο ελεύθερος VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση ρυθμίζοντας την σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση του VEGF μπορεί να προκαλέσει θνησιμότητα του εμβρύου και σημαντικά αγγειακά προβλήματα στον πλακούντα. Επιπλέον, η χρήση αναστολέων VEGF για θεραπευτικούς σκοπούς σε ασθενείς με καρκίνο μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα όπως η υπέρταση και η πρωτεϊνουρία (Levine et al., 2004).

Ο PIGF είναι ένας αγγειογενετικός παράγοντας αύξησης ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των VEGF παραγόντων και ενισχύει τη σηματοδότηση τους. Οι PIGF παράγοντες έχουν μεγάλη σημασία σε όλη την περίοδο ανάπτυξης του εμβρύου λόγω της συμμετοχής τους στην αγγειογένεση (Wilkstrom et al., 2007). Ο PIGF εμφανίζεται στη τροφοβλάστη στο επίπεδο εκείνο που βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μητρική κυκλοφορία. Κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων μιας κανονικής εγκυμοσύνης παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του η οποία ακολουθείται από μια μείωση (Jardim et al., 2015).

Ένας άλλος προαγγειογενετικός παράγοντας είναι ο TGF-b και ειδικότερα οι TGF-b1 και TGF-b3. Αυτό που είναι γνωστό για αυτούς τους παράγοντες όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι ότι εκφράζονται στον προεκλαμπτικό πλακούντα και μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστών αλλά και την ομαλή τροποποίηση και εισβολή τους στις σπειροειδείς αρτηρίες (Gathiram et al., 2016).

Η ενδογλίνη (Eng) έχει προαγγειογόνο δράση η οποία αποτρέπει την απόπτωση σε υποξυγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενδοθηλιακού οξειδίου του αζώτου (eNOS). Διαθέτει θέσεις πρόσδεσης στον υποδοχέα του TGF-b1 και TGF-b3 και εκφράζεται στη κυτταρική μεμβράνη του αγγειακού ενδοθηλίου (Jardim et al., 2015).

A4.1.3.2 ANTI-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες είναι ουσιαστικά οι υποδοχείς των VEGF (VEGFR1 και VEGFR2) και η διαλυτή ενδογλίνη Eng (sENG).

Ο VEGFR1 είναι επίσης γνωστός ως κινάση τυροσίνης τύπου 1 (Flt-1), η οποία δεσμεύεται με μεμβράνη, ενώ ο VEGFR2 είναι γνωστός ως υποδοχέας εισαγωγής κινάσης (KDR). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο πλακούντας απελευθερώνει διαλυτό Flt-1 (sFlt-1) το οποίο ανταγωνίζεται τόσο VEGF όσο και τον PlGF εμποδίζοντας τους να αλληλεπιδράσουν με τους ενδογενείς υποδοχείς τους. Αποτέλεσμα αυτού είναι η συμβολή των παραγόντων στα συμπτώματα της προεκλαμψίας (υπέρταση, πρωτεϊνουρία και δυσλειτουργία ενδοθηλιακών κυττάρων) (Vitoratos et al., 2012).

Επιπρόσθετα, η διαλυτή μορφή της ενδογλίνης έχει αντιαγγειογόνες επιδράσεις καθώς εμποδίζει την δέσμευση του αυξητικού παράγοντα TGF-b1 και b3 στους υποδοχείς του στα ενδοθηλιακά κύτταρα θέτοντας σε κίνδυνο την παραγωγή οξειδίου του αζώτου (Jardim et al., 2015, Gathiram et al., 2016). Η διαλυτή μορφή ενδογλίνης παράγεται σε συνθήκες υποξίας και έχει ανταγωνιστική δράση με τον προαγγειογόνο παράγοντα ενδογλίνη και πλέον αποτελεί δείκτη προεκλαμψίας λόγω της ικανότητας του να αναστέλλει την ενδοθηλιακή λειτουργία in vitro (Levine et al., 2006 ; Jardim et al., 2015). Ο Venkatesha και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η έκφραση του Eng mRNA ήταν σημαντικά αυξημένη στον ιστό του πλακούντα ιδιαίτερα σε προεκλαμπτικές συγκυτιοτροφοβλάστες 25 και 40 εβδομάδες κύησης σε σύγκριση με φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Παράλληλα οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι στις συγκεκριμένες περιπτώσεις υπήρχαν αυξημένα επίπεδα διαλυτής ενδογλίνης στον ορό των προεκλαμπτικών γυναικών (Venkatesha et al., 2006).

Επομένως, οι ερευνητές συμπέραναν ότι τόσο οι sFlt-1 όσο και οι sEng θα μπορούσαν να εμποδίσουν τη δράση των TGF-b1 και VEGF αντίστοιχα. Ωστόσο, τα επίπεδα TGF-b1 δεν φάνηκαν να διαφοροποιούνται σε προεκλαμπτικές και φυσιολογικές εγκυμονούσες (Venkatesha et al., 2006). Αντίθετα, αναφέρεται ότι τα επίπεδα sFlt-1 στο πλάσμα των προεκλαμπτικών γυναικών ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με φυσιολογικές εγκυμοσύνες στις 6-10 εβδομάδες κύησης με τη μεγαλύτερη αύξηση γύρω στις 2-5 εβδομάδες πριν την κλινική εκδήλωση της διαταραχής (Chaiworapongsa et al., 2005). Στα πειράματα τους ο ερευνητής διαπίστωσαν ότι η χορήγηση σε αρουραίους που εγκυμονούσαν αύξησε σημαντικά τη μέση αρτηριακή πίεση στις 17-18 ημέρες της εγκυμοσύνης αλλά είχε ήπια έως μέτρια επίδραση στην

πρωτεϊνουρία. Ωστόσο, η συγχορήγηση του sFlt-1 προκάλεσε υψηλά επίπεδα πρωτεϊνουρίας, υπέρτασης και εμφάνιση του συνδρόμου HELLP (Venkatesha et al., 2006).

Όλο και περισσότερες ενδείξεις υποδεικνύουν μια ανισορροπία των προαγγειογόνων και των αντιαγγειογόνων παραγόντων που σχετίζονται με την παθογένεση της προεκλαμψίας (Maynard et al., 2011). Είναι σαφές ότι η ανισορροπία μεταξύ των αντιαγγειογόνων παραγόντων (sEng και sFlt-1) και των προαγγειογόνων παραγόντων (VEGF, PlGF και TGF-β), μπορεί να προκαλέσει γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και να οδηγήσει να σε υπέρταση, πήξη του αίματος και νεφρική δυσλειτουργία (Gathiram et al., 2016). Συνεπώς είναι απαραίτητη η ανάπτυξη περισσότερων μελετών για τον προσδιορισμό της λειτουργίας και δράσης αυτών των παραγόντων για να διασαφηνιστεί η συνάφεια τους με την αιτιοπαθογένεση της προεκλαμψίας (Jardim et al., 2015).

A4.2 ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ

Το ενδοπλασματικό στρες σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και είναι υπεύθυνο για τη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Kaufman et al., 2012). Στις περιπτώσεις προεκλαμψίας, δημιουργείται από τις συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και υποξίας-επανοξυγόνωσης και μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο στην έλλειψη ομοιόστασης. Κατά κύριο λόγο, το ενδοπλασματικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ξεδιπλωμένων ή λαθεμένα ξεδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Du et al., 2017). Αυτό συμβαίνει γιατί η ομοιόσταση του κυττάρου εξασφαλίζεται από την συμμετοχή του στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, το δίπλωμα των πρωτεϊνών και την ικανότητα του να ενεργοποιεί την απόκριση αποδιεταγμένης πρωτεΐνης (UPR) (Zhang et al., 2008; Burton et al., 2009).

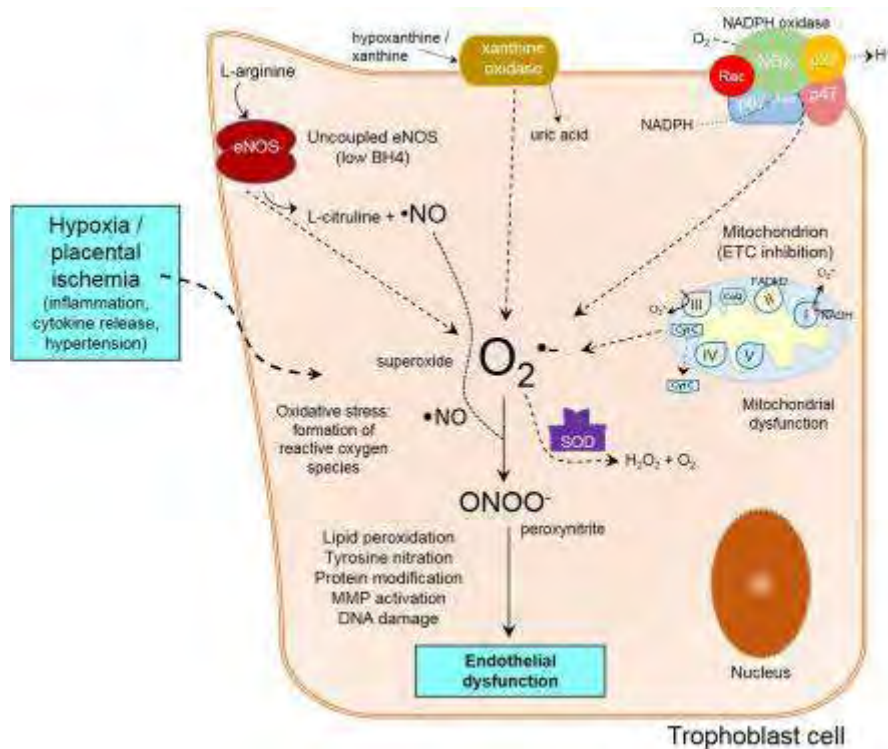
Η απόκριση αποδιεταγμένης πρωτεΐνης εμφανίζεται όταν υπάρχει ελλειπής παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου και μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι και απόπτωση (LaMarca et al., 2008; Burton et al., 2009). Η παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σχετίζεται με τον περιορισμό ή την καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου που συμβαίνει στην προεκλαμψία (Lian et al., 2011). Με βάση εργαστηριακά ευρήματα, το ενδοπλασματικό στρες συσχετίζεται με την προεκλαμψία λόγω της αύξησης των παραγόντων που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση της απόκρισης UPR (Burton et al., 2009; Lian et al., 2011). Σε πρόσφατες μελέτες, διαπιστώθηκε η

αυξημένη έκφραση του ενδοπλασματικού νιτρικού οξέος σχετίζεται με την αυξημένη κυτταρική απόπτωση στους πλακούντες των ασθενών με προεκλαμψία, γεγονός που μπορεί να συνεισφέρει στη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας (Du et al., 2017). Επιπρόσθετα, η κυτταρική απόπτωση που μπορεί να οδηγήσει σε πτώση της τροφοβλάστης επιφέροντας ενδοαγγειακή φλεγμονώδη απάντηση λόγω της απελευθέρωσης στη κυτταρική κυκλοφορία μικρό και νάνο σωματιδίων (Burton et al., 2009).

A4.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το ενδοθήλιο αποτελεί τον βασικότερο στόχο της προεκλαμψίας. Αν και τα μέχρι στιγμής δεδομένα περιγράφουν ότι η διαταραχή πηγάζει από τον πλακούντα, ο ιστός που επηρεάζεται περισσότερο είναι το μητρικό αγγειακό ενδοθήλιο (Maynard et al., 2011; LaMarca et al., 2012). Οι αιτίες της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι αμφιλεγόμενες (Kahhale et al., 2018).

Η βασική αιτία πρόκλησης της δυσλειτουργίας εικάζεται ότι είναι η παραγωγή τοξικών ουσιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω της ανεπαρκούς εισχώρησης της τροφοβλάστης (Kahhale et al., 2018). Η διαταραχή της αναδιαμόρφωσης της σπειροειδούς αρτηρίας η οποία ακολουθείται από ισχαιμία-επαναιμάτωση και φλεγμονή του πλακούντα οδηγεί στην αύξηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από διαφορετικές πηγές, όπως την ανισορροπία ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος, την σύνθεση οξειδάσης NADPH και των δραστικών μορφών οξυγόνου ROS και την αναστολή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Η επανένωση όλων αυτών των γεγονότων οδηγεί σε σχηματισμό υπεροξυνιρίτη, υπεροξείδωση λιπιδίων, τροποποίηση των πρωτεϊνών, την ενεργοποίηση των μητραξινών (MMPs) και τελικά την βλάβη στο DNA οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Εικόνα 4) (Lissete et al., 2014).



Εικόνα 4. Μηχανισμοί πρόκλησης βλάβης στο ενδοθήλιο (Lisette et al., 2014).

Οι λειτουργικές μεταβολές του μητρικού ενδοθηλίου αποδεικνύονται από τα αυξημένα επίπεδα διαφόρων δεικτών. Ο ισχαιμικός πλακούντας απελευθερώνει παράγοντες όπως οι (VEGF-1(sFlt-1), τα αυτοαντισώματα του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II(AT1-AA), οι κυτοκίνες όπως οι TNF-α και η ενδοθηλίνη-1(ET-1), τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), η φμπρονεκτίνη, η ιντερλευκίνη 6 και 8 (Calicchio et al., 2013). Αυτοί οι παράγοντες συνεργιστικά συμβάλλουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προκαλώντας ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και ιδιαίτερα των νεφρών και υπέρταση (LaMarca et al., 2012; Calicchio et al., 2013, Kahhale et al., 2018).

A4.4 ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Μια μεταβαλλόμενη ανοσοαπόκριση μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας (Saito et al., 2007). Υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι τόσο η φυσική όσο και η επίκτητη ανοσία εμπλέκονται στη παθογένεση της προεκλαμψίας (Saito et al., 2007). Η μεταβαλλόμενη μητρική ανοσοαπόκριση ή έλλειψη ανοσοανοχής της μητέρας προς το αλλογενές κατά το ήμισυ έμβρυο θα μπορούσε να εξηγήσει την ανώμαλη τροφοβλαστική διείδυση που παρατηρείται στην προεκλαμψία (Sepulveda et al., 2014).

Τα κύτταρα που έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση είναι αυτά της τροφοβλάστης. Τα μητρικά ανοσοκύτταρα αντιμετωπίζουν διαφορετικούς υποτύπους τροφοβλαστών σε πολλαπλές διεπαφές ανάλογα με την ηλικία κύησης και την ανατομική θέση. Οι διεπαφές μπορεί να αφορούν μητρικούς ιστούς αλλά και μητρικό αίμα (Redman et al., 2010).

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη θεωρείται μια ανοσολογική κατάσταση στην οποία κυριαρχούν τα κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης το 70% των λεμφοκυττάρων του φθαρτού είναι κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), το 20-25% είναι μακροφάγα και το 1,7% είναι δενδριτικά κύτταρα. Η τελική εμφύτευση του εμβρύου προϋποθέτει την ανοσοαπόκριση σε διαφορετικού τύπου ανοσοκύτταρα και μικροπεριβάλλοντα (Abrahams et al., 2005).

Υπερβολική ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων έχει διαπιστωθεί σε ασθενείς με προεκλαμψία (Laresgoiti et al., 2013). Αυτά τα μονοκύτταρα συνθέτουν μεγάλες ποσότητες προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1,IL-6,IL-8). Επιπλέον τα Τ-βοηθητικά και Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα σε συνδυασμό με τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) και τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) έχουν προφλεγμονώδη απόκριση όμοια με αυτή που παρατηρείται σε μη εγκυμονούσες γυναίκες αντί για την αντιφλεγμονώδη ανοσολογική απόκριση που θα αναμενόταν σε μια φυσιολογική εγκυμοσύνη (Laresgoiti et al., 2010; Sepulveda et al., 2014). Επιπλέον τα δενδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν μια δευτερογενή προ φλεγμονώδη απόκριση λόγω της δυσλειτουργίας των υποδοχέων toll-like (TLRs) οι οποίοι έχουν βασικό ρόλο στη πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή, αλλά και των κυττάρων NK, τα οποία παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που προάγουν την ανάπτυξη του πλακούντα (Redman et al., 2010).

Όπως αναφέρθηκε, η ομαλή πλακουντοποίηση και η διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο φθαρτό προϋποθέτει κάποια ανοσολογική αναγνώριση των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, η εμφύτευση επιφέρει συνθήκες στις οποίες τα πατρικά αντιγόνα που εμπεριέχονται στα εμβρυικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με τα μητρικά στο φθαρτό. Αυτό το στάδιο είναι αρκετά κρίσιμο για να μην απορριφθεί η τροφοβλάστη (Redman et al., 2010). Βασικό ρόλο στην αναγνώριση αυτή έχουν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HLA). Οι συγκυτιοτροφοβλάστες εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον ασυνήθιστο συνδυασμό αντιγόνων HLA-C, HLA-G και HLA-E. Επομένως η προσαρμογή του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας στα εμβρυικά αντιγόνα παίζει σημαντικό ρόλο

στην ομαλή ή μη πλακουντοποίηση και την εμφάνιση της προεκλαμψίας Το γεγονός αυτό έχει μεγαλύτερη βαρύτητα στην πρώτη κύηση όπου η γυναίκα έρχεται σε επαφή για πρώτη φορά με αυτού του είδους τα ερεθίσματα (Sibai et al., 2005).

Συμπερασματικά, οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί είναι σημαντικοί στην μητρική ανοσολογική αναγνώριση της τροφοβλάστης, η οποία θα εξασφαλίσει την ομαλή εμφύτευση και την πλακουντοποίηση. Η ανοσολογική απόκριση θα πρέπει να προσφέρει ανοσολογική μνήμη και να συνεπάγεται έναν μηχανισμό οποίος εάν αποτύχει θα οδηγήσει σε ανεπάρκεια του πλακούντα και στη κλινική εκδήλωση της διαταραχής (Redman et al., 2010).

A.4.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Η συμμετοχή της κληρονομικότητας της διαταραχής είναι εμφανής εδώ και αρκετά χρόνια από την παρατήρηση της προδιάθεσης της σε συγγενείς πρώτου βαθμού γυναικών που εμφάνισαν τη νόσο (Cooper et al., 1993). Επιπλέον, είναι εξακριβωμένη η ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού εμφάνισης στα μονοζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με τα διζυγωτικά, γεγονός που πιστοποιεί την γονιδιακή συμμετοχή (Ros et al., 2000).

Αν και η γονιδιακή συμμετοχή είναι σαφής, παραμένει αδιευκρίνιστο το γονιδιακό πρότυπο κληρονόμησης. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης προεκλαμψίας ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε γυναίκες που προήλθαν από εγκυμοσύνες με προεκλαμψία. Αυτές οι γυναίκες είχαν διπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν στην πρώτη εγκυμοσύνη τους προεκλαμψία. Επίσης γυναίκες που προήλθαν από εγκυμοσύνες με υπέρταση, διαβήτη και θρομβοφιλία είχαν αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με νορμοτασικές παρελθόντες γεννήσεις. Ωστόσο, η προεκλαμψία είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή ποικίλης κλινικής σοβαρότητας επομένως αναμένεται ότι θα περιλαμβάνει συνδυασμούς γονιδίων και όχι την κληρονόμηση μόνο ενός γονιδίου (Abimbola et al., 2017). Φαίνεται ότι ένα σύνολο γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων δρουν συνδυαστικά στην προδιάθεση της νόσου (Chelbi et al., 2008).

Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η ανάπτυξη της τροφοβλάστης προϋποθέτει και την πατρική γονιδιακή αποτύπωση, εικάζεται ότι και τα πατρικά γονίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο (Dekker et al., 2011).

Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από δέκα γονίδια των οποίων η έκφραση και το επίπεδο μεθυλίωσης μεταβάλλεται σημαντικά στον ιστό του πλακούντα ασθενών με προεκλαμψία (Yan et al., 2013). Τα περισσότερα από αυτά συσχετίζονται με την

ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την πλακουντοποίηση, την αγγειακή αναδιαμόρφωση και τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων (Chappel et al., 2006; Park et al., 2015).

A4.6. ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ (RAAS)

Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ομοιοστατικούς ρυθμιστές αρτηριακής πίεσης και ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών (Sparks et al., 2014).

Τα πρωτογενή συστατικά του συστήματος τα οποία πραγματοποιούν τις ενζυμικές αντιδράσεις είναι: η ρενίνη, το αγγειοτενσινογόνο (AGT), το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE), η αγγειοτενσίνη I (ANG I), η αγγειοτενσίνη II (Ang II), ο υποδοχέας αγγειοτενσίνης τύπου I (AT1R) και ο υποδοχέας αγγειοτενσίνης τύπου 2 (AT2R) (Yang et al., 2013).

Εκτός από την κλασσική εντόπιση του συστήματος RAS στο νεφρό υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι όλα τα συστατικά του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης συντίθενται σε πολλούς ιστούς όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι ωοθήκες και ο πλακούντας (Spark et al., 2014). Επομένως, σε μία έγκυο γυναίκα ο μητροπλακουντιακός ιστός παρέχει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τη λειτουργικότητα του συστήματος. Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης τα συστατικά του συστήματος εκφράζονται μέσα και γύρω από τις σπειροειδείς αρτηρίες και συμβάλλουν στην αναδημιουργία των αγγείων που δημιουργούνται στην εγκυμοσύνη (Van Thiel et al., 2015). Το μητροπλακουντιακό σύστημα RAS επηρεάζει τη ρύθμιση της ροής αίματος της μητέρα και βοηθά στη τοπική αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας (Herse et al., 2007).

Σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση όλων των συστατικών του συστήματος (Irani et al., 2008). Αντιθέτως, σε διαταραχές εγκυμοσύνης όπως η προεκλαμψία, παρατηρείται μια απώλεια της ισορροπίας τους η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ισχαιμία του πλακούντα, υπέρταση και ανικανότητα αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών (Irani et al., 2008, Shah 2005).

A4.6.1 ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗ

Η κύρια βιολογικά δραστική ορμόνη που παράγεται από το σύστημα είναι η αγγειοτενσίνη II (Ang). Η αγγειοτενσίνη II παράγεται με διαδοχική διάσπαση πεπτιδίων προερχόμενων από το μόριο υποστρώματος της αγγειοτενσίνης το Agt (αγγειοτενσινογόνο). Δεσμεύεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς προκαλώντας ένα ευρύ

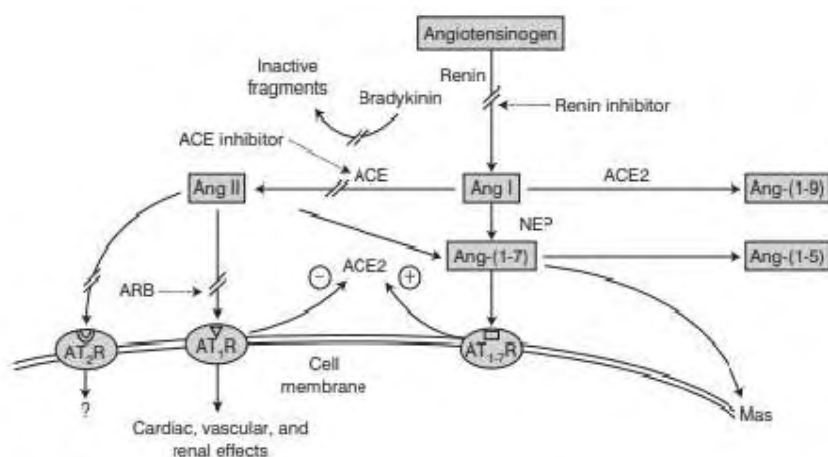
φάσμα βιολογικών αντιδράσεων που επηρεάζουν κάθε βιολογικό σύστημα στο σώμα συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της καρδιάς, των νεφρών, των αγγείων και του ανοσοποιητικού συστήματος (Sparks et al., 2015).

Σε αγγειακό επίπεδο, αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή διατήρησης της ισορροπίας της αρτηριακής πίεσης και την ομοιοστάσης των ηλεκτρολυτών των νεφρών (Engeli et al., 2000) και σε παρακρινικό επίπεδο εμπλέκεται στη ρύθμιση περιφερειακής αιμάτωσης και αναδιαμόρφωση ιστού, στη ρύθμιση νευροδιαβιβαστών και στην μεταφορά ιόντων (Komlosi et al., 2003). Εν τούτοις, οι βασικές φυσιολογικές δράσεις της αγγιοτενσίνης II αποσκοπούν στη προφύλαξη των οργανισμών από την απώλεια υγρών και την επαρκή αιμάτωση των ζωτικών οργάνων (Robertson et al., 2000).

Οι συγκεντρώσεις της αγγιοτενσίνης II στο πλάσμα του αίματος παρουσιάζουν αύξηση σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες και μείωση στη προεκλαμψία, κυρίως λόγω μείωσης του ενεργού οκταπεπτιδίου αγγιοτενσίνης (Langer et al., 1998). Οι υγιείς έγκυες γυναίκες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις αγγειοκινητικές επιδράσεις της ANGII (Irani et al., 2011). Αυτή η ανθεκτικότητα είναι πιθανό να οφείλεται στην παρουσία αυξημένης προγεστερόνης και προστακυκλίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Επομένως οι φυσιολογικές έγκυες παρουσιάζουν μια αγγειακή μη ευαισθησία στη διέγερση ANGII. Αντιθέτως ο προεκλαμπτικές γυναίκες εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία ANGII στον φλοιό των επινεφριδίων και στο αγγειακό σύστημα (Gant et al., 1980).

A4.6.2 PENINH

Η σύνθεση της αγγιοτενσίνης II εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δραστηριότητα της ρενίνης του πλάσματος. Η ρενίνη είναι μια υψηλής ειδικότητας ενδοπεπτιδάση, η οποία παράγεται από τα επιθηλιοειδή κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής και είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την διάσπαση του αγγιοτενσινογόνου στο δεκαπεπτίδιο που ονομάζεται αγγιοτενσίνη I, η οποία με τη σειρά της διασπάται σε οκταπεπτίδιο, την αγγιοτενσίνη II (Εικόνα 5). Η ρενίνη απελευθερώνεται από το νεφρό στη κυκλοφορία σε απάντηση της μειωμένης νεφρικής αιμάτωσης (Ferrario et al, 2006). Η προεκλαμψία διακρίνεται από μια χαμηλή σε ρενίνη υπερτασική κατάσταση σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη (Santillan et al., 2014). Δεδομένου ότι η κύρια πηγή δραστηρικής ρενίνης είναι το νεφρό η χαμηλή συγκέντρωση υποδεικνύει μια μειωμένη νεφρική σύνθεση και ανικανότητα σύνθεσης ενεργής μορφής ρενίνης που εμφανίζεται στην προεκλαμψία.



Εικόνα 5. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης με τους υποδοχείς του (Ferrario et al., 2006)

Η πρώτη παρατήρηση ότι η ρενίνη αυτή καθαυτή είναι υπεύθυνη για την βλάβη των ιστών προήλθε από τα πειράματα του Luetscher και των συνεργατών του το 1985, οι οποίοι ανέφεραν ότι τα επίπεδα της «μη δραστικής ρενίνης» δηλαδή της προρενίνης αποτελούν δείκτη προσβολής των αγγείων και μάλιστα ότι η αύξηση των επιπέδων στον ορό προηγείται των παθολογανατομικών αλλοιώσεων (Luetscher et al., 1985). Πλέον το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αποσαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο η ρενίνη και η προρενίνη προκαλούν βλάβη των αγγείων χωρίς να εμπλέκονται στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

A4.6.3 ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΟΓΟΝΟ

Το αγγειοτενσινογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που απελευθερώνεται από το νεφρό και τους ιστούς κοντά στο πειραματικό σωληνάριο και αντιπροσωπεύει το σημείο εκκίνησης του συστήματος RAAS. Αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Wu et al., 2011).

Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) διασπά ένα πεπτίδιο 10 αμινοξέων από το N-τελικό άκρο της αγγειοτενσίνης I (Ang I), το οποίο ακολούθως διασπάται από το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE) για να σχηματίσει αγγειοτενσίνη Ang II, το κύριο βιολογικά ενεργό πεπτίδιο που παράγεται από το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης (Wu et al. 2011).

Σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες η συγκέντρωση του αγγειοτενσινογόνου του πλάσματος αυξάνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 20 εβδομάδων, πιθανώς λόγω της αυξημένης σύνθεσης οιστρογόνου και στη συνέχεια παραμένει σταθερό. Παρότι το υψηλό μοριακό του βάρος αποτελεί μόνο το 3-6% του πλάσματος, αυτό αυξάνεται σε 15% κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, πιθανώς λόγω συνεισφορών από το χόριο και το φθαρτό (Brown et al., 1997). Η συγκέντρωση του αγγειοτενσινογόνου όπως και των περισσότερων συστατικών του συστήματος RAS παρουσιάζει χαρακτηριστική μείωση στις περιπτώσεις προεκλαμψίας (Yilmaz et al., 2014).

Σε προεκλαμπτικές γυναίκες, τα επίπεδα αγγειοτενσινογόνου που μετρήθηκαν στα ούρα φαίνεται να συνδέονται με τα επίπεδα συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης και την απέκκριση πρωτεϊνών ενώ σε φυσιολογικές κήσεις η αύξηση των επιπέδων AGT δεν συσχετίζεται με αύξηση των επιπέδων της πίεσης.

A4.6.4 ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ

Η αλδοστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη που παράγεται από τον φλοιό των επινεφριδίων. Η αλδοστερόνη δρα στο νεφρό μειώνοντας την ποσότητα νατρίου που απεκκρίνεται στα ούρα, Η παραγωγή αλδοστερόνης διεγείρεται κυρίως με τη δράση της αγγειοτενσίνης.

Η συγκέντρωση της αλδοστερόνης αυξάνεται πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης ενώ σε προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες η συγκέντρωση αλδοστερόνης είναι σημαντικά μειωμένη. Τα επίπεδα αλδοστερόνης αυξάνονται ως επί το πλείστον για να συμβάλλουν στη συγκράτηση του νατρίου και στην προκύπτουσα κατακράτηση νερού που απαιτείται για την αύξηση του όγκου κατά την εγκυμοσύνη.

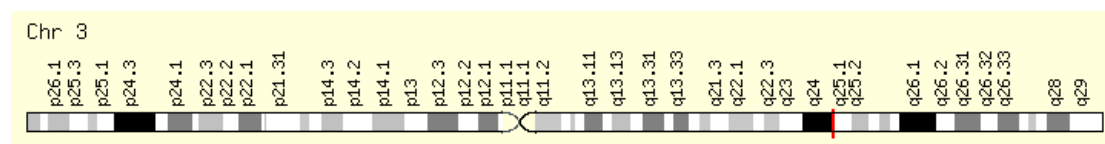
Σε ασθενείς με προεκλαμψία έχει παρατηρηθεί ότι η αλδοστερόνη καταστέλλεται παρά την συγκράτηση του ενδοαγγειακού πλασματικού όγκου, επίσης παρατηρήθηκε ότι το επίπεδο αλδοστερόνης είναι σχετικά αυξημένο για το αντίστοιχο επίπεδο ρενίνης (Symond et al., 1975; Escher et al., 2007). Πολλοί ερευνητές υποθέτουν ότι υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα αλδοστερόνης στις γυναίκες με προεκλαμψία που οδηγεί σε μείωση του κυκλοφορούντος ενδοαγγειακού όγκου του πλάσματος. Συνεπώς εικάζεται ότι η ελάττωση του ενδοαγγειακού πλασματικού όγκου οδηγεί σε μειωμένη διάχυση του πλακούντα με επακόλουθη ισχαιμία και συστημική υπερτασική απόκριση (Escher et al., 2007). Η μειωμένη διαθεσιμότητα αλδοστερόνης στη προεκλαμψία έχει συσχετιστεί με πολυμορφισμούς που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου CYP11B2 (Escher et al., 2007).

A4.6.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ AT1 ΚΑΙ AT2

Η αγγειοτενσίνη II επιδρά με τουλάχιστον δύο υποδοχείς, τους AT1 και AT2 (AT1R, AT2R). Οι μελέτες έχουν εστιαστεί κυρίως στους AT1 υποδοχείς επειδή οι κυριότερες δράσεις της αγγειοτενσίνης II πραγματοποιούνται μέσω αυτών.

Οι AT1 και AT2 υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων GPCRs (G-protein-coupled-receptors), που σημαίνει ότι για να πυροδοτήσουν τα σηματοδοτικά μηνύματα είναι απαραίτητο να ενωθούν με μία μικρή G-πρωτεΐνη. Πλήθος πειραματικών δεδομένων υποστηρίζει ότι η δράση των AT1 και AT2 είναι ανταγωνιστική (Nakajima et al., 1995; Rahimi et al., 2014). Οι μεν AT1 υποδοχείς προάγουν την αγγειοσύσπαση και την υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ οι δε AT2 είναι αγγειοδιασταλτικοί και ευνοούν την απόπτωση (Daviet et al., 2001).

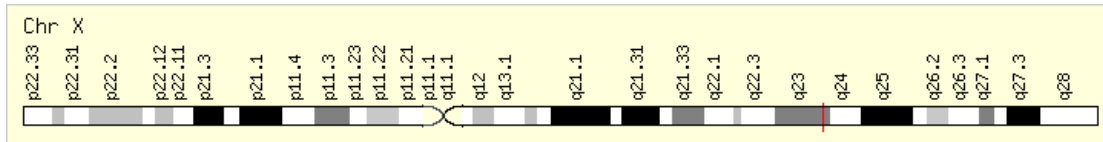
Ο υποδοχέας αγγειοτενσίνης τύπου I, AT1R έχει ευρεία κατανομή στο σώμα, η σύνδεση της αγγειοτενσίνης με τον υποδοχέα AT1 έχει σαν αποτέλεσμα την αγγειοσύσπαση, την απελευθέρωση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια, την κατακράτηση νατρίου και νερού και την αγγειακή αναδιαμόρφωση (Ferrario et al., 2006). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης τύπου I εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 3 στη θέση 24(3q24) (Rahimi et al., 2014) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Γονιδιακή θέση του AT1R (χρωμόσωμα 3, μακρύς βραχίονας (q), θέση 24) (genecards.org).

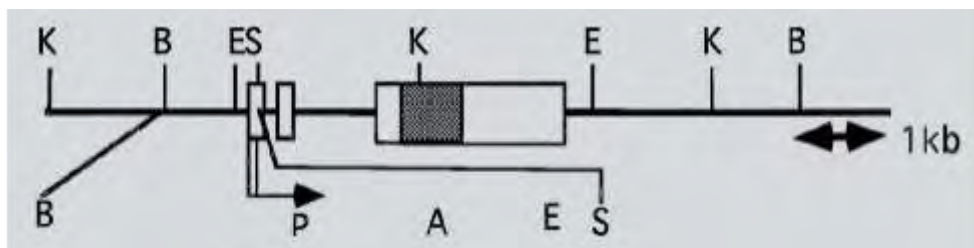
Η ενεργοποίηση των υποδοχέων AT1 αυξάνει επίσης το οξειδωτικό στρες και τα επίπεδα του παράγοντα μετατροπής (TGFβ). Όλα τα παραπάνω συνεισφέρουν στη δημιουργία ενός αθηροσκληρυντικού και προθρομβωτικού περιβάλλοντος (Ferrario et al., 2006).

Ο τρόπος δράσης των AT2 υποδοχέων είναι λιγότερο κατανοητός. Το γονίδιο των υποδοχέων τύπου 2 της αγγειοτενσίνης (AT2) βρίσκεται στο χρωμόσωμα X και, συγκεκριμένα, στη θέση Xq23 (Erdmann et al., 2000) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Γονιδιακή θέση AT2R (χρωμόσωμα X, μακρύς βραχίονας (q), θέση 23). (genecards.org).

Όπως γίνεται κατανοητό, οι γυναίκες διαθέτουν δύο γονίδια ενώ οι άνδρες μόνο το ένα (φυλοσύνδετα γονίδια). Η δομή του γονιδίου, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και ο επαγωγέας του έχουν δοθεί το 1995 από τους Martin και Elton (Martin and Elton 1995) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Η δομή του γονιδίου των υποδοχέων τύπου @ της αγγειοτενσίνηςII.

Φαίνονται τα τρία εξόνια και τα δύο ιντρόνια, καθώς και η περιοχή που αποκωδικοποιεί τον υποδοχέα (Γκρίζα περιοχή στο τρίτο εξόνιο) (Ichiki et al., 1995)

Το μέγεθος του γονιδίου είναι 5 kb και περιλαμβάνει δύο ιντρόνια (152 bp και 1207 bp), δύο μικρά εξόνια (68 bp και 95 bp) και ένα μεγάλο εξόνιο (>2.300 bp) (εικ. 2). Η περιοχή που αποκωδικοποιεί τον υποδοχέα βρίσκεται αποκλειστικά στο τρίτο εξόνιο και δεν διακόπτεται από κάποιο ιντρόνιο. Περιοχές που ρυθμίζουν τη μεταγραφή, εκτός από την περιοχή του επαγωγέα, έχουν βρεθεί και στο πρώτο ιντρόνιο, καθώς και στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (Warnecke et al., 1999). (Rahimi et al., 2014) (Εικόνα).

Η λειτουργία τους φαίνεται να ασκεί δράση στον καρδιαγγειακό ιστό αντίθετη από αυτή του AT1 υποδοχέα. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στις αθηροσκληρυντικές πλάκες και η ενεργοποίησή τους ίσως έχει κάποια ωφέλιμα αποτελέσματα. Οι υποδοχείς AT2 αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μεσολαβούν στην απόπτωση λειτουργώντας προστατευτικά προς τους AT1 υποδοχείς (Alfakih et al., 2005). Πειραματικές μελέτες υποθέτουν ότι η διέγερση των AT2 υποδοχέων έχει κάποιες αθηρογενετικές δράσεις όπως η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, η ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB μετάδοσης σημάτων και η αύξηση των χημειοκινών (Yamada et al., 1998). Είναι λογικό ότι η σύνδεση της αγγειοτενσίνης

στους υποδοχείς προκαλεί τα αντίθετα αποτελέσματα. Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η έλλειψη των υποδοχέων AT2 συνδέεται με παρατεταμένη παρουσία φλεγμονωδών και λείων μυϊκών κυττάρων (Sales et al., 2005). Παράλληλα, η έκθεση στην αγγειοτενσίνη μείωσε την περιαγγειακή και καρδιακή ίνωση σε ζώα που είχαν υπεραυξημένη έκφραση των υποδοχέων AT2. Η ωφέλιμη δραστηριότητα των υποδοχέων AT2 σχετίζεται με τη διέγερση του συστήματος καλδικρεΐνης-κινίνης το οποίο δρα στη ρύθμιση του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης (Sales et al., 2005).

Έχει διαπιστωθεί ότι οι υποδοχείς της αγγειοτενσίνης σε πολλές περιπτώσεις δεν δρουν ως μονομερή αλλά ως ετεροδιμερή. Στην προεκλαμψία παρατηρείται διαμερισμός των υποδοχέων σε αντίθεση με φυσιολογικές εγκυμοσύνες που οι υποδοχείς είναι μονομερείς (Iraní et al., 2012). Οι AT1 σχηματίζουν διμερή με το σταθεροποιητικό της παράγοντα της θρομβίνης XIIIa γεγονός που φαίνεται να παίζει ρόλο στην έναρξη της αθηρωματικής διαδικασίας (AbdAlla et al., 2004). Οι υποδοχείς AT1 σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές με την βραδυκινίνη (B2) και αυτά τα ετεροδιμερή AT1/B2 είναι ανθεκτικά στην απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS, αυξάνουν την παραγωγή οξειδίου του αζώτου NO και παρουσιάζουν υπερευαισθησία στην αγγειοτενσίνη II (AbdAlla et al., 2001). Τα διμερή των AT2 αποτελούν ερέθισμα της αποπτωτικής διεργασίας και η ένωση των ετεροδιμερών των AT1 και AT2 φαίνεται ότι είναι αυτή που αναστέλλει τη δράση των AT1 (AbdAlla et al., 2001).

Όπως αναφέρθηκε, η κλασσική άποψη για τη σημασία των AT2 υποδοχέων είναι ότι ανταγωνίζονται τη διεγερτική επίδραση των AT1 στην υπερτροφία και υπερπλασία των ιστών (Nakajima et al., 1995). Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι η δυναμική ισορροπία των δύο υποδοχέων και ο συγκερασμός της πυροδοτικής δράσης της σηματοδοτικής οδού των AT1 και της ανασταλτικής δράσης της σηματοδοτικής οδού των AT2 είναι αυτή που οδηγεί στην λειτουργικότητα της αγγειοτενσίνης II στην αρτηριακή πίεση, την καρδιακή υπερτροφία και στην υπερτροφία των λείων μυϊκών (Nakajima et al., 1995).

A4.7. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΥΠΟΥ-1 ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ II

Οι γυναίκες με προεκλαμψία παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στις επιδράσεις της αγγειοτενσίνης II σε αντίθεση με τη μειωμένη απόκριση των φυσιολογικών εγκύων, η διαφοροποίηση αυτή είναι δυνατόν να εντοπιστεί στις 24 εβδομάδες κύησης (Gant et al., 1974). Παράλληλα, τα επίπεδα αγγειοτενσίνης παρουσιάζουν μειωμένη συγκέντρωση σε σχέση με αυτά που αναμένονται σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Gant

et al., 1980). Σε αυτή τη περίπτωση οι προεκλαμπτικές γυναίκες εμφανίζουν συμπτώματα που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε αυξημένη ενεργοποίηση του υποδοχέα AT1, όπως η υπέρταση και η νεφρική δυσλειτουργία (Iraní et al., 2012). Το 1999 ο Wallukat και οι συνεργάτες του, έκαναν λόγο για τα αυτοαντισώματα που διεγείρουν τον υποδοχέα AT1 στις προεκλαμπτικές γυναίκες (AT1-AA). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν την αυξημένη συγκέντρωση AT1-AA σε προεκλαμπτικές γυναίκες σε σχέση με φυσιολογικές εγκυμονούσες (Iraní et al., 2012).

Τα AT1-AA είναι αντισώματα που ενεργοποιούν τον υποδοχέα AT1 όπως η αγγειοτενσίνη II. Είναι πιθανό ότι μέσω της υπερβολικής ενεργοποίησης του υποδοχέα AT1 που προκαλεί το αυτοαντίσωμα (AT1-AA), θα μπορούσε να προκαλέσει αυτού του είδους τα συμπτώματα στις προεκλαμπτικές γυναίκες, υποδεικνύοντας τον σημαντικό του ρόλο στην εμφάνιση της προεκλαμψίας (Iraní et al., 2012). Έχει διαπιστωθεί ότι αυτού του είδους τα αυτοαντισώματα θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και σε αγγειακές βλάβες (Roberts et al., 1998). Επιπρόσθετα, τα αυτοαντισώματα μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή προϊόντων που σχετίζονται με την προεκλαμψία όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ROS, οξειδάση NADPH, ενδοκυτταρικό ασβέστιο και τον πυρηνικό παράγοντα κB, έκκριση sFLT1 και ενδοθηλίνης-1, αύξηση του παράγοντα TF στα αγγειακά κύτταρα λείων μυϊκών ινών (Iraní et al., 2012; Xia et al., 2013).

Επίσης μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυξάνουν τον αναστολέα ενεργοποίησης πλασμινογόνου (PAI-1) σε κύτταρα τροφοβλάστης (Xia et al., 2003). Η ελαστικότητα των τροφοβλαστών μειώνεται κατά την δράση των AT1-AA (Zhou et al., 2007). Ο παράγοντας PAI-1 έχει διαπιστωθεί ότι υπερεκφράζεται σε προεκλαμπτικούς πλακούντες οδηγώντας σε μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα (Xia et al., 2007).

Συνολικά τα δεδομένα δείχνουν υπερενεργοποίηση του AT1 υποδοχέα από τα αυτοαντισώματα που μπορεί να συμβάλει στη κλινική εκδήλωση της προεκλαμψίας. Η ακριβής αιτία εμφάνισης δεν έχει αναγνωριστεί ωστόσο, έχουν προταθεί πολλοί παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στη παραγωγή αυτοαντισωμάτων συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών αποκρίσεων, της γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικών παραγόντων (Pearce et al., 2006; Dechend et al., 2009).

Οι AT1-AA παράγονται από τα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα CD19 και CD5 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή AT1-AA και εμφανίζονται μόνο σε

προεκλαμπτικούς πλακούντες και όχι σε φυσιολογικούς και μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και 18 μήνες μετά τον τοκετό (Herse et al., 2012).

Η σημασία της αναγνώρισης της δράσης των αυτοαντισωμάτων AT1-AA έγκειται στο γεγονός ότι αν εντοπιστούν νωρίς στην εγκυμοσύνη και χορηγηθούν τα αντίστοιχα φάρμακα που θα μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του υποδοχέα AT1 τότε τα προεκλαμπτικά συμπτώματα μπορεί να ελαττωθούν η και να εξαφανιστούν, μειώνοντας τον κίνδυνο για τις μητέρες και τα νεογνά (Iraní et al., 2012).

A5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ-ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες έρευνες που προτείνουν ειδικούς διαγνωστικούς δείκτες και σχετίζονται με την πορεία και την εξέλιξη της νόσου. Σκοπός των μελετών είναι εντοπιστούν οι δείκτες που θα μπορούν να προσδιορίσουν τον αυξημένο κίνδυνο των γυναικών πριν εμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα, καθώς και να είναι ικανοί να διαχωρίσουν την προεκλαμψία από τις άλλες υπερτασικές καταστάσεις κήσεως (Tjoa et al., 2004; Jaddi et al., 2015). Έχουν προταθεί διάφοροι κλινικοί, βιοχημικοί και γενετικοί δείκτες οι οποίοι σχετίζονται κυρίως με τις παθοφυσιολογικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στη προεκλαμψία όπως η δυσλειτουργία του πλακούντα, του ενδοθηλίου και του μηχανισμού πήξης.

A5.1. ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΙ-ΚΛΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι βασικότεροι κλινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στην προεκλαμψία είναι η μέτρηση της πίεσης και το υπερηχογράφημα μητριάων αρτηριών Doppler.

Αν και η υπέρταση είναι ένα δευτερεύον σημάδι της προεκλαμψίας είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης καθώς μπορεί να διαπιστωθεί στην αρχή της νόσου. Υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης μπορεί να παρατηρηθεί κατά το πρώτο και το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Poon et al., 2014). Η εκτίμηση της μέσης τιμής της αρτηριακής πίεσης που θα προκύπτει από συνεχείς μετρήσεις συμπεριλαμβανομένων των μητρικών παραγόντων όπως το κάπνισμα, η ηλικία, το βάρος, η φυλή, το προηγούμενο ιστορικό και οι συνήθειες της μητέρας θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ισχυρό δείκτη για πρόγνωση προεκλαμψία κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου (Poon et al., 2014).

Μια χρήσιμη μέθοδος για τον εντοπισμό των γυναικών που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας είναι η Doppler υπερηχογραφία των μητριάων αρτηριών. Η προεκλαμψία όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από μη ικανοποιητική

τροφοβλαστική διείσδυση στις σπειροειδείς αρτηρίες με αποτέλεσμα την αυξημένη μητροπλακουντιακή αντίσταση που οδηγεί σε ισχαιμία του πλακούντα. Η αυξημένη αντίσταση στη ροή του αίματος στις μητριάιες αρτηρίες μπορεί να προσδιοριστεί στην 20^η-25^η εβδομάδα κύησης και μπορεί να εντοπίσει περίπου το 45% των κυήσεων που θα εμφανίσουν προεκλαμψία. Κυήσεις με παθολογικά ευρήματα στο Doppler κατά το δεύτερο τρίμηνο έχουν έξι φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για προεκλαμψία (Papageorgiou et al., 2005; Yu et al., 2005). Σε μελέτη τους η Poon και οι συνεργάτες της, διαπίστωσαν ότι η αποτελεσματική διάγνωση της πρώιμης προεκλαμψίας κατά το πρώτο τρίμηνο, μπορεί να έχει ποσοστό πρόβλεψης 95% με ψευδώς θετικά αποτελέσματα 10%, αν ληφθεί υπόψιν ο συνδυασμός των μητρικών παραγόντων, της μέσης αρτηριακής πίεσης, του υπερηχογραφήματος Doppler και δύο βιοχημικών δεικτών PAPP-A και PIGFs (Poon et al., 2014).

A5.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός βιοχημικών δεικτών που θα μπορούσε να συμβάλει στην έγκαιρη διάγνωση της προεκλαμψίας. Οι δύο βιοχημικοί δείκτες που έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα είναι η πρωτεΐνη πλάσματος PAPP-A και ο αγγειογενετικός παράγοντας PIGF. Οι δύο αυτοί παράγοντες μπορούν να μετρηθούν εύκολα κατά της διάρκεια κύησης και παρέχουν αποτελέσματα εντός 30-40 λεπτών (Wright et al., 2014; Poon et al., 2014).

A5.2.1 PAPP-A

Η PAPP-A είναι μια μεταλλοπρωτεϊνάση η οποία παράγεται από τα αναπτυσσόμενα τροφοβλαστικά κύτταρα και έχει βασικό ρόλο στην αύξηση του πλακούντα και του εμβρύου (Lawrence et al., 1999). Η PAPP-A ενισχύει την μιτογόνο δράση των αυξητικών παραγόντων τύπου ινσουλίνης (Insulin-like Growth Factors (IGFs)) ενισχύοντας την βιοδιαθεσιμότητα τους (Lawrence et al., 1999). Οι IGFs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του πλακούντα, γι' αυτό το λόγο η διαφοροποίηση στη λειτουργικότητα τους συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις κύησης όπως οι αποβολές, η υπέρταση, η προεκλαμψία, η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης και ο θάνατος του εμβρύου (Yliniemi et al., 2015). Σε χρωμοσωμικά φυσιολογικές κυήσεις έχει αποδειχθεί ότι χαμηλή συγκέντρωση PAPP-A στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο κύησης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη προεκλαμψίας (Pilalis et al. 2007; Poon et al., 2010). Ωστόσο, τα επίπεδα PAPP-A δεν

μπορούν να αποτελέσουν τη βασική μέθοδο διάγνωσης της προεκλαμψίας χωρίς τη συμβολή κάποιου άλλου δείκτη. Σε συνδυασμό με το υπερηχογράφημα Doppler μητριάων αρτηριών, η PAPP-A μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοχημικό δείκτη με ποσοστό πρόβλεψης 70% και ψευδώς θετικά αποτελέσματα 5% (Anderson et al., 2012).

A5.2.2 PIGFs

Ο PIGF (Placental Growth Factor) είναι αγγειογενετικός που συντίθεται στην τροφοβλάστη. Οι αγγειογενετικές του ικανότητες φαίνεται να έχουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της προεκλαμψίας (Poop et al., 2014). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η μείωση των επιπέδων PIGF στο πλάσμα του αίματος κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης συνδέεται με την εμφάνιση της προεκλαμψίας και ιδιαίτερως της πρώιμης προεκλαμψίας (Tsiakkas et al., 2015). Σε τελευταίες μελέτες, οι ερευνητές επιχείρησαν να διευκρινίσουν την προγνωστική αξία του PIGF σε συνδυασμό με μητρικούς παράγοντες και διαπιστώθηκε ότι η μέτρηση του PIGF κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου μπορεί να συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση της προεκλαμψίας (Tsiakkas et al., 2015).

sFlt-1

Σε φυσιολογική εγκυμοσύνη τα επίπεδα sFlt-1 (διαλυτή FMS-like κινάση της τυροσίνης) είναι σχετικά χαμηλά ενώ 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 PIGF είναι χαμηλά λόγω της πρόσδεσης στον sFLT-1 (Rana et al., 2014).

sFlt-1 / PIGF

Ο προσδιορισμός των δεικτών των βιολογικών δεικτών sFlt-1 και PIGF στο μητρικό αίμα έχει δείξει ότι βελτιώνει σημαντικά την διαστρωμάτωση του κινδύνου σε γυναίκες που κινδυνεύουν να αναπτύξουν προεκλαμψία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η μέτρηση του λόγου sFlt-1 / PIGF στα μέσα περίπου της εγκυμοσύνης, φαίνεται να έχει

μεγαλύτερη διαγνωστική αξία από ότι καθένας από τους βιοδείκτες μεμονωμένα (Verlohren et al., 2010). Αυτό συμβαίνει γιατί ο λόγος sFlt-1 / PlGF μπορεί να διακρίνει τις γυναίκες που θα αναπτύξουν προεκλαμψία σε σχέση με αυτές που πάσχουν από χρόνια υπέρταση ή υπέρταση κύησης. Οι γυναίκες με προεκλαμψία έχουν σημαντικά υψηλότερο λόγο σε σχέση με τις υπόλοιπες υπερτασικές διαταραχές (Verlohren et al., 2012; Rana et al., 2012). Ο συνδυασμός της αναλογίας sFlt-1/PlGF 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). Η προσθήκη της μέτρησης του δείκτη μάζας σώματος πριν την εγκυμοσύνη και της PAPP-A κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία της πρόβλεψης της προεκλαμψίας σε έναν πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (Park et al., 2014). Τα επίπεδα στον ορό του sFlt-1 είναι άμεσα συνδεδεμένα με τη βαρύτητα της νόσου επομένως η αναλογία sFlt-1/PlGF 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; Leañes et al., 2013).

Παράλληλα με την μέτρηση του παραπάνω λόγου sFlt-1/PlGF, η μέτρηση της διαλυτής ενδογλίνης (sEng) θα μπορούσε να αυξήσει την προγνωστική αξία. Η Seng εντοπίζεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με προεκλαμψία αρκετές εβδομάδες πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων (Verlohren et al., 2014).

Επομένως η μέτρηση του λόγου sFlt-1/PlGF στο δεύτερο τρίμηνο κύησης είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο σε γυναίκες με υποψία προεκλαμψίας, που απαιτούν στενότερη παρακολούθηση και η προσθήκη του στην τυπική διαγνωστική διαδικασία βελτιώνει τη διαστρωμάτωση του κινδύνου με σημαντική μείωση της ψευδώς θετικής και ψευδώς αρνητικής διάγνωσης (Hund et al., 2014).

ΆΛΛΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ολοένα και περισσότεροι δείκτες ερευνώνται για την αξία που μπορεί να έχουν στη πρόωμη διάγνωση της προεκλαμψίας.

Παραδείγματος χάριν η εμβρυική αιμοσφαιρίνη (HbF), η οποία αποδεδειγμένα συμβάλλει στη παθογένεση της διαταραχής (Anderson et al., 2012) θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πρόδρομο βιοχημικό δείκτη δεδομένου ότι είναι σημαντικά αυξημένη στο μητρικό αίμα κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Anderson et al., 2012).

Ένας ακόμη δείκτης με αμφίβολη προγνωστική αξία είναι το ελεύθερο εμβρυικό DNA (cf-DNA) του οποίου η συγκέντρωση είναι πενταπλάσια σε προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες σε σχέση με φυσιολογικές (Grill et al., 2009). Το cfDNA έχει δείξει κάποια προγνωστική αξία για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας πρώιμης έναρξης ωστόσο, συνδυάζοντας το με αρκετούς δείκτες θα μπορούσε να αυξηθεί ακόμα περισσότερο η ειδικότητα και η ευαισθησία του (Grill, et al. 2009).

Ένας άλλος πιθανός δείκτης θα μπορούσε να είναι η κυστατίνης C η οποία είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης και αποτελεί δείκτη για τη νεφρική ανεπάρκεια και τη πειραματική διήθηση. Οι μελέτες που εξετάζουν την αξία της κυστατίνης C στη προεκλαμψία αποδεικνύουν ότι τα αυξημένα επίπεδα της σε γυναίκες με προεκλαμψία θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν αξιόπιστο δείκτη πρώτου τριμήνου (Anderson et al., 2012). Ωστόσο, η μεμονωμένη χρήση αυτού του δείκτη δεν είναι εφαρμόσιμη και απαιτείται η αξιολόγηση επιπρόσθετων δεικτών για την επιβεβαίωση της διάγνωσης (Thilaganathan et al., 2010).

Έχουν μελετηθεί κατά καιρούς πολυάριθμοι δείκτες οι οποίοι συμβάλλουν στη παθογένεση της προεκλαμψίας και έχουν οι συγκεντρώσεις τους έχουν αποδειχθεί διαφοροποιημένες σε σχέση με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες όπως η βισφατίνη, το μόριο Coreptin, το μόριο PTX 3, η πρωτεΐνη PP13, όμως κανένας από αυτούς δεν έχει αποδειχθεί επαρκής και ακριβής για να εφαρμοστεί κλινικά στη πρώιμη διάγνωση της νόσου (Grill et al., 2009; Zulfikaroglu et al., 2011; Manisha et al., 2014; Sahai et al., 2017).

A5.3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της προεκλαμψίας καθώς και οι κλινικές της εκδηλώσεις αποδεικνύουν ότι είναι μια πολυσυστηματική και πολυπαραγοντική διαταραχή. Όπως προαναφέρθηκε, είναι προφανές ότι υπάρχει μια γενετική συσχέτιση πολυγονιδιακής κληρονομικότητας στο υπόβαθρο της προεκλαμψίας. Πολλά γονίδια και πολυμορφισμοί έχουν εξετασθεί για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση με την διαταραχή. Συνήθως τα γονίδια που μελετώνται είναι γονίδια που εμπλέκονται στα διάφορα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και τις μεταβολικές διαδικασίες (Velenzuela et al., 2012; Park et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί και στα MicroRNAs (miRs, miRNAs) τα οποία μελετώνται ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους ως βιοδείκτες με πολύ ενθαρρυντικά ευρήματα (Dong-bao Chen et al., 2013; Yoffe et al., 2018).

A5.3.1 miRNAs

Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικοποιούμενα RNAs με μήκος 22 νουκλεοτιδίων, τα οποία ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση διευκολύνοντας την αποδόμηση του mRNA ή αναστέλλοντας τη πρωτεϊνική μετάφραση (He et al., 2004). Ο ρόλος των microRNAs έχει ερευνηθεί σε πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι νευρολογικές διαταραχές και τα καρδιαγγειακά προβλήματα (Shen et al., 2009; Guay et al., 2011; Esteller et al., 2011). Αυτές οι μελέτες ενισχύουν την υπόθεση ότι αυτές οι μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες έχουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία των ασθενειών (Esteller et al., 2011).

Στην προεκλαμψία τα miRNAs που ερευνώνται, σχετίζονται με την διαδικασία της πλακουντοποίησης, την φλεγμονώδη απόκριση, την αγγειογένεση, την υποξία, τη ρύθμιση αρτηριακής πίεσης και την κυτταρική απόπτωση (Morales et al., 2011). Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί τουλάχιστον 500 διαφορετικά είδη miRNAs που εκφράζονται στον πλακούντα και στις τροφοβλάστες, όμως η βιολογική σημασία των περισσότερων από αυτά είναι άγνωστη (Mouillet, et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια πολυάριθμα microRNAs και με διαφορετικό πρότυπο έκφρασης έχουν βρεθεί σε δείγματα πλακούντα προεκλαμπτικών γυναικών σε σχέση με φυσιολογικούς πλακούντες γεγονός που ανέδειξε τη δυνατότητα χρήσης τους ως πιθανοί δείκτες (Pillar et al., 2015).

Έχουν εντοπιστεί miRNAs στο μητρικό αίμα κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο κύησης τα οποία σχετίζονται με τον προεκλαμπτικό κίνδυνο (Gunel et al., 2011). Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε η εσφαλμένη ρύθμιση miRNAs σε πλακούντα γυναικών με σοβαρή προεκλαμψία (Gormley et al., 2017). Επιπλέον το U1 snRNA βρέθηκε ότι συσχετίζεται με φλεγμονή προκαλώντας την απελευθέρωση φλεγμονώδους κυτοκίνης (Bernard et al., 2012). Δύο τύποι tRNA βρέθηκε ότι αναστέλλουν την αγγειογένεση ρυθμίζοντας την λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και η εσφαλμένη ρύθμιση των tRNAs και snRNAs ανιχνεύθηκε σε κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν υπό υποξικές συνθήκες. Σε άλλη έρευνα, διαπιστώθηκε ότι το miR-144, το οποίο αποτελεί ρυθμιστή της ισχαιμίας και της υποξίας παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη έκφραση τόσο σε σοβαρή, όσο και σε ήπια προεκλαμψία σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες (Li, et al., 2013). Αντίθετα από το miR-144, το οποίο υπερεκφράζεται σε συνθήκες υποξίας το miR-210, έχει βρεθεί ότι αυξάνει σημαντικά στο πλάσμα των γυναικών που πάσχουν από προεκλαμψία (Zhang, et al., 2012).

Σε πολύ πρόσφατη μελέτη που πραγματοποίησε ο Yoffe και οι συνεργάτες του (Yoffe et al., 2018) επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η εύρεση των miRNAs στο πλάσμα των εγκύων κατά το πρώτο τρίμηνο κύησης. Οι ερευνητές απομόνωσαν 25 μικρά μόρια RNA που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στην ομάδα που ανέπτυξε προεκλαμψία. Με βάση αυτά τα μόρια ανέπτυξαν ένα μοντέλο για την ταξινόμηση των δειγμάτων προεκλαμψίας. Επτά από τα μόρια που ερευνήθηκαν εντοπίστηκαν στα μιτοχόνδρια γεγονός που υποδηλώνει ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που εκδηλώνεται οφείλεται στο οξειδωτικό στρες και την εισβολή των τροφοβλαστών που επικρατεί στην προεκλαμψία. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA στο μητρικό αίμα έχει θετική συσχέτιση με την προεκλαμψία. Τα ευρήματα του Yoffe και των συνεργατών του δείχνουν την προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων μικρών μορίων RNA στο αίμα της εγκύου κατά το πρώτο τρίμηνο και θέτουν τα θεμέλια για την παραγωγή ενός νέου πρώιμου μη επεμβατικού διαγνωστικού εργαλείου για την προεκλαμψία, το οποίο θα μπορούσε να μειώσει την απειλή για τη ζωή της μητέρας και του εμβρύου (Yoffe et al., 2018).

A6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Η προεκλαμψία πιστεύεται ότι σχετίζεται με διάφορους πολυμορφισμούς στα γονίδια του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης- αλδοστερόνης (RAAS) (Zhang et al., 2017). Μπορεί κάποιοι πολυμορφισμοί να σχετίζονται με την προεκλαμψία, όμως δε σημαίνει ότι αυτό ισχύει για όλους τους πληθυσμούς (Roberts, 2000). Αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι κληρονομικές παραλλαγές των αλληλομόρφων των γονιδίων του συστήματος RAS σχετίζονται με την προεκλαμψία. Ιδιαίτερος, εκείνες που βρίσκονται στο μητροπλακουντιακό σύστημα RAS φαίνεται να συμβάλλουν στην ελαττωματική αγγειογένεση του πλακούντα. (Haram et al., 2014). Η ανάλυση αυτών των μεταλλαγών θα μπορούσε να αποτελέσει ακρογωνιαίο λίθο στη κατανόηση της γενετικής βάσης της διαταραχής. Είναι γεγονός ότι ο πλακούντας αποτελείται τόσο από μητρικό όσο και από εμβρυικό υλικό επομένως τα συστατικά του RAS του πλακούντα προέρχονται εν μέρη και από την έκφραση των γονιδίων του εμβρύου (Morgan et al., 1999). Επομένως, και τα μητρικά και τα εμβρυικά γονίδια συμβάλλουν στην παθογένεση της προεκλαμψίας ωστόσο μέχρι στιγμές ελάχιστες μελέτες έχουν εξετάσει ταυτόχρονα τις μητρικές και εμβρυικές επιδράσεις των πολυμορφισμών των γονιδίων που συμμετέχουν στο σύστημα RAS (Zhang et al., 2017). Οι πολυμορφισμοί που απασχολούν κυρίως τους ερευνητές είναι αυτοί στα γονίδια της ρενίνης (REN), του

αγγειοτενσινογόνου (AGT), της αγγειοτενσίνης I (ANG I) και II (ANG II), των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης AT1R και AT2R, και του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) (Zhang et al., 2017).

A6.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ AT1 ΚΑΙ AT2

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης το οποίο έχει κομβική σημασία στην ανάπτυξη της υπέρτασης ήταν λογικό να συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της γενετικής έρευνας. Ήδη από το 1991, είχαν εντοπισθεί γενετικές ποικιλομορφίες των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του συστήματος και συσχετίστηκαν με την οικογενή υπέρταση. Όταν έγινε πλήρως κατανοητή η δράση του αγγειοτενσινογόνου και του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, η έρευνα στράφηκε στους πολυμορφισμούς των γονιδίων και των υποδοχέων που κωδικοποιούν τη σύνθεση αυτών. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν εντοπιστεί αρκετοί πολυμορφισμοί στα γονίδια των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης AT1R και AT2R. Τα δύο αυτά γονίδια έχουν πολλά SNPs σε κωδικοποιούσες και μη περιοχές. Δύο από τους πολυμορφισμούς που έχουν μελετηθεί για το ενδεχόμενο συσχέτισης τους με την προεκλαμψία είναι ο πολυμορφισμός A1166C για τον υποδοχέα AT1 και C3123A για τον υποδοχέα AT2 (Katsuya et al., 2013).

Αν και έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί πολυμορφισμοί του γονιδίου AT1R ο πολυμορφισμός A1166C είναι αυτός που έχει μελετηθεί περισσότερο (Shamaa et al., 2016). Ήδη από το 1994 που εντοπίστηκε η θέση του στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου AGT1 έγιναν οι πρώτες αναφορές σχετικά με την συσχέτιση του με την υπέρταση (Bonnardeaux et al., 1994). Πιο πρόσφατα ευρήματα αναφέρουν ότι μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων επομένως συμπεραίνεται ότι σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα της αγγειοτενσίνης II (Shamma et al., 2016). Παρόλο που τα ευρήματα δείχνουν ότι συσχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας δεν είναι σαφές αν δηλώνει προδιάθεση εμφάνισης της διαταραχής. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορους πληθυσμούς (Καυκασίων, Αφροαμερικάνων, Αιγύπτιων, Ιαπώνων, Βορειοελλαδίτες) δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης του πολυμορφισμού με την εμφάνιση της υπέρτασης κατά την εγκυμοσύνη και της προεκλαμψίας (Bouba et al., 2003; Zhao et al., 2012; Shamaa et al., 2016; Li et al., 2015). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που

υποστηρίζουν το αντίθετο όπως παραδείγματος χάριν σε πληθυσμό της Κίνας και της Πολωνίας (Nalogowska et al., 2000; Kuashi et al., 2004).

Όσον αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα AT2, έχουν αναφερθεί πολλοί πολυμορφισμοί αλλά δεν είναι τόσο καλά μελετημένοι όσο αυτοί του AT1 υποδοχέα. Ανάμεσα σε αυτούς έχει βρεθεί ο πολυμορφισμός C3123A, ο οποίος εντοπίζεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του εξονίου 3 του γονιδίου και έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με υπέρταση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια και στεφανιαία νόσο. Λίγες μελέτες αναφέρουν την συσχέτιση του με την αρτηριακή πίεση (Hazzani et al., 2014). Όσον αφορά τη συσχέτιση του με την προεκλαμψία οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι αφενός η ύπαρξή του δεν δηλώνει προδιάθεση εμφάνισης της νόσου κι αφετέρου δεν δηλώνει ξεκάθαρη σχέση με την εμφάνιση υπέρτασης (Zhang et al., 2006; Kabadou et al., 2012). Μόνο μια μελέτη αναφέρει ότι υπάρχει συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την εκδήλωση συστολικής και διαστολικής πίεσης (Miyaki et al., 2006).

Είναι σαφές ότι οι μεταβολές στην ισορροπία των δυο υποδοχέων με συνακόλουθες μεταβολές και στον αιμοδυναμικό έλεγχο της αρτηριακής πίεσης πιθανόν ευθύνονται για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Rahimi et al. 2014). Ωστόσο, πλειοψηφία των ερευνών δηλώνει ότι η ύπαρξη ενός μεμονωμένου πολυμορφισμού σε κάποιον από τους δύο υποδοχείς δεν μπορεί να δηλώνει προδιάθεση για την συγκεκριμένη διαταραχή. Πλέον οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στη ταυτόχρονη ύπαρξη πολυμορφισμών αλλά και στον συνδυασμό πολυμορφισμών σε μητέρα και νεογνό.

Σε πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μητέρα και νεογνό τα ευρήματα δείχνουν ότι ανεξάρτητα από τον μητρικό γονότυπο, οι νεογνικοί πολυμορφισμοί Thr174Met AGT και A1166C AT1R αντίστοιχα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας κατά 1,53 και 1,22 φορές. Μάλιστα, ο κίνδυνος άξανε σημαντικά εάν τόσο η μητέρα όσο και το νεογέννητο έφεραν από έναν από τους πολυμορφισμούς Met235Th AGT, I / D ACE, A1166C AT1R και 83A / G REN. Επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι τα μεταλλαγμένα γονίδια RAS του νεογνού και της μητέρας αλληλοεπιδρούν, συμβάλλοντας σημαντικά στην παθογένεση της προεκλαμψίας στις μητέρες καθώς και στον ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης (Procopciuc et al., 2011).

A7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT1R (A1166C, rs5186) και AGT2R (C3123A, rs11091046) με την προεκλαμψία σε ομάδα γυναικών από την Κεντρική Ελλάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν σαράντα δύο (42) γυναίκες με συστολική πίεση αίματος ≥ 140 mmHg και / η διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg και ποσότητα πρωτεΐνης > 300 mg σε ουρά εικοσιτετράωρου πριν τις τριάντα τέσσερις (34) εβδομάδες κύησης και σαράντα επτά (42) γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη ως ομάδα ελέγχου.

❖ ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- **Για την απομόνωση DNA : QIAamp Mini Kit το οποίο περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:**
 - Πρωτεΐνάση K, QIAGEN
 - Διάλυμα λύσης AL, QIAGEN
 - Αιθανόλη 100%
 - Διάλυμα έκλυσης AW1, QIAGEN
 - Διάλυμα έκλυσης AW2, QIAGEN
 - Διάλυμα έκλυσης και επαναδιάλυσης του DNA AE, QIAGEN

- **Για την PCR**
 - HotStartTaq® Master Mix (Taq Πολυμεράση), QIAGEN
 - Εκκινητές για τα γονίδια AGT2 R & AGT2 R (Forward & Reverse), Invitrogen
 - RNAase free H₂O, QIAGEN

- **Για την ηλεκτροφόρηση**
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (100Mm Tris-βορικό, 2mM Na₂ EDTA), gibco®
 - Αγαρόζη UltraPure™ Agarose, Invitrogen
 - DNA ladder 50bp New England Biolabs

- **Για την ενζυμική πέψη**
 - Buffer
 - Απεσταγμένο νερό
 - DdeI ένζυμο New England Biolabs
 - AluI ένζυμο New England Biolabs

B1.2 ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

- 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 ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Μικροπιπέτες διαφόρων όγκων τύπου Gilson
- Συσκευή Vortex, Velp Scientifica
- Θερμικός κυκλοποιήτης PCR,PCT 200 MJ RESEARCH
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Thermo EC
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με ενσωματωμένη κάμερα OVItec
- Υδατόλουτρο BIORLine
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5415 R
- Ηλεκτρονικός ζυγός, DHAUS
- Αποστακτήρας νερού, Heal Force ®

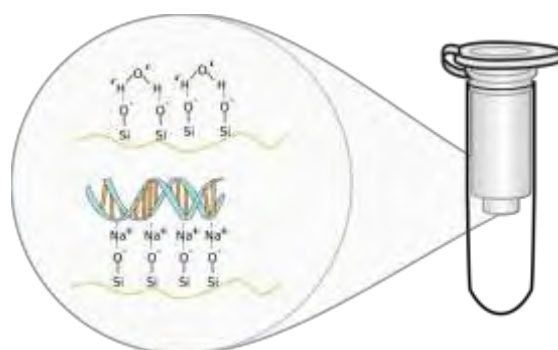
B1.4 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

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

B2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B2.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΜΕ QIAAMP® MINI KIT (QIAGEN)

Η τεχνική απομόνωσης DNA βασίζεται στην επιλεκτική πρόσδεση των νουκλεϊκών οξέων σε μια μεμβράνη/φίλτρο από πηκτή σιλικόνης (silica membrane gel), που βρίσκεται στο εσωτερικό της στήλης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Απεικόνιση του φίλτρου που βρίσκεται στο εσωτερικό της στήλης και επιτρέπει την πρόσδεση των νουκλεϊκών οξέων

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Qiagen_Mini_Spin_Column.svg)

Η πηκτική σιλικόνης είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα τα οποία μπορούν να αναστείλουν την δράση της DNA πολυμεράσης κατά την αντίδραση PCR. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA έχουν μεγάλη συγγένεια προς τα θετικά φορτισμένα μόρια του πηκτώματος σιλικόνης. Η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος και το DNA εκλύεται από τη μεμβράνη. (Karp et al., 1998, Volgelstein et al., 1979). Ωστόσο πριν το στάδιο δέσμευσης του DNA, προηγείται η κατακρήμνιση του σε υδατικό διάλυμα 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 φυγοκέντρωση το διάλυμα δέσμευσης περνά μέσα από τη στήλη όπου τα νουκλεϊκά οξέα θα προσδεθούν στη μεμβράνη σιλικόνης αν οι συνθήκες ακολουθούν αυτές που περιεγράφηκαν παραπάνω. Με διαδοχικές εκπλύσεις απομακρύνονται όλες οι πιθανές προσμίξεις προκειμένου στη στήλη να παραμείνει μόνο το DNA, το οποίο θα αποδεσμευθεί από τη μεμβράνη έπειτα από προσθήκη διαλύματος έκλυσης και φυγόκεντρωσης. (Matson, 2008; Kumar, 2006).

Τα αναλυτικά στάδια της διαδικασίας έχουν ως εξής:

- Μετάγγιση 200 μ L αίματος από σωληνάριο αιμοληψίας σε Eppendorf
- Προσθήκη 20 μ L πρωτεΐνασης K.
- Προσθήκη 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης AL.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 56° C για 15 min
- Προσθήκη 200 μ L αιθανόλη 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 μ L.
- Φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 min
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μ L
- Προσθήκη 500 μ L διαλύματος έκπλυσης AW2
- Φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 3 min
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μ L
- Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 min

- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μ L
- Προσθήκη 60 – 70 μ L διαλύματος έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA AE.
- 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.

B2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση και τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο ανάλογα με το μέγεθός τους. Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές με ουδέτερο φορτίο και χαμηλή χημική πολυπλοκότητα που αποτρέπει την αλληλεπίδραση με τα βιομόρια. Η πηκτή αγαρόζης φέρει ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και A 500 bp έως 25 kb. Η μέθοδος είναι απλή. (Voytas et al., 2001). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια 1) την δημιουργία πηκτώματος κατάλληλης συγκέντρωσης αγαρόζης η οποία επιλέγεται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρισθούν, 2) τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια «wells» που βρίσκονται στο επάνω μέρος του πηκτώματος, στη συνέχεια ρυθμίζονται η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος της συσκευής και ο αντίστοιχος χρόνος που κρίνεται απαραίτητος ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των τμημάτων. 3) Τέλος η πηκτή χρωματίζεται λόγω της ενσωμάτωσης του βρωμιούχου αιθιδίου στο ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής πράγμα το οποίο επιτρέπει την οπτικοποίηση της πηκτής άμεσα έπειτα από την έκθεσή σε υπεριώδη ακτινοβολία (Voytas et al., 2001).

Πιο αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- **Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης**
 - Σε κωνική φιάλη προστίθενται αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE (100mM Tris-βορικό, 2 mM Na₂EDTA)

- Γίνεται ανακίνηση και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5min, μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει)
 - Προστίθεται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου από διάλυμα με συγκέντρωση 10mg/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξογόνος 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 (wells) για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη.
 - Όταν πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται προσεκτικά η χτένα και το πήκτωμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.
- **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 3μL από το διάλυμα χρωστικής μπλε της βρομοφαινόλης (0.25% bromophenol blue/ 0.25% xylene cyanol FF/15% Ficoll Type 400 σε ddH₂O)
 - Τα 8 μl δείγματος που προέκυψαν από την παραπάνω ανάμιξη τοποθετούνται στα πηγαδάκια που έχουν προκύψει μετά την αφαίρεση της χτένας. Επιπρόσθετα σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετούνται 6 μl DNA ladder («μάρτυρα»)ο οποίος φέρει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους και χρησιμεύει στη σύγκριση του μεγέθους του DNA δείγματος με βάση το μέγεθος του μάρτυρα.
 - Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, 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 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ - PCR(POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί βασικό εργαλείο της μοριακής βιολογίας και έχει συμβάλει στην ανάπτυξη της γονιδιακής και της ευρύτερης βιολογικής έρευνας. Αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και εκ τότε είναι πιθανώς η πιο διαδεδομένη τεχνική του κλάδου της μοριακής βιολογίας με πληθώρα εφαρμογών.

Η PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό (amplification) μια καθορισμένης αλληλουχίας DNA, η οποία οριοθετείται και στα δύο άκρα της από δύο εκκινητές (primers) (Gibbs et al., 1990). Ουσιαστικά η PCR μιμείται την διαδικασία αντιγραφής του DNA επιτυγχάνοντας την παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων της προκαθορισμένης αλληλουχίας *in vitro* και σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οποιαδήποτε τμήμα DNA ανεξαρτήτως μεγέθους μπορεί να επιλεγθεί και να ενισχυθεί με την συγκεκριμένη τεχνική, αρκεί να είναι γνωστές οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των δυο άκρων του για να μπορούν να επιλεγθούν οι κατάλληλοι εκκινητές (Erlich et al., 1989)

Οι εκκινητές είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνήθως 20 νουκλεοτιδίων), οι οποίες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων στα άκρα του τμήματος που θα ενισχυθεί. Ο κάθε εκκινητής φέρει αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία του τμήματος της μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA εκμαγείου (Russel et al., 2006)

Ένας πλήρης κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η αποδιάταξη του DNA (denaturation). Σε μια τυπική αντίδραση το DNA αποδιατάσσεται στους 94°C-96°C. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την προσαρμογή των εκκινητών στο εκμαγείο DNA (annealing). Οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων τμημάτων σε θερμοκρασία 50-60° C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επιμήκυνση των εκκινητών, η οποία αποτελεί και το τρίτο στάδιο του κύκλου (extension). Η επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 72° C από θερμοανθεκτική πολυμεράση. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η Taq πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και δρα ιδανικά στους 72° C και παράλληλα δεν καταστρέφεται στους 94° C. Η εναλλαγή των θερμοκρασιών πραγματοποιείται από αυτοματοποιημένα μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers) (Weier et al., 1988, Ochman et al.,

1988). Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται 20-40 φορές ανάλογα με την ποσότητα του νεοσυντιθεμένου DNA που επιδιώκεται. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε νέος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του επόμενου.

Για την σύνθεση των υπό μελέτη PCR περιοχών που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών:

- 5'- TTG AGG TTG AGT GAC ATG TTC GA -3' και 5'- CGG TTC AGT CCA CAT AAT GCA -3' για την σύνθεση περιοχής μήκους 151bp του γονιδίου AGT1R
- 5' GGA TTC AGA TTT CTC TCT TGA A 3' και 5' GCA TAG GAG TAT GAT TTA ATC 3' για τη σύνθεση περιοχής μήκους 321 bp του γονιδίου AGT2R

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

B2.3.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PCR ΓΙΑ AGT 1 R ME HOTSTART

Σε κάθε eppendorf 0.2 ml προσθέτουμε

Δείγματα:

DNA: 7μl
MIX: 23μl
T.V.: 30μl

Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μl		
PRIMER F stock	2μl		
PRIMER R stock	2μl		
H2O	4μl		

Το πρόγραμμα του PCR (AGTI):

94°C 5min

40 cycles of:

94°C 1min

56°C 1min

72°C 1min

72°C 10min

18°C for ever

B2.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PCR ΓΙΑ AGT 2 R ΜΕ HOTSTART

Σε κάθε eppendorf 0.2 ml προσθέτουμε

Δείγματα:

DNA: 7μl

MIX: 23μl

T.V.: 30μl

Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανα δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μl		
PRIMER F stock	2μl		
PRIMER R stock	2μl		
H2O	4μl		

Το πρόγραμμα του PCR (AGTI):

94°C 5min

40 cycles of:

94°C 1min

56°C 1min

72°C 1min

72°C 10min

18°C for ever

B2.4 ENZYMIΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ

Οι ενζυμικές πέψεις πραγματοποιούνται με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων(ή περιοριστικών ενδονουκλεασών),τα οποία είναι συνήθως ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλινδρομικές αλληλουχίες του DNA και τις διασπούν σε συγκεκριμένες θέσεις. Η φυσιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους (William et al., 2003). Η ανακάλυψή τους από τον Werner Aber το 1965 έφερε επανάσταση στη μοριακή βιολογία επιτρέποντας την ανάπτυξη των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA. Η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς, η δημιουργία βιβλιοθηκών, η μελέτη πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων περιοριστικών ενδονουκλεασών (RFLPs), η δημιουργία χαρτών και η μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων αποτελούν μερικές από τις εφαρμογές τους (Russel et al., 2006).

Η εφαρμογή των περιοριστικών ενδονουκλεασών στην γονοτύπηση των πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία. Για να είναι εφικτή η γονοτύπηση των πολυμορφικών νουκλεοτιδίων σε μια αλληλουχία DNA θα πρέπει είτε να οδηγούν σε νέα θέσης κοπής κάποια ενδονουκλεάσης είτε στη κατάργηση μιας προυπάρχουσας θέσης αναγνώρισης ενός ενζύμου (Masatoshi et al.,1980).

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των πολυμορφισμών είναι δύο. Το DdeI που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού A1166C (A1166C, rs5186 A to C) του γονιδίου AGT1R .Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Desulfovibrio desulfuricans* και αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \overset{\nabla}{\text{C}}\text{TNAG} \dots 3'$ πέπτοντας την στα σημεία που προσδιορίζουν τα βελάκια δημιουργώντας δυο προεξέχοντα άκρα DdeI. (Doria et al., 1994)

Το AluI ήταν το δεύτερο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού AC (C3123A, rs11091046 C to A) του γονιδίου AGT2R. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Arthrobacter luteus* και αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \overset{\nabla}{\text{A}}\text{GCT} \dots 3'$ κόπτοντας την στα σημεία που βρίσκονται τα βελάκια δημιουργώντας δύο τυφλά άκρα (Roberts et al., 1976).

Η μέθοδος ανίχνευσης των πολυμορφισμών με την χρήση περιοριστικών ενζύμων απαιτεί την ενίσχυση του υπό μελέτη τμήματος του DNA με PCR και στη συνέχεια την επώαση του προϊόντος της αντίδρασης σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας με την

περιοριστική ενδονουκλεάση. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διαφέρουν ως προς τις βέλτιστες συνθήκες δράσης τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης, τον χρόνο επώασης και την σύσταση του διαλύματος επώασης. (Peterson et al., 2007) Η πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση απαιτεί απλώς την επώαση του DNA με το ένζυμο σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης που δίνονται από τον κατασκευαστή. Μετά την πέψη του προϊόντος ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης και αναγνώριση των χαρακτηριστικών θραυσμάτων του γονιδιώματος, Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του AGT1R γονιδίου με την χρήση του ενζύμου DdeI είναι το εξής:

B2.4.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΨΗΣ ΤΟΥ AGT1R ΜΕ ΤΟ ENZYMO DdeI

Πέψεις για AGT 1R

Ένζυμο Dde I (10000u) :
για πολυμορφισμό A1166C (rs 5186, A to C)

PCR product : 10 μl

Βάζω σε κάθε eppendorf 20 μl από το mix

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
ενζυμο	1,5		
buffer	3		
H2O	15.5		

Επώαση OVERNIGHT στους 37°C σε υδατόλουτρο

Τρέχω σε gel 20μl

AGT A1166C (rs 5186, A to C)	PCR product 151bp	
AA	0	151bp
AC	1	151bp/100/ 51
CC	2	100/ 51bp

B2.4.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΨΗΣ ΤΟΥ AGT2R ΜΕ ΤΟ ENZYMO AluI

Πέψεις για AGT 2R

Ένζυμο Alu I (10000u) :
για πολυμορφισμό A C (rs 11091046, C to A)

PCR product : 10 μl

Βάζω σε κάθε eppendorf 20 μl από το mix

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
ένζυμο	1,5		
buffer	3		
H ₂ O	15.5		

Επώαση OVERNIGHT στους 37°C σε υδατόλουτρο

Τρέχω σε gel 20μl

AGT2R (rs 11091046 A to C)	PCR product 321bp	
CC	0	321bp
AC	1	321bp/214/ 107
AA	2	214/ 107bp

B2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney. Για τη σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test όπου ήταν απαραίτητο.

Οι μέσες τιμές (mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD) και οι διάμεσοι (median) και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη (interquartile range) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών.

Για την διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ύπαρξη προεκλαμψίας λαμβάνοντας υπόψη και άλλους παράγοντες έγινε ανάλυση λογαριθμιστικής

παλινδρόμησης (logistic regression analysis) και προέκυψαν σχετικοί λόγοι (Odds ratio) με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους (95% ΔΕ). Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05.

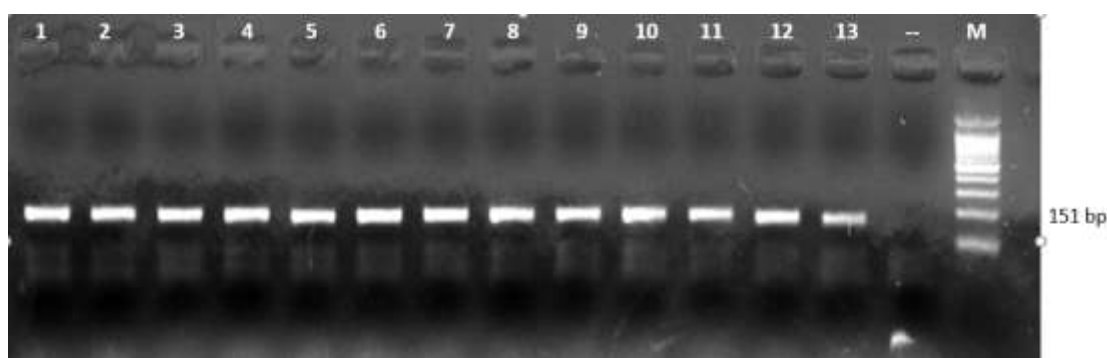
B2.6 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η λήψη φωτογραφιών έγινε με την ενσωματωμένη κάμερα OVItec της συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) της εταιρείας Vilber Lourmat.

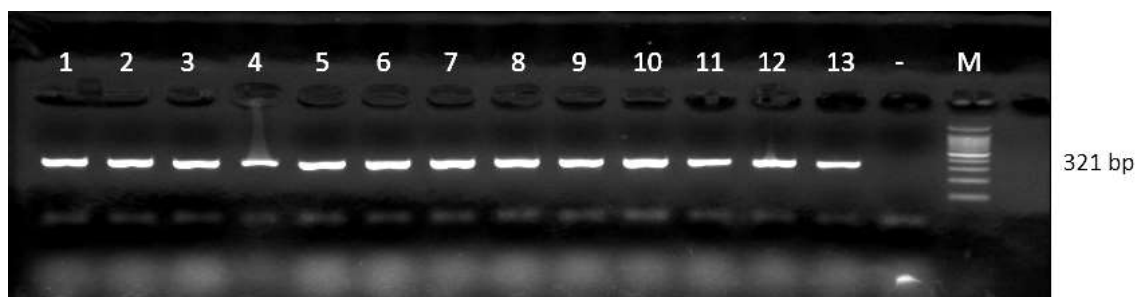
❖ ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ AT1R ΚΑΙ AT2R

Από 84 συνολικά γυναίκες (42 με προεκλαμψία και 42 στην ομάδα ελέγχου), συλλέχθηκε περιφερικό αίμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA. Στη συνέχεια, τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς AT1 και AT2 στα οποία εντοπίζονται οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί, ενισχύθηκαν με PCR κι ακολούθησε ηλεκτροφόρηση. Όπως ήταν αναμενόμενο το μέγεθος του τμήματος DNA για το AT1R ήταν 151 bp και για το AT2R 321 bp. Ενδεικτικά παρατίθενται οι εικόνες που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση 13 δειγμάτων AT1R (Εικόνα 10) και AT2R (Εικόνα 11) αντίστοιχα.



Εικόνα 10. Τμήμα DNA μήκους 151 bp από 13 δείγματα έπειτα από PCR για το γονίδιο AGT1R



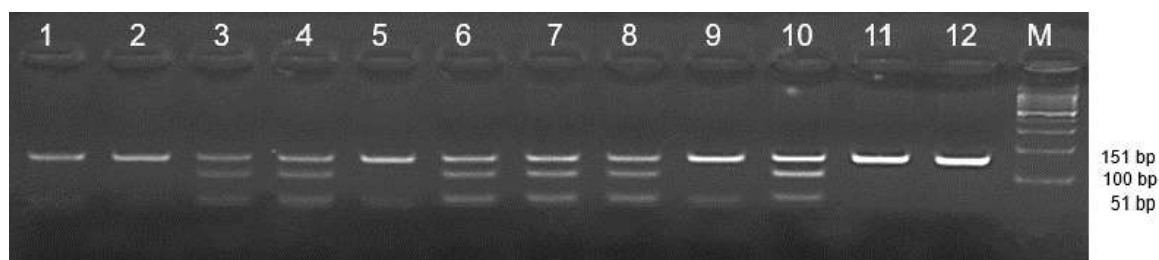
Εικόνα 11. Τμήμα DNA μήκους 321 bp από 13 δείγματα έπειτα από PCR για το γονίδιο AGT2R

Γ2. ENZYMΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκαν επώσεις των προϊόντων PCR με περιοριστικά ένζυμα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που προαναφέρθηκαν.

Γ2.1 ΠΕΨΕΙΣ ΓΙΑ AT1R

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού A1166C του AT1R γονιδίου πραγματοποιήθηκε ολονύχτια επώαση με το ένζυμο DdeI και στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθούν οι ζώνες που προέκυψαν μετά την δράση του ενζύμου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προέκυψαν συνολικά 3 διαφορετικές ζώνες μήκους 51bp, 100bp και 151bp όπως φαίνεται στην εικόνα 12.

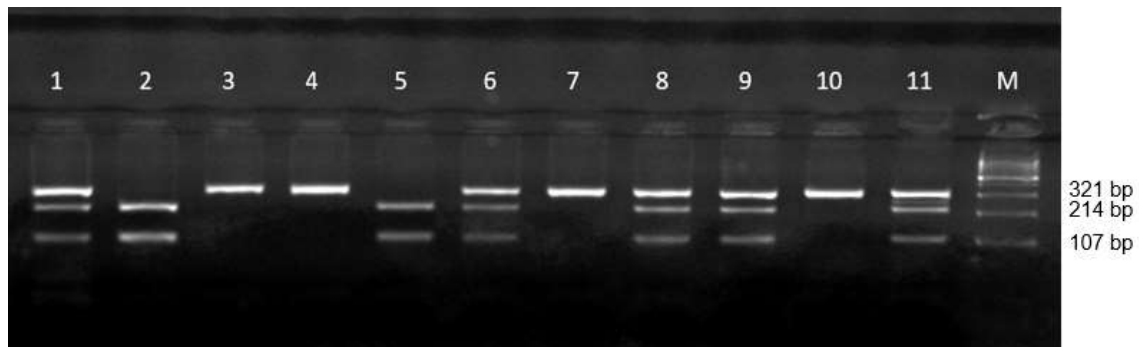


Εικόνα 12. Αποτέλεσμα πέψης για το γονίδιο AGT1R έπειτα από τη δράση του ενζύμου DdeI.

Η δράση του ενζύμου οδηγεί στη δημιουργία θραυσμάτων που καθορίζουν τα ομόζυγα και ετερόζυγα δείγματα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα που μετά την δράση του ενζύμου φέρουν μια ζώνη 151 bp είναι ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο και ο τύπος πολυμορφισμού καθορίζεται ως 0. Τα δείγματα που παρουσιάζουν 3 ζωνώσεις 51 bp, 100 bp και 151 bp αντιστοιχούν σε ετερόζυγες γυναίκες και ο τύπος πολυμορφισμού καθορίζεται ως 1 και τέλος τα δείγματα που εμφάνισαν τις δυο μικρότερες ζώνες μεγέθους 100 bp και 51 bp αντιστοιχούν σε ομόζυγες γυναίκες για το παθολογικό αλληλόμορφο και ο τύπος του πολυμορφισμού χαρακτηρίζεται ως τύπος 2.

Γ2.2 ΠΕΨΕΙΣ ΓΙΑ AT2R

Αντίστοιχα για την μελέτη του πολυμορφισμού C3123A του γονιδίου AT2R χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο AluI και έπειτα ακολούθησε ηλεκτροφόρηση. Όπως και στη περίπτωση του AT1R οι ζώνες που προέκυψαν ήταν τρεις και είχαν μέγεθος 107 bp, 214 bp και 321 bp. Στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 13) αποτυπώνεται το αποτέλεσμα δράσης του ενζύμου και η δημιουργία των επιμέρους θραυσμάτων σε 11 δείγματα.



Εικόνα 13. Αποτέλεσμα πέψης για το γονίδιο AGT2R έπειτα από τη δράση του ενζύμου AluI.

Στη περίπτωση του AT2R γονιδίου η παρουσία μια ζώνης 321bp δηλώνει ότι το δείγμα αντιστοιχεί σε άτομο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (πολυμορφισμός τύπου 0), η παρουσία 3 ζωνών (107bp, 214bp και 321bp) αντιστοιχεί σε ετερόζυγο άτομο (πολυμορφισμός τύπου 1) και η παρουσία των δύο μικρότερων ζωνών (214 bp και 107 bp) υποδηλώνει ομοζυγωτία για το παθολογικό αλληλόμορφο (πολυμορφισμός τύπου 3).

Γ3. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΔΕΛΟΜΕΝΩΝ

Ακολούθησε συγκέντρωση και καταγραφή όλων των κλινικών στοιχείων των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Τα στοιχεία αυτά περιλαμβάνουν την ηλικία των γυναικών, τον αριθμό των παιδιών που γεννήθηκαν, τις εβδομάδες τις κηίσεις καθώς και το βάρος του νεογνού. Επιπλέον καταγράφηκε ο τύπος του πολυμορφισμού (0,1,2) που φέρουν σύμφωνα με τον διαχωρισμό που περιγράφηκε στις παραπάνω ενότητες (Γ2.1, Γ2.2). Τα στοιχεία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες για να διευκολυνθεί η ανάλυση. Η πρώτη κατηγορία αφορά την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1) και η δεύτερη κατηγορία αφορά τις γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά τη κήση (Πίνακας 2).

a/a	Control	Age	Child	Weeks of gestation	Birth weight	AT1R-Dde	AT2R-Alu
1	δευτεροτόκος	37	(+) (female)	38w	3100gr	1	1
2	πρωτοτόκος	39	(+) (male)	39w	3250 (gr)	0	0
3	πρωτοτόκος	37	(+) (female)	40w	4050 (gr)	0	0
4	δευτεροτόκος	25	(+) (male)	37w	3650 (gr)	1	0
5	πρωτοτόκος	36	(+) (male)	41w	4100 (gr)	0	2
6	πρωτοτόκος	26	(+) (male)	37w	3800 (gr)	0	1
7	δευτεροτόκος	22	(+) (female)	37w	3750 (gr)	0	0
8	δευτεροτόκος	30	(+) (male)	38w	3800 (gr)	0	1
9	πρωτοτόκος	25	(+) (twins)	40w	4000 (gr)	1	1
10	τριτοτόκος	19	(+) (male)	41w	3700 (gr)	0	2

11	πρωτοτόκος	27	(+) (twins-female both)	36w	2800 (gr), 2400(gr)	0	0
12	δευτεροτόκος	31	(+) (male)	38w	3100 (gr)	1	0
13	πρωτοτόκος	25	(+) (male)	41w	3980 (gr)	0	2
14	πρωτοτόκος	27	(+) (female)	40w	4020 (gr)	2	1
15	πρωτοτόκος	32	(+) (female)	40w	3780 (gr)	0	0
16	πρωτοτόκος	42	(+) (female)	39w	3550 (gr)	0	1
17	πρωτοτόκος	32	(+) (male)	39w	3250 (gr)	1	1
18	πρωτοτόκος	23	(+) (male)	38w	3750 (gr)	2	0
19	δευτεροτόκος	35	(+) (female)	37w	3200 (gr)	0	1
20	τριτοτόκος	40	(+) (female)	37w	3850 (gr)	0	1
21	πρωτοτόκος	30	(+) (male)	41w	3300 (gr)	0	1
22	πρωτοτόκος	37	(+) (female)	40w	3100 (gr)	0	1
23	πρωτοτόκος	34	(+) (male)	39w	4180 (gr)	0	0
24	πρωτοτόκος	35	(+) (female)	38w	4060 (gr)	0	1
25	πρωτοτόκος	27	(+) (twins-female-male)	41w	2600 (gr), 2200(gr)	0	1
26	πρωτοτόκος	40	(+) (male)	40w	3050 (gr)	0	1
27	πρωτοτόκος	32	(+) (female)	39w	3700 (gr)	0	1
28	τριτοτόκος	35	(+) (male)	37w	3350 (gr)	1	1
29	πρωτοτόκος	39	(+) (male)	39w	3810 (gr)	0	1
30	τριτοτόκος	35	(+) (female)	37w	3130 (gr)	0	1
31	πρωτοτόκος	28	(+) (female)	38w	3550 (gr)	0	1
32	πρωτοτόκος	19	(+) (female)	39w	3530 (gr)	1	1
33	πρωτοτόκος	36	(+) (male)	40w	3900 (gr)	0	1
34	πρωτοτόκος	33	(+) (male)	41w	4100 (gr)	0	1
35	πρωτοτόκος	37	(+) (male)	38w	3460 (gr)	0	1
36	πρωτοτόκος	40	(+) (female)	38w	3540 (gr)	0	1
37	πρωτοτόκος	39	(+) (male)	39w	3540 (gr)	1	2
38	πρωτοτόκος	28	(+) (male)	37w	3980 (gr)	0	1
39	πρωτοτόκος	28	(+) (female)	41w	4150(gr)	0	1
40	πρωτοτόκος	27	(+) (twins-male both)	40w	2540 (gr), 2130(gr)	1	0
41	πρωτοτόκος	37	(+) (female)	40w	3980 (gr)	1	1
42	τριτοτόκος	33	(+) (female)	37w	3040 (gr)	0	1
						Dde=	Alu=
						0=AA	0=CC
						1=AC	1=CA
						2=CC	2=AA

Πίνακας 1. Καταγραφή των κλινικών στοιχείων και του τύπου του πολυμορφισμού της ομάδας ελέγχου.

A/a	Preeclampsia	Age	child	Weeks of gestation	Birth weight	At1r-dde	At2r-alu
1	πρωτοτόκος	38	(+) (male)	27w	750gr	1	2
2	πρωτοτόκος	39	(+) (twins-female both)	32w	1650gr- 1450gr	1	0
3	πρωτοτόκος	35	(+) (male)	28w	750 (gr)	0	0
4	πρωτοτόκος	22	(+) (male)	32w	2315 (gr)	1	2

5	πρωτοτόκος	37	(+) (female)	35w	2600 (gr)	0	1
6	πρωτοτόκος	24	(+) (twins-male both)	33w	2115+1810 (gr)	0	1
7	πρωτοτόκος	29	(+) (female)	32w	1420 (gr)	2	1
8	πρωτοτόκος	28	(+) (male)	32w	1300 (gr)	1	1
9	πρωτοτόκος	28	(+) (twins)	23w	εμβρυικός θάνατος	1	0
10	πρωτοτόκος	18	(+) (male)	34w	2360 (gr)	0	1
11	πρωτοτόκος	29	(+) (male)	31w	1340 (gr)	1	2
12	πρωτοτόκος	32	(+) (male)	31w	1215 (gr)	1	1
13	πρωτοτόκος	26	(+) (male)	33w	1890 (gr)	0	1
14	πρωτοτόκος	25	(+) (female)	30w	1130 (gr)	1	1
15	δευτεροτόκος	34	(+) (female)	33w	1540 (gr)	0	1
16	πρωτοτόκος	41	(+) (twins-female-1 dead)	27w	850 (gr),850 gr	0	0
17	τριτοτόκος	34	(+) (male)	34w	2320 (gr)	0	0
18	πρωτοτόκος	22	(+) (male)	30w	1460 (gr)	1	0
19	πρωτοτόκος	36	(+) (female)	34w	1660 (gr)	0	1
20	τριτοτόκος	41	(+) (male)	28w	690 (gr)	1	0
21	πρωτοτόκος	29	(+) (male)	31w	1420 (gr)	1	0
22	πρωτοτόκος	38	(+) (female)	31w	1080 (gr)	0	1
23	πρωτοτόκος	32	(+) (male)	33w	1700 (gr)	0	1
24	δευτεροτόκος	34	(+) (female)	34w	2590 (gr)	0	0
25	πρωτοτόκος	25	(+) (male)	31w	2140 (gr)	1	1
26	πρωτοτόκος	42	(+) (male)	32w	1800 (gr)	2	1
27	τριτοτόκος	30	(+) (male)	32w	2400 (gr)	1	1
28	τριτοτόκος	34	(+) (male)	34w	2410 (gr)	0	1
29	τριτοτόκος	38	(+) (male)	34w	2390 (gr)	2	1
30	τριτοτόκος	34	(+) (female)	34w	1830 (gr)	0	1
31	πρωτοτόκος	27	(+) (female)	34w	2000 (gr)	1	1
32	πρωτοτόκος	18	(+) (female)	34w	2430 (gr)	0	1
33	δευτεροτόκος	37	(+) (male)	34w	2100 (gr)	0	1
34	πρωτοτόκος	32	(+) (male)	32w	1600 (gr)	1	2
35	πρωτοτόκος	36	(+) (female)	32w	1260 (gr)	0	1
36	πρωτοτόκος	39	(+) (female)	32w	1440 (gr)	1	1
37	πρωτοτόκος	41	(+) (twins-female-male)	32w	1630 (gr)-1580(gr)	2	1
38	πρωτοτόκος	28	(+) (male)	31w	890 (gr)	0	2
39	πρωτοτόκος	29	(+) (male)	34w	3260(gr)	1	2
40	πρωτοτόκος	26	(+) (male)	29w	900 (gr)	0	2
41	δευτεροτόκος	38	(+) (female)	34w	1750 (gr)	2	1
42	δευτεροτόκος	32	(+) (female-dead)	27w	750 (gr)	2	1
						Dde=	Alu=
						0=AA	0=CC
						1=AC	1=CA
						2=CC	2=AA

Πίνακας 2. Καταγραφή των κλινικών στοιχείων και του τύπου του πολυμορφισμού των γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά τη κύηση.

Γ4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Γ4.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων. Αρχικά μελετήθηκαν τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των δυο ομάδων μελέτης όπως αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα ευρήματα αυτής της στατιστικής ανάλυσης καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

		Group				P Pearson's x ² test
		Control		Preeclampsia		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	31	73,8	31	73,8	0,913
	2ος	6	14,3	5	11,9	
	3ος	5	11,9	6	14,3	
Ηλικία (έτη), μέση τιμή (SD)		32,0 (6,0)		32,0 (6,0)		0,972 ⁺
Φύλο νεογνού	Αγόρι	21	50,0	24	57,1	0,866 [*]
	Κορίτσι	19	45,2	16	38,1	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	2	4,8	2	4,8	
Εμβρυϊκός θάνατος	Όχι	42	100,0	40	95,2	0,494 [*]
	Ναι	0	0,0	2	4,8	
Δίδυμη κύηση	Όχι	38	90,5	37	88,1	>0,999 [*]
	Ναι	4	9,5	5	11,9	
Εβδομάδα κύησης, διάμεσος (ενδ. εύρος)		39,0 (38,0 - 40,0)		32,0 (31,0 - 34,0)		<0,001 ⁺⁺
Πρόωρος τοκετός	Όχι	41	97,6	0	0,0	<0,001
	Ναι	1	2,4	42	100,0	
Βάρος γέννησης (gr), διάμεσος (ενδ. εύρος)		3675 (3250 - 3980)		1650 (1260 - 2140)		<0,001 ⁺⁺

*Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Πίνακας 3. Στατιστική επεξεργασία των κλινικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών στην ομάδα ελέγχου και στις γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά την κύηση.

Από την παραπάνω ανάλυση συμπεραίνεται ότι οι γυναίκες με προεκλαμψία είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά πρόωρου τοκετού και γέννησαν σε μικρότερη εβδομάδα κύησης. Επίσης το βάρος των νεογνών που προήλθαν από κύηση με προεκλαμψία ήταν σημαντικά χαμηλότερο από αυτό της ομάδας ελέγχου.

Γ4.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Για την διαπίστωση του ποσοστού εμφάνισης των πολυμορφισμών στις δύο ομάδες μελέτης πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία αυτών, τα αποτελέσματα της οποίας έχουν ως εξής:

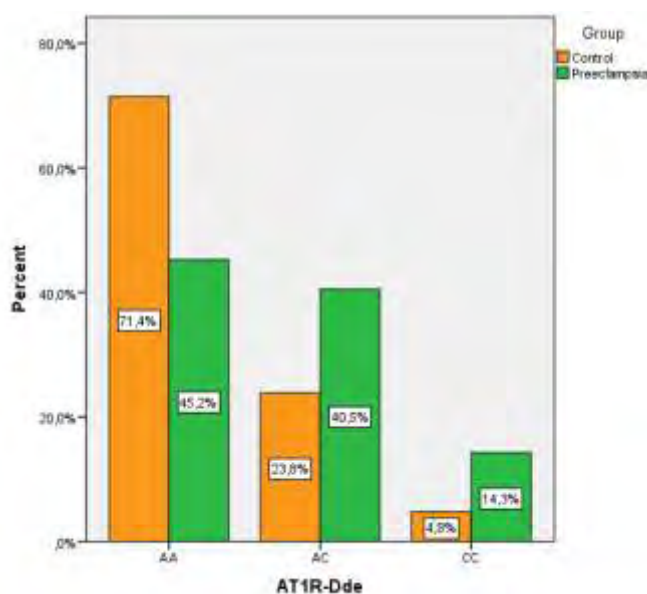
Γονίδιο-Ένζυμο		Group				P Pearson's x ² test
		Control		Preeclampsia		
		N	%	N	%	
AT1R-Dde	AA	30	71,4	19	45,2	0,047*
	AC	10	23,8	17	40,5	
	CC	2	4,8	6	14,3	
AT2R-Alu	CC	10	23,8	9	21,4	0,623
	CA	28	66,7	26	61,9	
	AA	4	9,5	7	16,7	

*Fisher's exact test

Πίνακας 4. Ποσοστό εμφάνισης των διαφορετικών γονοτύπων του πολυμορφισμού στις δύο ομάδες μελέτης.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι στην ομάδα της προεκλαμψίας είναι σημαντικά μεγαλύτερη η εμφάνιση τόσο των ομόζυγων όσο και των ετερόζυγων γυναικών που φέρουν κάποιο πολυμορφισμό του γονιδίου AT1R-Dde ($P < 0,05$).

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η έκφραση του AT1R-Dde στις δύο ομάδες της μελέτης (Γράφημα 1):



Γράφημα 1. Ποσοστό εμφάνισης των τριών γονοτύπων στις δύο ομάδες μελέτης (ομάδα ελέγχου και γυναίκες με προεκλαμψία)

Γ4.3 ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Για να οριστεί η πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας με βάση την ύπαρξη των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (Πίνακας 5).

Γονίδιο-Ένζυμο	Γονότυπος	OR (95% ΔΕ) ⁺	P
AT1R-Dde	AA (αναφ.)		
	AC	2,68 (1,02 - 7,08)	0,046
	CC	4,74 (0,87 - 25,94)	0,073
AT1R-Dde	AA (αναφ.)		
	AC/CC	3,03 (1,23 - 7,47)	0,016
AT2R-Alu	CC (αναφ.)		
	CA	1,03 (0,36 - 2,94)	0,953
	AA	1,94 (0,42 - 8,92)	0,392

Πίνακας 5. Πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας με βάση την ύπαρξη του πολυμορφισμού σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, οι γυναίκες που φέρουν τον γονότυπο AC για το AT1R-Dde έχουν 2,68 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία ($P=0,046<0,05$). Επίσης η παρουσία του παθολογικού αλληλομόρφου είτε αυτό οδηγεί σε γονότυπο AC είτε σε CC (AC/CC) για το AT1R-Dde οδηγεί σε 3,03 φορές υψηλότερη πιθανότητα να αντιστοιχεί σε γυναίκα που εμφάνισε προεκλαμψία κατά τη κύηση ($P=0,016<0,05$).

Στην πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας λόγω της παρουσίας του πολυμορφισμού προστέθηκαν και άλλοι παράγοντες όπως το βάρος του νεογνού και η εβδομάδα γέννησης και τα αποτελέσματα έδειξαν και πάλι ότι η παρουσία των παθολογικών αλληλομόρφων συναντάται συχνότερα στις γυναίκες με προεκλαμψία (Πίνακας 6). Πιο συγκεκριμένα οι γυναίκες που φέρουν τον γονότυπο AC για το AT1R-Dde έχουν 2,70 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία. Επιπλέον οι γυναίκες που φέρουν είτε το ένα παθολογικό αλληλόμορφο είτε το άλλο AC/CC για το AT1R-Dde είναι 3,05 φορές πιο πιθανό να ανήκουν στην ομάδα αυτών που εμφάνισαν προεκλαμψία.

		OR (95% ΔΕ) ⁺	P
AT1R-Dde	AA (αναφ.)		
	AC	2,70 (1,02 - 7,21)	0,047
	CC	4,71 (0,86 - 25,87)	0,074
AT1R-Dde	AA (αναφ.)		
	AC/CC	3,05 (1,23 - 7,58)	0,016
AT2R-Alu	CC (αναφ.)		
	CA	1,03 (0,36 - 2,93)	0,959
	AA	1,96 (0,42 - 9,08)	0,388

⁺Σχετικός λόγος (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης)

Πίνακας 6. Πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας βάσει της ύπαρξης του πολυμορφισμού έχοντας λάβει υπόψιν το βάρος του νεογνού και την εβδομάδα γέννησής του

Ακολούθως παρουσιάζεται η σχέση του πολυμορφισμού AT1R-Dde (Πίνακας 7) και AT2R-Alu (Πίνακας 8) με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία:

		AT1R-Dde						P Fisher's exact test
		AA		AC		CC		
		N	%	N	%	N	%	
Τόκος	1ος	13	68,4	15	88,2	3	50,0	0,180
	2ος	3	15,8	0	0,0	2	33,3	
	3ος	3	15,8	2	11,8	1	16,7	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	10	52,6	12	70,6	2	33,3	0,186
	Κορίτσι	9	47,4	4	23,5	3	50,0	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	0	0,0	1	5,9	1	16,7	
Δίδυμη κύηση	Όχι	17	89,5	15	88,2	5	83,3	>0,999
	Ναι	2	10,5	2	11,8	1	16,7	

Πίνακας 7. Σχέση πολυμορφισμού AT1R-Dde με τον τόκο, το φύλο του νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία.

		AT2R-Alu						P Fisher's exact test
		CC		CA		AA		
		N	%	N	%	N	%	
Τόκος	1ος	6	66,7	18	69,2	7	100,0	0,705
	2ος	1	11,1	4	15,4	0	0,0	
	3ος	2	22,2	4	15,4	0	0,0	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	5	55,6	12	46,2	7	100,0	0,066
	Κορίτσι	3	33,3	13	50,0	0	0,0	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	1	11,1	1	3,8	0	0,0	
Δίδυμη κύηση	Όχι	6	66,7	24	92,3	7	100,0	0,106
	Ναι	3	33,3	2	7,7	0	0,0	

Πίνακας 8. Σχέση πολυμορφισμού AT2R-Alu με τον τόκο, το φύλο του νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία.

Ωστόσο σε αυτή τη περίπτωση δεν βρέθηκε σημαντική σχέση σε κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς (AT1R-Dde και AT2R-Alu) με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη.

Ακολούθως, παρουσιάζεται η σχέση των πολυμορφισμών με την εβδομάδα κύησης στην ομάδα με προεκλαμψία:

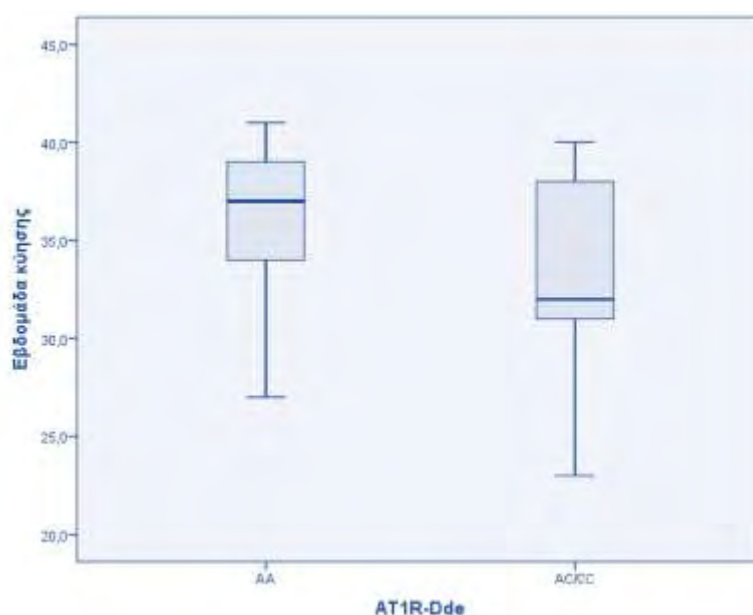
		Εβδομάδα κύησης		P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)		
AT1R-Dde	AA	33 (31 - 34)		0,037 ⁺
	AC	31 (30 - 32)		
	CC	32 (32 - 34)		
AT2R-Alu	CC	30 (28 - 32)		0,020 ⁺
	CA	33 (32 - 34)		
	AA	31 (29 - 32)		
	CT/TT	32 (31 - 34)		
AT1R-Dde	AA	33 (31 - 34)		0,022 ⁺⁺
	AC/CC	32 (30 - 32)		
AT2R-Alu	CC	30 (28 - 32)		0,042 ⁺⁺
	CA/AA	32 (31 - 34)		

⁺Kruskal-Wallis test ⁺⁺Mann-Whitney test

Πίνακας 9. Σχέση των πολυμορφισμών με την εβδομάδα κύησης στις γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία.

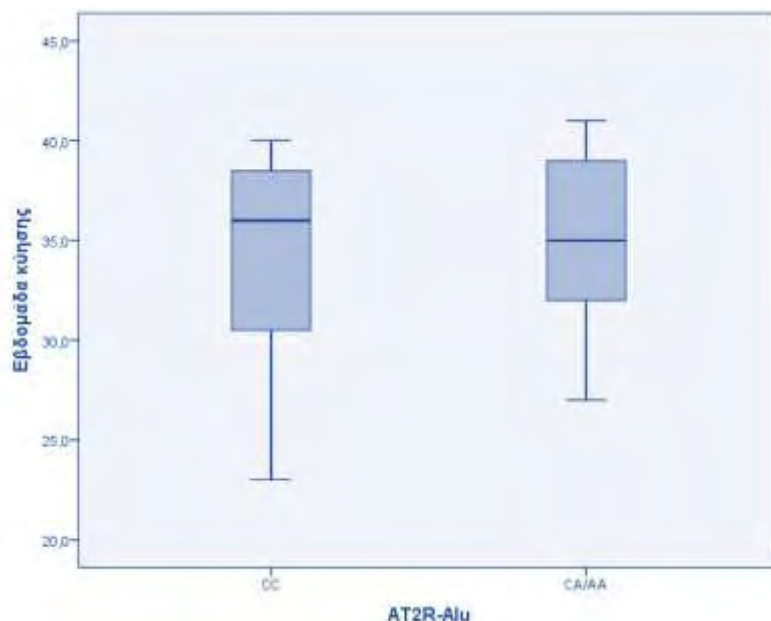
Σε αυτή τη περίπτωση διαπιστώθηκε ότι σημαντικά χαμηλότερη εβδομάδα τοκετού είχαν οι γυναίκες που ήταν AC/CC στο AT1R-Dde και CA/AA στο AT2R-Alu.

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανομή της εβδομάδας τοκετού ανάλογα με την έκφραση του AT1R-Dde (Γράφημα 2):



Γράφημα 2. Κατανομή εβδομάδας τοκετού ανάλογα με την έκφραση του παθολογικού αλληλομόρφου AC/CC του AT1R-Dde

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανομή της εβδομάδας τοκετού ανάλογα με την έκφραση των παθολογικών αλληλομόρφων του AT2R (Γράφημα 3):



Γράφημα 3. Κατανομή εβδομάδας τοκετού ανάλογα με την έκφραση του παθολογικού αλληλομόρφου CA/AA του AT2R-Alu.

Τέλος, μελετήθηκε η σχέση των πολυμορφισμών με το βάρος της γέννησης στην ομάδα με την προεκλαμψία η οποία ωστόσο δεν εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα (Πίνακας 10).

		Βάρος γέννησης (gr)	P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
AT1R-Dde	AA	1830 (1080 - 2360)	0,611
	AC	1450 (1258 - 2070)	
	CC	1690 (1420 - 1800)	
AT2R-Alu	CC	1440 (800 - 1985)	0,260
	CA	1775 (1420 - 2140)	
	AA	1340 (890 - 2315)	
AT1R-Dde	AA	1830 (1080 - 2360)	0,333
	AC/CC	1530 (1300 - 2000)	
AT2R-Alu	CC	1440 (800 - 1985)	0,256
	CA/AA	1700 (1300 - 2140)	

Kruskal-Wallis test ⁺⁺Mann-Whitney test

Πίνακας 10. Σχέση των πολυμορφισμών με το βάρος της γέννησης στις γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία.

❖ ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προεκλαμψία είναι ένα σοβαρό μαιευτικό πρόβλημα και χαρακτηρίζεται από σημαντικά ποσοστά μητρικής και νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας (Bruce et al., 2006). Η αιτία της παραμένει ουσιαστικά άγνωστη. Διάφορες θεωρίες εστιάζουν στην άποψη ότι η μητροπλακουντιακή ισχαιμία και η βλάβη του ενδοθηλίου αποτελούν τις βασικές προϋποθέσεις εκδήλωσης του συνδρόμου (Fisher et al., 2004; James et al., 2010). Το βασικό χαρακτηριστικό της πρώιμης προεκλαμψίας είναι η ατελής διαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών, η οποία οδηγεί σε υποδιάχυση του πλακούντα και μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο (Dadelszen et al., 2003; Gathiram et al., 2016).

Οι παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο αιτιολογικό μονοπάτι έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολυπληθών ερευνών. Ένας εξ αυτών είναι ο ρόλος του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης (RAAS) ο οποίος έχει ενοχοποιηθεί για πληθώρα νοσημάτων που σχετίζονται με την υπέρταση. Επομένως, γίνεται προσπάθεια για την άμεση σύνδεση των γενετικών πολυμορφισμών του συστήματος οι οποίοι πιθανώς σχετίζονται με την υπέρταση που αποτελεί βασικό κλινικό στοιχείο της νόσου. Οι πολυμορφισμοί που μελετώνται αφορούν τόσο το μετατρεπτικό ένζυμο όσο και άλλα στοιχεία του συστήματος, όπως την αλδοστερόνη, το αγγειοτενσινογόνο, την αγγειοτενσίνη II και τους υποδοχείς τύπου I (AT1R) και τύπου II (AT2R) και την ρενίνη.

Από τους προαναφερόμενους πολυμορφισμούς οι δύο που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι αυτοί των υποδοχέων τύπου I (A1166C του AT1R) και τύπου 2 (C3123A του AT2R). Ο AT1R A1166C του υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II θεωρείται ότι οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία και διεγερσιμότητα άρα και σε επίταση της βλαπτικής δράσης της αγγειοτενσίνης II. Ο εν λόγω πολυμορφισμός έχει συσχετισθεί όχι μόνο με την προεκλαμψία αλλά και με το έμφραγμα μυοκαρδίου, την περιφερική αγγειοπάθεια και την εκλαμψία. Ο πολυμορφισμός αφορά σε αντικατάσταση αδενίνης (A) σε κυτοσίνη (C) στο 1166 νουκλεοτίδιο της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής του mRNA για τον AT1 υποδοχέα και εντοπίζονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 3 στη θέση 24 χωρίς να δημιουργεί αλλαγή της μορφολογίας του υποδοχέα (De Gasparo et al., 2000).

Ο ακριβής ρόλος του υποδοχέα τύπου II δεν έχει αποσαφηνιστεί ωστόσο οι μελέτες δείχνουν ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας AT2R ενεργοποιείται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις (υπέρταση, έμφραγμα και μυοκαρδιοπάθειες) και λειτουργεί «έναντι» στη δράση του υποδοχέα τύπου I AT1R (Lopez et al., 1994; Henrion et al., 2001). Η μελέτη των πολυμορφισμών που αφορούν τους συγκεκριμένους υποδοχείς αποτελούν αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητών που ακόμα βρίσκονται εν εξελίξει (Jin et al., 2003). Το γονίδιο των υποδοχέων AT2 εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα και ο υπό μελέτη πολυμορφισμός A3123C στο εξόνιο 3. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με την αρτηριακή πίεση στους νεαρούς άνδρες καθώς και με την στεφανιαία νόσο, την υπερτροφία του μυοκαρδίου στις γυναίκες και τη διαβητική νεφροπάθεια (Katsuya et al., 1999).

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια συσχέτισης των παραπάνω πολυμορφισμών με την προεκλαμψία. Η έρευνα μας συμπεριέλαβε στους πολυμορφισμούς και τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν σε αυτή.

Είναι γεγονός ότι όταν η προεκλαμψία εμφανίζεται σε κύηση μεγαλύτερη των 37 εβδομάδων, ακολουθεί διακοπή της κύησης, ανεξαρτήτως της βαρύτητας της νόσου, καθώς το έμβρυο από άποψη αναπνευστικής λειτουργίας θεωρείται ικανό να επιβιώσει. Η διακοπή της κύησης γίνεται είτε με τεχνητή πρόκληση τοκετού είτε με καισαρική τομή (Hauth et al., 2000). Στη περίπτωση όπου η κύηση είναι μικρότερη των 37 εβδομάδων και συνοδεύεται από σοβαρή προεκλαμψία ή εκλαμψία, ακολουθείται και πάλι διακοπή της κύησης διότι θα οδηγήσει σε επιδείνωση της κατάστασης της μητέρας και του εμβρύου (Sibai et al., 2003). Επομένως, είναι προφανές ότι τα περιστατικά προεκλαμψίας συνοδεύονται, κατά κύριο λόγο από πρόωρους τοκετούς και λιγότερες εβδομάδες κύησης από ότι η συντριπτική πλειοψηφία των φυσιολογικών κυήσεων. Το συμπέρασμα αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία και με το αποτέλεσμα της δικής μας μελέτης. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα Γ4.1 το ποσοστό πρόωρου τοκετού δηλαδή ο τοκετός σε μικρότερη εβδομάδα κύησης βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στις γυναίκες με προεκλαμψία (Πίνακας 3). Όπως είναι αναμενόμενο, τα πρόωρα νεογνά θα έχουν χαμηλότερο βάρος από ότι τα νεογνά που συμπλήρωσαν τον προβλεπόμενο αριθμό φυσιολογικών εβδομάδων κύησης, η παρατήρηση αυτή ήταν εύκολο να διαπιστωθεί και στη δική μας μελέτη (Πίνακας 3).

Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις προεκλαμψίας πριν την 34^η εβδομάδα, συστήνεται ο πρόωρος τοκετός υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις στη περίπτωση που παρά την εμφάνιση της προεκλαμψίας η κατάσταση της μητέρας είναι σταθερή και η κατάσταση του εμβρύου καθησυχαστική. Μελέτες που σύγκριναν την επιλογή του άμεσου τοκετού με την επιλογή της αναμονής, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η νοσηρότητα που σχετίζεται με την προωρότητα του εμβρύου μπορεί να μειωθεί με την επιλογή της αναμονής (Haddad et al., 2004). Σε κήση μικρότερη των 34 εβδομάδων όπως οι κήσεις που συμπεριλήφθηκαν και στη μελέτη της παρούσας εργασίας, εάν εκδηλωθεί ήπια προεκλαμψία μπορεί να αποφασιστεί αναβολή του τοκετού και εξασφαλίζοντας στενή παρακολούθηση της μητέρας και του εμβρύου αλλά εάν η προεκλαμψία εκδηλωθεί με βαριά κλινική εικόνα που θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση της μητέρας ή του εμβρύου τότε η μόνη επιλογή είναι ο πρόωρος τοκετός. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, το είδος και η συχνότητα των εξετάσεων στη περίπτωση που αποφασισθεί αναμονή του τοκετού εξαρτάται κυρίως από την ηλικία κήσεως αλλά και από την σοβαρότητα της κατάστασης της μητέρας και εφόσον μπορεί να εξασφαλισθεί ο μη περιορισμός ανάπτυξης του εμβρύου (Sibai et al., 2003).

Όσον αφορά την ύπαρξη των πολυμορφισμών στις προεκλαμπτικές γυναίκες, στη δική μας ανάλυση, διαπιστώθηκε μια τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού A1166C του γονιδίου AT1R με την προεκλαμψία. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα προεκλαμπτικών γυναικών βρέθηκε σημαντικά υψηλό ποσοστό ομόζυγων και ετερόζυγων για τον πολυμορφισμό A1166C γυναικών (Πίνακας 4).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι γυναίκες που έφεραν έστω και ένα παθολογικό αλληλόμορφο που οδηγεί σε γονότυπο AC ή CC είχαν σημαντικά αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν προεκλαμψία (Πίνακας 5). Πιο αναλυτικά, οι AC γονότυποι φέρουν διπλάσια πιθανότητα (OR=2,68) να εμφανίσουν προεκλαμψία σε σχέση με τον φυσιολογικό γονότυπο AA. Η δε παρουσία είτε του AC είτε του CC παθολογικού αλληλομόρφου αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας σε 3,03 (OR).

Η στατιστικά σημαντική ύπαρξη του A1166C του AT1R συμφωνεί με την πληθώρα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας που αναφέρει την συσχέτιση του με τις παθολογικές καταστάσεις στις οποίες βασικό χαρακτηριστικό είναι η αυξημένη δραστηριότητα της αγγειοτενσίνης II (Bonnardeaux et al., 1994; Shamma et al., 2016). Πρόσφατα

ευρήματα αναφέρουν ότι η ύπαρξή αυτού του πολυμορφισμού, μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της προεκλαμψίας (Shamma et al., 2016). Παρόλο, που τα ευρήματα δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με την κλινική εκδήλωση της προεκλαμψίας, δεν είναι σαφές εάν δηλώνει προδιάθεση της διαταραχής. Σε μελέτες διαφόρων πληθυσμών τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα (Shamma et al., 2016; Nalogowska et al., 2000). Οι Procorciuc et al., έδειξαν ότι ο A1166C AT1R πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας. Μάλιστα, έδειξαν ότι ανεξάρτητα από τον μητρικό γονότυπο, και κάποιοι νεογνικοί πολυμορφισμοί μεταξύ των όποιων και ο A1166C AT1R, σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Procorciuc et al., 2011). Αντίθετη άποψη έχουν σύμφωνα με την μελέτη τους ο Li και οι συνεργάτες του, οι οποίοι υποστηρίζουν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν σχετίζεται με τις υπερτασικές διαταραχές που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της κύησης (Li et al., 2015).

Ο πολυμορφισμός που αφορά το γονίδιο AT2R δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την προεκλαμψία γεγονός που συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Πίνακας 4 και 5). Είναι γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί που αφορούν το γονίδιο AT2R δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ο υπό μελέτη πολυμορφισμός C3123A έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις όπως η υπέρταση, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η υπερτροφική καρδιομυοπάθεια και η στεφανιαία νόσος. Ωστόσο λίγες αναφορές έχουν γίνει σχετικά με την σύνδεση του με την αρτηριακή πίεση (Hazzani et al., 2014; Miyaki et al., 2006). Η πλειοψηφία των ερευνών αλλά και η δική μας έρευνα συμφωνεί ότι ο πολυμορφισμός δεν δηλώνει προδιάθεση εμφάνισης της προεκλαμψίας (Zhang et al., 2006, Kabadou et al., 2012, Li et al., 2015).

Στην ομάδα γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία μελετήθηκαν ταυτόχρονα η παρουσία των εν λόγω πολυμορφισμών και ορισμένων κλινικών στοιχείων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον.

Αρχικά, μελετήθηκε η πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας παρουσία των παθολογικών αλληλομόρφων για το A1166C του AT1R λαμβάνοντας υπόψιν το βάρος γέννησης αλλά και την εβδομάδα γέννησης (Πίνακας 6). Από αυτή την ανάλυση υπήρξε μια μικρή αύξηση των λόγων που προέκυψαν. Πιο αναλυτικά, η πιθανότητα

για τις AC γίνεται από 2,68 που είχαν λαμβάνοντας υπόψιν μόνο την παρουσία του παθολογικού αλληλομόρφου αυξήθηκε σε 2,70. Αντίστοιχα, οι γυναίκες που έφεραν είτε AC είτε CC σε συνδυασμό με το βάρος γέννησης του νεογνού και την εβδομάδα γέννησης αυξήσαν την πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας από 3,03 σε 3,05 (Πίνακας 6). Αντίθετα, η πιθανότητα προεκλαμψία λαμβάνοντας υπόψιν μόνο το βάρος γέννησης δεν εμφάνισε καμία σημαντικά στατιστική σχέση σε κανένα από τους δυο υπό μελέτη πολυμορφισμούς (πίνακας 10).

Στη συνέχεια, με αφορμή τα στοιχεία που αναφέρουν ως παράγοντα κινδύνου τον τόκο και την πολύδυμη κύηση (Duckitt et al., 2005; Skjaerven et al., 2004; Wen et al., 2004), έγινε μια προσπάθεια μελέτης της πιθανότητας εμφάνισης προεκλαμψίας λόγω της παρουσίας των παθολογικών αλληλομόρφων σε συνδυασμό με τον τόκο, το φύλο του νεογνού και της πιθανότητας μιας δίδυμης κύησης, ωστόσο δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 7).

Το εύρημα που παρατηρήθηκε και στους δύο πολυμορφισμούς ήταν η σχέση της ύπαρξης των πολυμορφισμών με την εβδομάδα κύησης στις προεκλαμπτικές γυναίκες. Πιο επεξηγηματικά, οι προεκλαμπτικές γυναίκες που έφεραν είτε τα παθολογικά αλληλόμορφα AC/CC του γονιδίου AT1R είτε τα παθολογικά αλληλόμορφα CA/AA του γονιδίου AT2R γέννησαν σε μικρότερη εβδομάδα κύησης από αυτές που έφεραν τα φυσιολογικά για τους πολυμορφισμούς αλληλόμορφα (Πίνακας 9, Γράφημα 2 και 3). Το εύρημα αυτό είναι αξιοσημείωτο αλλά χρειάζεται διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Η ταυτοποίηση των γυναικών που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας θα συμβάλει θετικά στην πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική διαχείριση της νόσου. Μελέτες προτείνουν την χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης προληπτικά (πριν από τη 12η εβδομάδα της κύησης) όπως επίσης και η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου (≥ 1 g / ημέρα) (English et al., 2015).

Είναι προφανές ότι, οι μέθοδοι πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας της προεκλαμψίας αποτελούν ακόμη μια σημαντική πρόκληση. Οι γενετικές μελέτες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες ειδικά σε πολυσυστηματικές ασθένειες όπως η προεκλαμψία. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων, ο κλινικός φαινότυπος των προσβεβλημένων ατόμων επηρεάζεται επίσης από αλληλεπιδράσεις γονιδίων και του

περιβάλλοντος. Οι μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να επικεντρωθούν στον εντοπισμό δεικτών πρόωμης διάγνωσης ώστε να περιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης των σοβαρών επιπλοκών της νόσου που θέτουν σε κίνδυνο την υγεία της μητέρας και του εμβρύου. Επιπλέον, θα είναι επωφελείς οι μελέτες να μπορούν να διασαφηνίσουν τη συμμετοχή και αλληλεπίδραση των γονότυπων της μητέρας και του εμβρύου, στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (Williams, et al. 2011).

Στόχος των επόμενων ετών θα αποτελέσει αδιαμφισβήτητα ο περαιτέρω εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, ή γονίδια τα οποία κωδικοποιούν αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες καθώς και αυτά που σχετίζονται με τη φυσιολογική ή μη ανοσολογική αλληλεπίδραση μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν μελέτες με μεγάλο αριθμό περιπτώσεων και με πλήρη καταγραφή του ιστορικού και της κλινικής εκδήλωσης του συνδρόμου. Σε αυτή τη περίπτωση η μαζική παράλληλη αλληλούχιση και ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός συστοιχιών (array CGH) θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας και ίσως θα συνέβαλε στην εφαρμογή ασφαλών δεικτών που θα μπορούσαν να προβλέπουν την προδιάθεση ορισμένων γυναικών για την εμφάνιση προεκλαμψίας έτσι ώστε να τους προσφερθεί κατάλληλη περιγεννητική φροντίδα, στοχευμένη θεραπεία και αυστηρή παρακολούθηση. Στην περίπτωση της προεκλαμψία, ένας ιδανικός βιοδείκτης θα ήταν ικανός να προβλέψει την νόσο κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου όταν η πλακουντοποίηση βρίσκεται σε εξέλιξη και το σύστημα έχει τη δυνατότητα να αναδιαμορφωθεί ή να επωφεληθεί από την πιθανή χρήση φαρμακευτικών αγωγών (Haram et al., 2014; Jadli et al., 2015).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ενθαρρυντικά, καθώς φάνηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού AT1R A1166C με την εμφάνιση της προεκλαμψίας. Επίσης διαπιστώθηκε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας παρουσία παθολογικού αλληλομόρφου (AC/CC του A1166C του AT1R). Τέλος, σημειώθηκαν γεννήσεις σε μικρότερη εβδομάδα κύησης σε προεκλαμπτικές γυναίκες που έφεραν τα παθολογικά αλληλόμορφα και του AT1R(AC/CC) αλλά και του AT2R (CA/AA) σε σχέση με προεκλαμπτικές γυναίκες που έφεραν τα φυσιολογικά αλληλόμορφα αυτών των πολυμορφισμών. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να εξετασθεί μεγαλύτερος αριθμός φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

❖ **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AbdAlla et al. (2004). Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, vol. 119, pp. 343-354.

Ayorinde et al. (2017). Inherited predisposition to preeclampsia: Analysis of the Aberdeen intergenerational cohort. *Hypertens. Pregnancy*, vol. 8, pp. 37-41.

Bartlett et al. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol.226 (2nd ed.). pp. 3–6.

Bernard et al. (2012). Ultraviolet radiation damages self non-coding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.*, vol. 18, pp. 1286–1290.

Bonnardeaux et al. (1994). Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*, vol. 24(1), pp. 63-69.

Bouchlariotou et al. (2008). Nocturnal hypertension is associated with an exacerbation of the endothelial damage in preeclampsia. *Am J Nephrol.*, vol. 28, pp. 424-430.

Burton et al. (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 25, pp. 287–299.

Burton et al. (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 25, pp. 287–299.

Calicchio et al. (2013). Endothelial dysfunction: Role in the maternal syndrome of preeclampsia and long-term consequences for the cardiovascular system. *Ann Cardiol Angeiol.*, vol. 62(3), pp. 215-220.

Caniggia et al. (2000). Oxygen and Placental Development During the First Trimester: Implications for the Pathophysiology of Pre-eclampsia. *Placenta*, vol. 21, pp. S25-S30.

Chaiworapongsa et al. (2005). Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia.

Chaiworapongsa et al. (2014). Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathology. *Nat Rev Nephrol.*, vol. 10(8), pp. 466-480.

Chaouat et al. (2003). Implantation: can immunological parameters of implantation failure be of interest for preeclampsia? *J Reprod. Immunol.*, vol. 59, pp. 205-217.

Chappell et al. (2006). Searching for genetic clues to the causes of preeclampsia. *Clin Sci.*, vol. 110, pp. 443-458.

Cooper et al. (1993). Genetics of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, vol. 12, pp. 1-23.

Davies (1985). The formation of immune complexes in primiparous and multiparous human pregnancies. *Immunol Lett.*, vol 10, pp. 199-205.

Daviet et al. (2001). Intracellular third loops in AT1 and AT2 receptors determine subtype specificity. *Life Sci.*, vol. 69, pp. 509-516.

Dechend et al. (2009). *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. 3rd Edition, chapter 16, pp. 287–296.

De Gasparo et al. (2000). The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, vol. 52, pp. 415-72.

Doria et al. (1994). DdeI polymorphism in the AGTR1 gene. *Hum Mol Genet.*, vol. 8, pp. 1444.

Duckitt et al. (2005). Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. *BMJ.*, vol 330, pp. 565-571.

Duley (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.*, vol. 3, pp. 130-137.

Engels et al. (2013). Automated measurement of sFlt1, PlGF and sFlt1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. *Hypertens Pregnancy*, vol. 32, pp. 459-473.

Erlich (1989). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 30, pp. 736-736.

Escher et al. (2007). Role of aldosterone availability in preeclampsia. *Mol Aspects Med.*, vol. 2, pp. 245-254.

Ferrario et al. (2006). Role of-angiotensin II in cardiovascular disease: Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, vol. 7, pp. 3-14.

Gant et al. (1980). Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int.*, vol. 18, pp. 253–258.

Gathiram et al. (2016). Pre-eclampsia its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr.*, vol. 27(2), pp. 71–8.

Chaiworapongsa et al. (2005). Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, vol (1), pp. 3-18.

Gibbs (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal. Chem.*, vol 62, pp. 1202-1214.

González-Ballester et al. (2005). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem.*, vol 340(2), pp. 330-335.

Gormley et al. (2017). Preeclampsia: novel insights from global RNA profiling of trophoblast subpopulations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 217, pp.200.e1–200.e17.

Grill, et al. (2009). Potential markers of preeclampsia - a review. *Reprod Biol Endocrinol.*, vol. 7, pp. 70–84.

Gunel et al. (2011). Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet. Mol. Res.*, vol. 10, 4034–4040.

Haddad et al. (2004). Maternal and perinatal outcomes during expectant management of 239 severe preeclamptic women between 24 and 34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2004, vol. 190, pp. 1590-1595.

Haram et al. (2014). Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *J Pregnancy*, vol. 2014, Article ID 910751, 13 pages.

Hauth et al. (2000). Pregnancy outcomes in healthy nulliparous women who subsequently developed hypertension. *Obstet Gynecol* 2000, vol. 95, pp. 24-28.

Henrion et al. (2001). Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: From large arteries to the microcirculation. *Hypertension*, vol. 38, pp. 1150–1157

Herse et al. (2007). Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension.*, vol. 49, pp. 604–611.

Herse et al. (2013). Angiotensin II type 1-Receptor Autoantibody (AT1-AA) -mediated pregnancy hypertension. *Am J Reprod Immunol.*, vol. 69 (4), pp. 413-418.

Hund et al. (2014). Multicenter prospective clinical trial to evaluate the prediction of short-term outcome in pregnant women with suspected preeclampsia (PROGNOSIS): study protocol. *BMC Pregnancy and Childbirth*, vol.14, pp. 324.

Huppertz et al. (1998). Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol.*, vol. 110, pp. 495-508

Irani et al. (2011). Renin Angiotensin Signaling in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Semin Nephrol.*, vol. 1, pp. 47-58.

Jadli et al. (2015). Promising prognostic markers of Preeclampsia: New avenues in waiting. *Thrombosis Research*, vol.136, pp. 189–195.

James et al. (2010). Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *J Pathol.*, vol. 221, pp. 363-378.

- Ichiki et al. (1995). Transcriptional regulation of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circ Res.*, vol. 76, pp. 693–700).
- Jardim et al. (2015). Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia?. *Clin Chim Acta.*, vol. 447, pp. 34-38.
- Jin et al. (2003). Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension. *Hypertens Res*, vol. 26, pp. 547–552.
- Joshi et al. (2011). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, vol 1(5), pp. 81-97.
- Kabadou et al. (2012). Lack of association between C3123A polymorphism of the angiotensin II type 2 receptor gene and hypertension in Tunisian population. *Tunis Med.*, vol. 90(8-9), pp. 619-624.
- Kahhale et al. (2018). Endothelial Mechanisms in Preeclampsia. *Vascular Biology and Vlnical Syndromes*, vol. 45, pp. 655-664.
- Karp et al. (1998). Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, pp. 59-63.
- Katsuya e al. (1999). Gene loci and polymorphisms of angiotensin II receptor. *Nippon Rinsho*, vol. 57, pp. 1020–1027
- Katsuya et al. (1999). Genetic analysis of candidate gene polymorphisms in elderly hypertension. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, vol. 36, pp. 547–552
- Katsuya et al. (2013). Gene Polymorphism of Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors. *Curr Pharm Des.*, vol. 19 (17), pp. 2996-3001.
- Kubashi et al. (2004). A 1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet.*, vol.49, pp. 182-186.
- Lambert et al. (2014). Preeclampsia: an update. *Acta Anaesth. Belg.*, vol. 65, pp. 137-149.
- Laresgoiti-Servitje (2013). A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol.*, vol. 94(2), pp. 247–57.
- Leaños-Miranda et al. (2013). Circulating Angiogenic Factors and Urinary Prolactin as Predictors of Adverse Outcomes in Women With Preeclampsia. *Hypertension*, vol. 61, pp. 1118-1125.
- Levine et al. (2004). Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, vol. 190, pp. 707-713.
- Li et al. (2013). Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, Article ID 970265, 9 pages.

- Li et al. (2015). The effects of gene polymorphisms in angiotensin II receptors on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Hypertens Pregnancy*, vol. 34(2), pp. 241-260.
- Luetscher et al. (1985). Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus: a marker of microvascular complications. *N Engl J Med.*, vol. 312, pp. 1412-1417.
- Lyall (2005). Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy-a review. *Placenta*, vol 26, pp. 31-36.
- Manisha, et al. (2014). Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *J Clin Diagn Res.*, vol 8 (4), pp. BE01-BE04.
- Martin et al. (1995). The sequence and genomic organization of the human type 2 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 209, pp. 554–562.
- Masatoshi et al. (1981). Dna polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, vol. 97 (1), pp. 145-163.
- Maynard et al. (2011). Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol.*, vol. 31(1), pp. 33–46.
- Miyaki et al. (2006). C3123A polymorphism of the angiotensin II type 2 receptor gene and salt sensitivity in healthy Japanese men. *J Hum Hypertens.*, vol. 20, pp. 467-69.
- Morales et al. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, vol. 88, pp. 106–111.
- Morgan et al. (1999). Maternal and fetal angiotensinogen gene allele sharing in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.*, vol. 106, pp. 244–251.
- Mouillet, et al. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol.*, vol. 213 (4), pp. S163-S172.
- Mullis (1986). Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. United States Patent: 4,683,202.
- Mullis (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, vol. 262(4), pp. 56–61. 64–5.
- Nakajima et al. (1995). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 92, pp.10663-10667.
- Nalogowska et al. (2000). Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med Sci Monit.*, vol. 6, pp. 523-529.

Papageorghiou et al. (2005). Uterine artery Doppler screening for adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, vol. 17, pp. 584-590.

Park et al. (2015). Combined Screening for Early Detection of Pre-Eclampsia. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, pp. 17952-17974.

Pearce et al. (2006). Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity.
Peterson et al. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters, vol. 402(2), pp. 331-337.

Pilalis et al. (2007). Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler and PAPP-A at 11–14 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, vol. 29 (2), pp. 135-140.

Pillar et al. (2015). The possible involvement of microRNAs in preeclampsia and gestational diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 29, pp. 176–182.

Poon et al. (2010). Hypertensive disorders in pregnancy: Screening by biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 35, pp. 662–670.

Procopciuc, et al. (2011). Maternal/newborn genotype contribution of the renin-angiotensin system (Met235Thr, Thr174Met, I/D-ACE, A2350G-ACE, A1166C-AT2R1, C3123A- AT2R2, 83A/G-REN) to the risk of pre-eclampsia: a Romanian study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, vol. 12(4), pp. 539-48.

Red-Horse et al. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of maternal-fetal interface. *J Clin Invest.*, vol. 114, pp. 744-754.

Redman et al. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, vol.308(5728), pp. 1592–1594.

Redman et al. (2010). Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.*, vol. 63(6), pp. 534–543.

Roberts (1998). Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.*, vol. 16(1), pp. 5-15.

Roberts et al. (1976). A specific endonuclease from *Arthrobacter luteus*. *Journal of Molecular Biology*, vol. 102, pp. 157-165.

Roberts et al. (2000). Preeclampsia: What We Know and What We Do Not Know. *Seminars in Perinatology*, Vol 24(1), pp. 24-28.

Rodesch et al. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, vol. 80(2), pp. 283–285.

Ros et al. (2000). Genetic effects on the liability of developing preeclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet.*, vol. 91, pp. 256-260.

Sahai, et al. (2017). Pre-eclampsia: Molecular events to biomarkers. *Medical Journal Armed Forces India*, vol. 73 (2), pp. 167-174.

Saito et al. (2003). Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol.*, vol. 59(2), pp. 161–173.

Saito et al. (2007). The role of the immune system in preeclampsia. *Molec Aspects Med.*, vol. 28(2), pp. 192–209

Santillan et al. (2014). Vasopressin in Preeclampsia: A Novel Very-Early Human Pregnancy Biomarker and Clinically-Relevant Mouse Model. *Hypertension.*, vol 64(4), pp. 852–859.

Sibai et al. (2003). Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.*, vol. 102, pp. 181-192.

Stefan et al. (2006). New insights into the biology of preeclampsia. *Biol Reprod.*, vol. 74, pp. 772-776.

Tjoa, et al. (2004). Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertens Pregnancy*, vol. 23, pp. 171-189.

Torry et al. (1998). Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 179, pp. 1539–1544.

Tsiakkas et al. (2016). Maternal serum placental growth factor at 12, 22, 32 and 36 weeks' gestation in screening for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, vol. 47(4), pp. 472-477.

Uzan et al. (2011). Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*, vol. 7, pp. 467–74.

Van Thiel et al. (2015). The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol.*, vol. 763, pp. 3-14.

Vaughan et al. (2002). Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*, vol. 21, pp. 205–223.

Verlohren et al. (2010). An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, vol. 202(2), pp. 161.e1-161.e11.

Vogelstein et al. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 76, pp. 615-619.

Voytas (2001). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Neuroscience*, vol. 11, pp. A.1N.1-A.1N.3.

Weier et al. (1988). A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA*, vol. 7(6), pp. 441-447.

Wikström et al. (2007). Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.*, vol. 109, pp. 1368-1374

Xia et al. (2003). Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig.*, vol. 10, pp. 82-93.

Xia et al. (2007). Potential roles of angiotensin receptor-activating autoantibody in the pathophysiology of preeclampsia. *Hypertension*, vol. 50, pp. 269-275.

Yan et al. (2013). Screening for preeclampsia pathogenesis related genes. *Eyr Rev Med Pharmacol Sci.*, vol. 22, pp. 3083-3094.

Yu et al. (2005). An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women. *Am J Obstet Gynecol.*, vol. 193, pp. 429-436.

Zhang et al. (2006). Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms and cardio protective role in essential hypertension. *Heart Vessels*, vol. 21, pp. 95-101.

Zhang et al. (2013). MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncol. Rep.*, vol. 27, pp. 594-598.

Zhang et al. (2017). The Gene Variants of Maternal/Fetal Renin-Angiotensin System in Preeclampsia: A Hybrid Case-Parent/Mother-Control. *Sci Rep.*, vol. 7, pp. 5087-5095.

Zhao et al. (2012). Association of maternal AGTR1 polymorphisms and preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, vol. 12, pp. 2676-2680.

Zhou et al. (2007). Angiotensin II induces soluble fms-Like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. *Circ Res.*, vol. 100(1), pp. 88-95.

Zulfikaroglu et al. (2014). Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in preeclampsia, *J Obstet Gynaecol Res.*, vol. 37, pp. 1198-1202.

Warnecke et al. (1999). Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements. *Biochem J*, vol. 340, pp. 17-24