



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

**«ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RENIN (C5312T, rs12750834) ΜΕ ΤΗΝ
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ»**

ΧΑΜΟΚΕΡΙΔΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2018

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1ος Εξεταστής (Επιβλέπουσα): Μαρία Σάτρα,

Ε.ΔΙ. Π. Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2ος Εξεταστής: Νικόλαος Βαμβακόπουλος,

Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3ος Εξεταστής: Μαρία Σαμαρά,

Επίκουρη Καθηγήτρια, Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιολογία της Αναπαραγωγής» στο Εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους καθηγητές τους οποίους γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, Δρ. Μαρία Σάτρα, για την πολύτιμη καθοδήγηση της και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Εν συνεχεία, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στα άλλα δύο μέλη της επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Σαμαρά για τις συμβουλές τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, καθώς και σε όλους τους καθηγητές για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την γραμματεία του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια μου, για την στήριξη και την συμπαράσταση που μου πρόσφεραν, ώστε να φτάσω στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θεοδώρα Χαμοκερίδου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

Όνοματεπώνυμο: Θεοδώρα Χαμοκερίδου
Τόπος Γέννησης: Θεσσαλονίκη
Διεύθυνση κατοικίας: Γιαννιτσά
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: chamokeridou@hotmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ:

2017-2018: Παρακολούθησα το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών με τίτλο << Βιολογία της Αναπαραγωγής >>, στο Πανεπιστήμιο της Θεσσαλίας.

2013-2016: Αποφοίτηση από το Πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας (Ιταλία) στο τμήμα της Ιατρικής και Φαρμακευτικής Βιοτεχνολογίας με κατεύθυνση στην Ιατρική και Διαγνωστική Βιοτεχνολογία (Μεταπτυχιακός τίτλος σπουδών, διάρκειας δύο ετών).

2011: Αποφοίτηση από τη σχολή Θετικών Σπουδών στο τμήμα Βιολογικών επιστημών με κατεύθυνση στην Βιοιατρική από το Πανεπιστήμιο "La Sapienza" της Ρώμης (Ιταλία).

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2017: Ξεκίνησα να εργάζομαι από 15 Ιουνίου έως σήμερα σε μικροβιολογικό εργαστήριο.

Παρέδιδα ιδιαίτερα μαθήματα του αντικείμενου μου, τόσο κατά την διάρκεια των σπουδών μου όσο και έπειτα από αυτές (έως Ιούνιο 2017).

2016-2017: Εθελοντική εργασία σε μικροβιολογικό εργαστήριο για 2 μήνες.

2014-2015: Πραγματοποίηση εξάμηνης (7 περίπου μήνες) πρακτικής άσκησης και εκπόνηση πειραματικής πτυχιακής εργασίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα), ως εξωτερικός υπότροφος από το πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ:

Ίδρυμα/Εργαστήριο: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας/ Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών
Χρονική διάρκεια: 01/09/2014 - 18/03/2015
Επιβλέπων Καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος - Στάγκος Δημήτριος.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

1) Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs (Makri S¹, Kafantaris I¹, Stagos D¹, **Chamokeridou T¹**, Petrotos K², Gerasopoulos K³, Mpesios A¹, Goutzourelas N¹, Kokkas S², Goulas P², Komiotis D¹, Kouretas D⁴ **Food Chem Toxicol. 2017 Apr; 102:24-31**).

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

Από το πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο πανεπιστήμιο της Θεσσαλίας (ως εξωτερικός υπότροφος).

**«ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RENIN (C5312T, rs12750834)
ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ».**

ΘΕΟΔΩΡΑ ΧΑΜΟΚΕΡΙΔΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σύμβουλος: Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος: Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια, Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η προεκλαμψία, σοβαρή διαταραχή που εμφανίζεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές και έχει επιπτώσεις τόσο στη μητρική υγεία και στην ανάπτυξη του εμβρύου, όσο και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία της μητέρας και των απογόνων. Τα αίτια πρόκλησης της πολυσυστημικής αυτής διαταραχής είναι πολυάριθμα, ποικίλουν και η παθοφυσιολογία της νόσου είναι ανεπαρκώς μελετημένη και ελλιπώς κατανοητή. Η παρουσία της διαταραχής περικλείει μηχανισμούς όπως το οξειδωτικό στρες, η ανοσολογική δυσανεξία μεταξύ του εμβρυοπλάκουντιακού και του μητρικού ιστού και η αγγειογόνος ανισορροπία. Το κυκλοφορικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) και η αλληλουχία των σηματοδοτικών αντιδράσεων που εμπεριέχει, αποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών, αποτελώντας στο σύνολο του στόχο αποτύπωσης βιοχημικών δεικτών της προεκλαμψίας. Το σύστημα περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τις πρωτεΐνες, ρενίνη REN, το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης ACE, την αγγειοτενσίνη-1, την αγγειοτενσίνη-2, τον υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης 2 και τον υποδοχέα τύπου 2 της αγγειοτενσίνης 2. Το ένζυμο ρενίνης συντίθεται και απελευθερώνεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα των νεφρικών αρτηριολίων, σε απόκριση της χαμηλής αρτηριακής πίεσης και του χαμηλού κυκλοφορικού νατρίου και καταλύει το πρώτο βήμα στην οδό ενεργοποίησης της αγγειοτενσίνης, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση της αλδοστερόνης, την αγγειοσυστολή και την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Στην μελέτη που ακολουθεί εξετάσαμε την συσχέτιση του πολυμορφισμού του γονιδίου της ρενίνης C5312T, rs12750834 με την προεκλαμψία, συνεχίζοντας τις μελέτες και προηγούμενες αναφορές που το θέλουν να έχει ρόλο στην γένεση της διαταραχής. Για το σκοπό αυτό απομονώσαμε DNA από το

περιφερικό αίμα 42 γυναικών χωρίς προεκλαμψία και 42 γυναικών με πρώιμη προεκλαμψία μετά την τελευταία κύηση τους. Τμήμα του γονιδίου της ρενίνης πολλαπλασιάστηκε με PCR και πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο Dde I. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού C5312T του γονιδίου Renin με την προεκλαμψία. Ο πολυμορφισμός C5312T είναι μία παραλλαγή του γονιδίου Renin του ανθρώπου, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει τη δράση του υποκινητή, με αποτέλεσμα διαφορές στην έκφραση του γονιδίου της ρενίνης και την αρτηριακή πίεση του αίματος. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, ωστόσο απαιτείται η διεξαγωγή μελετών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Summary

Pre-eclampsia is a serious disorder occurring during pregnancy, can lead to serious complications and affects both maternal health and fetal development, as well as exerting long-term effects on maternal and offspring health. The causes of the multi-systemic disorder are numerous, vary and the pathophysiology of the disease is poorly studied and poorly understood. The presence of the disorder includes mechanisms such as oxidative stress, immune intolerance between the embryonic and maternal tissue and angiogenic imbalances. The renin-angiotensin (RAS), circulation system and the sequence of signal interactions it contains demonstrate its important role in regulating arterial pressure and electrolyte balance, all of which are goals for mapping biochemical markers in pre-eclampsia. The system includes, among others, the proteins, REN renin, angiotensin ACE, angiotensin I, angiotensin II, angiotensin II type 1 receptor and angiotensin II receptor type 2. The renin enzyme is synthesized and released by renal arteriolar cells in response to low blood pressure and low circulating sodium chloride and catalyzes the first step in the angiotensin activation pathway leading to the release of aldosterone vasoconstriction and increased blood pressure. In the following association study, we examined the correlation of appearance of the polymorphism at the renin gene, C5312T rs12750834 with pre-eclampsia, continuing the studies and previous reports that wanted it to have a role in the generation of the disorder. For this purpose we isolated DNA from the peripheral blood of 42 women without pre-eclampsia and 42 women with pre-eclampsia after their last pregnancy. A portion of the renin gene was amplified by PCR and digested with the enzyme Dde I. Results indicate that the polymorphism C5312T of the Renin gene and pre-eclampsia have possible association. Polymorphism C5312T is a variant of the human Renin gene, which may affect the action of the promoter, with variations

in the expression of the renin gene and arterial blood pressure. Our results are consistent with the literature, however, it is necessary to conduct investigations with larger number of samples in order to reach on safe conclusions.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Summary	8
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
A.1. Ορισμός προεκλαμψίας	12
A.2. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά.....	14
A.3. Αιτιολογία νόσου.....	16
A.3.1. Παθοφυσιολογία και κλινική εικόνα.....	17
A.4. Μοριακοί και βιοχημικοί δείκτες	24
A.5. Η γενετική της προεκλαμψίας	28
A.5.1. Υποψήφια γονίδια	29
A.6. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS).....	36
A.6.1 Σύστημα (RAS) και προεκλαμψία.....	37
A.7. Πολυμορφισμοί, στερεοχημικές αλλαγές πρωτεϊνών, οι ρόλοι και η σύνδεση τους με την παθοφυσιολογία της νόσου	40
A.8. Το γονίδιο της ρενίνης και ο C5312T, rs12750834 πολυμορφισμός στην ανάπτυξη της διαταραχής.....	45
A.9. Σκοπός της μελέτης	50
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
B.1. Προς μελέτη πληθυσμοί	51
B.2. Προετοιμασία του DNA	51
B.3. Γονότυπος.....	52
B.4. Μελέτη του πολυμορφισμού SNP «C5312T» , rs12750834, του γονιδίου RENIN	53
B. 4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	53
B.4.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης για επιβεβαίωση του προϊόντος PCR	54
B.4.3. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού	55
B.4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση των υποβληθέντων σε πέψη δειγμάτων	56
B.4.5. Υλικά, αναλώσιμα και αντιδραστήρια.....	56

B.4.6. Μέθοδοι για στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων	57
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
Γ.1. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων της PCR.....	58
Γ.2. Πέψη αλληλουχίας.....	58
Γ.3. Γονότυποι - Κλινικά Χαρακτηριστικά	60
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
Βιβλιογραφία.....	71

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Ορισμός προεκλαμψίας

Κατά την διάρκεια της κύησης συχνά παρουσιάζεται ποικιλία παθήσεων. Προβλήματα υγείας κατά την κύηση μπορεί να εμφανιστούν και μάλιστα δίχως να προϋπάρχουν. Οι πολλές και έντονες παθοφυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της κύησης στο γυναικείο σώμα και την γυναικεία φυσιολογία, συνεισφέρουν στην εμφάνιση παθήσεων (Redman *et al.*, 1999). Από τις αρχές του 18ου αιώνα η υπερτασική νόσος της κύησης είναι γνωστή και έχει λάβει ποικίλες ονομασίες, όπως α) σπασμοί της κύησης, β) σπασμοί της λοχείας, γ) τοξιναιμία της κύησης, και δ) προεκλαμψία (Brown *et al.*, 2001). Η προεκλαμψία είναι μία σοβαρή πολυσυστημική διαταραχή, που εμφανίζεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και η οποία αν αφηθεί χωρίς θεραπεία ή δεν διαγνωστεί εγκαίρως, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές την έγκυο καθώς και το έμβρυο. Η προεκλαμψία αποτελεί στάδιο και προηγείται της εκλαμψίας, πολύ επικίνδυνης κατάστασης. Η προεκλαμψία έχει επιπτώσεις στη μητρική υγεία, στην ανάπτυξη του εμβρύου, αλλά και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τόσο στην υγεία της μητέρας όσο και των απογόνων της (Zeeman, 2009).

Η προεκλαμψία εμφανίζεται συνήθως μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης και μπορεί να υφίσταται ακόμα και για 4 έως 6 εβδομάδες μετά τον τοκετό και δύναται να αυξήσει τη μητρική και την εμβρυική νοσηρότητα και θνητότητα (Gathiram and Moodley, 2016). Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται από υπέρταση, με συστολική αρτηριακή πίεση ίση ή ανώτερη των 140mmHg και διαστολική αρτηριακή πίεση ίση ή ανώτερη των 90mmHg. Η πρωτεϊνουρία ή λευκωματουρία, δηλαδή η παρουσία πρωτεΐνης στα ούρα, χαρακτηρίζει επίσης τις πάσχουσες και προσδιορίζεται μέσω γενικής εξέτασης ούρων μετά από τις 20 εβδομάδες κύησης (Uzan *et al.*, 2011).

Η προεκλαμψία χωρίζεται σε τύπους, ο διαχωρισμός των οποίων βασίζεται στο χρόνο εμφάνισης ή στον χρόνο αναγνώρισης και διάγνωσης της νόσου. Οι δύο κύριοι τύποι, είναι η πρόιμης και η καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία. Στην πρόιμης έναρξης προεκλαμψία, τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται πριν από την 33^η εβδομάδα κύησης, ξεκινώντας πιθανώς και από την 20^η εβδομάδα, ενώ στην καθυστερημένης έναρξης εμφανίζονται κατά ή και μετά από την 34^η εβδομάδα. Οι δύο τύποι παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες παθοφυσιολογικών και αιτιολογικών οδών, καθώς και ποικίλουν σε νοσηρότητα εξαρτώμενη από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, όπως αυτοί παρατηρούνται σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών (Zhong *et al.*, 2010). Η θρομβοπενία με τον αριθμό των αιμοπεταλίων μικρότερο των 100.000 ανά μl, η νεφρική ανεπάρκεια με την κρεατινίνη του ορού να βρίσκεται με συγκέντρωση μεγαλύτερη του 1,1mg ανά dl, η εξασθενημένη ηπατική λειτουργία, το πνευμονικό οίδημα, τα εγκεφαλικά ή οπτικά προβλήματα, αποτελούν πιθανά συμπτώματα και των δύο τύπων της διαταραχής (Redman and Sargent, 2005). Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε διαφορετικούς συνδυασμούς, η σοβαρότητα των οποίων εξαρτάται από την ηλικία και την εθνοτική καταγωγή.

Παρά τις δεκαετίες έρευνας, η παθογένεση και η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας εξακολουθούν να είναι ανεπαρκώς ή ελλιπώς μελετημένες. Η παθογόνος διαδικασία της διαταραχής ξεκινά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, πολύ πριν εμφανιστούν ή διαγνωστούν τα όποια κλινικά συμπτώματα. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να εντοπιστούν μέχρι και σήμερα πρόωροι βιοδείκτες, που θα βελτιώσουν την διάγνωση και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Huppertz, 2008). Οι κύριοι λόγοι για αυτό είναι η πολυπαραγοντική αιτιολογία της διαταραχής, η συμβολή των περιβαλλοντικών συνθηκών, η φυλοσύνδετη παρουσία της διαταραχής και η ηθική διάσταση της μελέτης της νόσου, καθώς είναι δύσκολο να διεξαχθούν επιστημονικές

μελέτες σε πρώιμες εγκυμοσύνες, διότι αυτές μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο τόσο τη μητέρα όσο και το έμβρυο. Συμπερασματικά, η ανεπαρκής ανάπτυξη του πλακούντα είναι η βασική αιτία εμφάνισης της πρώιμης έναρξης προεκλαμψίας. Η κατανόηση ανάπτυξης του πλακούντα σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες και η σύγκριση του με τις παθολογικές αναπτύξεις του είναι απαραίτητη για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας, είτε αυτή είναι πρώιμης, είτε καθυστερημένης έναρξης.

A.2. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Υπερτασικές διαταραχές περιπλέκουν το 6-8% όλων των κυήσεων, με το 3-4% να περιπλέκεται από την προεκλαμψία (Brown, 2003). Υπερτασικές διαταραχές της εγκυμοσύνης αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 18% όλων των θανάτων μητέρων παγκοσμίως, με εκτιμώμενους 62.000-77.000 θανάτους ετησίως (Khan *et al.*, 2006). Η παγκόσμια επικράτηση της προεκλαμψίας κυμαίνεται περίπου στο 3% - 8% στις δυτικές χώρες και είναι πολύ υψηλότερη στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σχετίζεται με την εθνικότητα (Carty *et al.*, 2010 and Uzan *et al.*, 2011) οδηγώντας σε πάνω από οχτώ εκατομμύρια περιπτώσεις κάθε χρόνο (Villar *et al.*, 2003). Η προεκλαμψία σχετίζεται άμεσα με το 10% -15% των μητρικών θανάτων, σχετίζεται άμεσα με την εκλαμψία (Duley, 2009) και για κάθε θάνατο γυναίκας, υπολογίζεται ότι 20 άλλες υποφέρουν από σοβαρή νοσηρότητα ή αναπηρία (Abalos *et al.*, 2014). Ο κίνδυνος προεκλαμψίας αυξάνεται από 2 έως 5 φορές σε έγκυες γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό της διαταραχής (Zhang *et al.*, 1997). Ο ρυθμός εκδήλωσης της πρώιμης έναρξης προεκλαμψία έχει βρεθεί 0.38 ανά 100 γεννήσεις και της καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία, 2.72 ανά 100 γεννήσεις (Lisonkova and Joseph, 2013).

Τόσο στις ομάδες με προεκλαμψία όσο και στις ομάδες με εκλαμψία, η επαγωγή του τοκετού, οι καισαρικές τομές και οι πρόωρες γεννήσεις καθώς και το ρίσκο θανάτου

είναι σχετικά συχνότερα από ότι στις ομάδες εγκύων γυναικών χωρίς αυτές τις συνθήκες (Abalos *et al.*, 2014). Δεδομένα από μελέτες σε πάνω από 25 χώρες δείχνουν συμπερασματικά πως η διαταραχή της προεκλαμψίας δείχνει μεγάλες ανισότητες εμφάνισης παγκοσμίως, από το 0,20% στο Βιετνάμ έως το 6,71% στη Μογγολία (Souza *et al.*, 2011). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η πρόσβαση στην κατάλληλη φροντίδα της μητέρας είναι πολλές φορές ανέφικτη, η προεκλαμψία αποτελεί μείζον πρόβλημα και τα ποσοστά του μητρικού θανάτου βρίσκονται στο 15% σε σύγκριση με εκείνα των βιομηχανικών χωρών που κυμαίνονται μεταξύ του 0% και 1,8% (Ghulmiyyah και Sibai, 2012).

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν πως από το 1990 έως το 2010 ο ρυθμός εμφάνισης της μητρικής χρόνιας υπέρτασης είχε σχεδόν διπλασιαστεί στις Ηνωμένες Πολιτείες, αύξηση η οποία εν μέρει οφειλόταν και μέχρι σήμερα οφείλεται στην αύξηση της παχυσαρκίας, αλλά και της ηλικίας των μητέρων (Martin *et al.*, 2011). Τα μεγαλύτερα ποσοστά αύξησης της χρόνιας υπέρτασης έχουν παρατηρηθεί στις μη ισπανόφωνες μαύρες γυναίκες (Martin *et al.*, 2011). Επιδημιολογικές και οικογενειακές μελέτες σε διακριτές γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς έχουν δείξει πως η προεκλαμψία είναι πολυπαραγοντική διαταραχή, η οποία επηρεάζεται από τη φυλή, την κατάσταση της υγείας του πλακούντα, τη διατροφή και το βάρος σώματος (Sutherland *et al.*, 1986 και Gant and Gilstrap, 1996). Οι συγγενείς πρώτου βαθμού των γυναικών με προεκλαμψία διατρέχουν πενταπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης της διαταραχής ενώ εκείνοι δευτέρου βαθμού έχουν διπλάσιο, μιας και δεν μοιράζονται μόνο το ίδιο περιβάλλον αλλά και τα ίδια γονίδια (Bouda *et al.*, 2003).

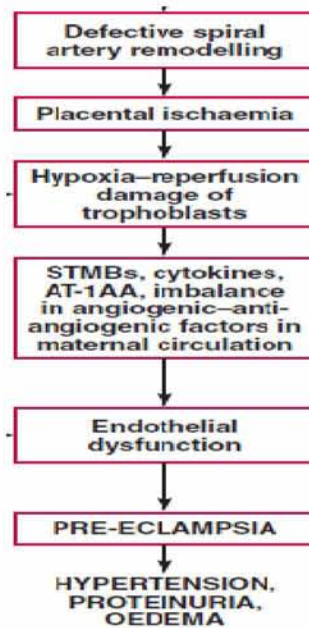
Η προεκλαμψία μπορεί να λειτουργεί και ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης του θανατηφόρου και μη εμφράγματος του μυοκαρδίου (Brown *et al.*, 2013). Οι βασικοί μηχανισμοί που

αντιπροσωπεύουν τον αυξημένο κίνδυνο συμπεριλαμβάνουν, κοινούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου για την υπέρταση κατά την εγκυμοσύνη και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Σε πρόσφατη μετανάλυση 43 μελετών, όπως περιγράφεται από τους, Jafar, Hirpalgaonkar και Parikh το 2018, η προεκλαμψία συσχετίστηκε με αυξημένες συγκεντρωτικές πιθανότητες καρδιαγγειακών παθήσεων, γι' αυτό και η προεκλαμψία αποτελεί πλέον μέρος του ιστορικού κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου στις γυναίκες (Heida *et al*, 2016). Ωστόσο, η προεκλαμψία ως δείκτης για την πρόβλεψη κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων σε γυναίκες δεν έχει αξιολογηθεί συστηματικά.

A.3. Αιτιολογία νόσου

Η προεκλαμψία περιγράφεται ως σύνδρομο των δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από ρηχή εισβολή εμβρυϊκών τροφοβλαστικών κυττάρων στο ενδομήτριο και ανεπαρκής τροποποίηση των σπειροειδών αρτηριών. Αυτό οδηγεί σε ανομοιόμορφη ροή αίματος στον πλακούντα και συνεπώς, στο στρες του πλακούντα. Ως αποτέλεσμα ο κατεστραμμένος τοπικά πλακούντας απελευθερώνει έναν αριθμό μοριακών παραγόντων και τα κυτταρικά του υπολείμματα. Μεταξύ αυτών, θραύσματα συγκυτιοτροφοβλαστών, βασικής μεμβράνης, μικροσωματίδια, microRNAs και εμβρυϊκό DNA. Τα θραύσματα και τα κυτταρικά υπολείμματα ανιχνεύονται στην κυκλοφορία της μητέρας όπου προκαλούν φλεγμονή και ενδοθηλιακά τραύματα (Redman and Sargent, 2008).

Το δεύτερο στάδιο της προεκλαμψίας χαρακτηρίζεται από τη μητρική παθογένεια, η οποία παρουσιάζεται με αυξημένη αρτηριακή πίεση, πρωτεϊνουρία, φλεγμονή και ενδοθηλιακή βλάβη. Το παραπάνω μοντέλο περιγράφεται διαγραμματικά από τους Gathiram και Moodley το 2016, και απεικονίζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση αιτιολογικού καταρράκτη συμβάντων στην προεκλαμψία (Gathiram & Moodley, 2016).

Η ελαττωματική σπειροειδής αναδιαμόρφωση οδηγεί στην ισχαιμία του πλακούντα και την υποξία-βλάβη επαναδιάχυσης των τροφοβλαστών, με συνέπεια την διαταραχή των αγγειογόνων και των αντιαγγειογόνων παραγόντων, όπως οι κυτοκίνες, στη μητρική κυκλοφορία με αποτέλεσμα ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τελικά την εμφάνιση της προεκλαμψίας και των συμπτωμάτων που την ακολουθούν.

A.3.1. Παθοφυσιολογία και κλινική εικόνα

Στην επιστημονική βιβλιογραφία, οι θεωρίες για τα αίτια πρόκλησης της διαταραχής της προεκλαμψίας είναι πολυάριθμες και ποικίλουν. Παρά τις δεκαετίες έρευνας, η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας εξακολουθεί να είναι ανεπαρκώς μελετημένη και η παθογένεια της ελλιπώς κατανοητή. Τα αίτια των παραπάνω ελλείψεων οφείλονται στην αδυναμία διεξαγωγής μελετών κατά την διάρκεια των κυήσεων, για ηθικούς λόγους, καθώς και στην έκθεση σε ρίσκο τόσο της μητέρας όσο και του εμβρύου κατά την διάρκεια των μελετών. Ορισμένες θεωρίες σχετίζονται με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν το οξειδωτικό στρες, την ανοσολογική δυσανεξία μεταξύ του

εμβρυοπλακουντιακού και μητρικού ιστού και την αγγειογόνο ανισορροπία (Leeman & Fontaine, 2008). Ανεξαρτήτως μηχανισμού, θεωρείται πως η προεκλαμψία εμφανίζεται με ένα μοντέλο δύο σταδίων (Bell, 2010). Το πρώτο στάδιο περιέχει την μείωση της αιμάτωσης του πλακούντα και δευτερογενώς την μη φυσιολογική αγγειακή εμφύτευση και αναδιαμόρφωση, παράγοντες οι οποίοι και αλληλεπιδρούν με τους μητρικούς, είτε αυτοί είναι γενετικοί είτε περιβαλλοντικοί, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του μητρικού συνδρόμου της προεκλαμψίας (Roberts and Hubel, 2009). Επιπροσθέτως, έχει υποστηριχθεί ότι η σύνδεση μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου σταδίου μπορεί να περιλαμβάνει πολλαπλούς παράγοντες, των οποίων η σύσταση μπορεί να ποικίλλει ανά άτομο. Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται από μειωμένη διάχυση που προκαλείται από αγγειόσπασμο και την ενεργοποίηση του καταρράκτη αντιδράσεων πήξης με το σχηματισμό αποφρακτικών μικροθρόμβων, με αποτέλεσμα την μειωμένη διάχυση σε πολλαπλά όργανα, την υπέρταση, την πρωτεϊνουρία και την απώλεια υγρού από τον ενδοαγγειακό χώρο (Roberts and Gammill 2005). Έρευνες δείχνουν πως τοξίνες προερχόμενες από τον πλακούντα όπως οι κυτοκίνες, συνδέουν το πρώτο και το δεύτερο στάδιο επίσης.

Η παθογόνος διαδικασία της προεκλαμψίας ξεκινά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, πολύ πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Η ατελής ανάπτυξη του πλακούντα είναι η βασική αιτία της πρώιμης έναρξης προεκλαμψίας, καθώς και η μειωμένη ροή αίματος, “ισχαιμία” στον πλακούντα (Staff *et al.*, 2014), με αποτέλεσμα την μειωμένη αιμάτωση της μητροπλακουντιακής κοιλότητας. Ένα σύνολο παθογενετικών μηχανισμών συμβάλει στην εκδήλωση της προεκλαμψίας, όπως αυτή εκφράζεται στα δύο είδη της. Την καταγραφόμενη σύνθετη παθοφυσιολογία αποτελούν η παρουσία μη φυσιολογικού πλακούντα, ταυτόχρονα με το οξειδωτικό και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το δυσλειτουργικό

ενδοθήλιο σε συνδυασμό με την εμφάνιση αντιαγγειογενετικών συνθηκών και τα αυτοαντισώματα του υποδοχέα τύπου I (Fisher *et al.*, 2009). Έχει παρατηρηθεί ελαττωματική εισβολή των σπειροειδών αρτηριών από τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας, καθώς και ανωμαλίες που σχετίζονται με το νιτρικό οξείδιο οι οποίες συμβάλλουν στον έλεγχο του αγγειακού τόνου και πιθανώς σχετίζονται με την εμφύτευση του εμβρύου (Duran-Reyes *et al.*, 1999). Είναι η προκαλούμενη αυξημένη αρτηριακή αντίσταση της μήτρας που προκαλεί υψηλότερη ευαισθησία στην αγγειοσυστολή και συνεπώς ισχαιμία του πλακούντα και οξειδωτικό στρες.

Η ισχαιμία του πλακούντα προκαλεί εμβρυϊκές επιπλοκές, όπως η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης και σε περιπτώσεις και ενδομήτριο θάνατο. Παράλληλα, είναι το οξειδωτικό στρες που προάγει την απελευθέρωση στην μητρική κυκλοφορία ελευθέρων ριζών, οξειδωμένων λιπιδίων, κυτοκινών και διαλυτό στον ορό αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα I. Οι ανωμαλίες αυτές είναι υπεύθυνες για την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με αγγειακή υπερδιαπερατότητα, την θρομβοφιλία και την υπέρταση, έτσι ώστε να αντισταθμιστεί η μειωμένη ροή στις αρτηρίες της μήτρας λόγω της περιφερικής αγγειοσυστολής (Roberts, 1998). Στην προεκλαμψία ο ισχαιμικός ιστός της τροφοβλάστης εκκρίνει κατεχολαμίνες, όπως η κορτιζόλη, ως φυσιολογικό σήμα για να αυξηθεί η ροή αίματος της μητέρας στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα (Manyonda, 1998). Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων, όπως οι βιταμίνες E, C και τα καροτενοειδή μειώνονται (Mikhail, 1994). Αναπόφευκτα, μεταβάλλεται η ευαισθησία των κυκλοφορούντων αγγειοσυσταλτικών μορίων, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται οι παράγοντες πήξης, να μειώνεται η αγγειακή ακεραιότητα, δημιουργώντας τις παθοφυσιολογικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας. Η

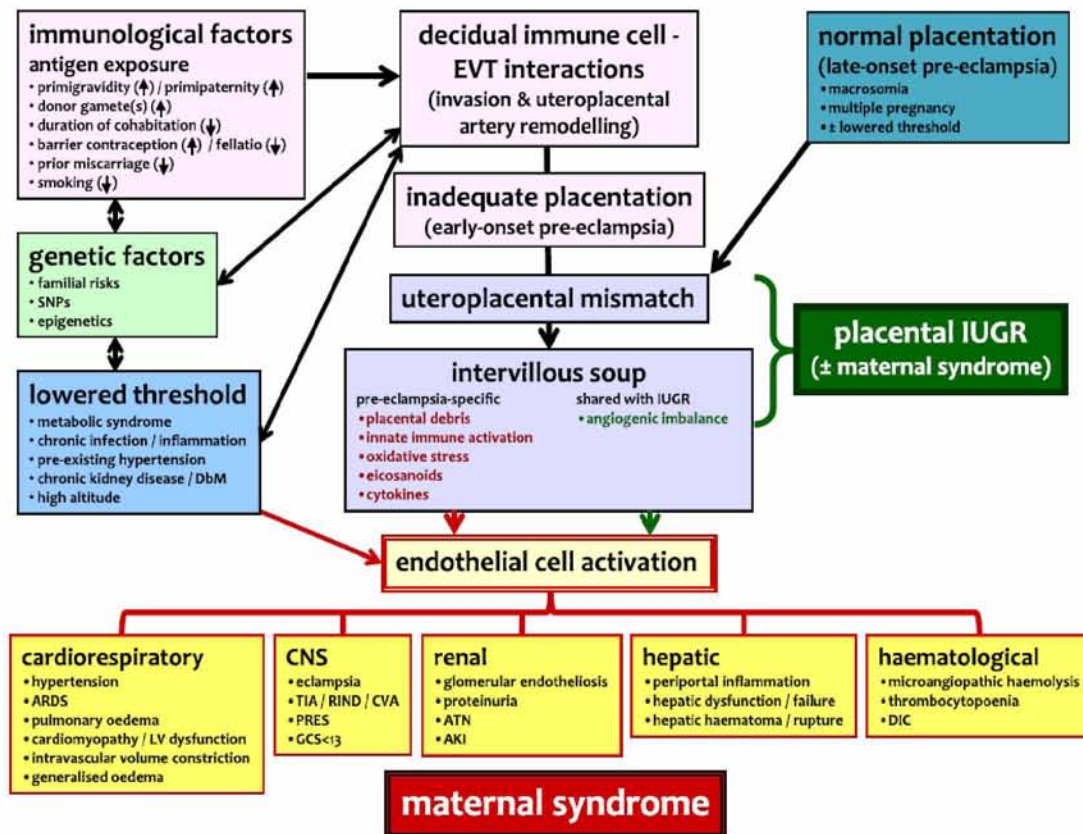
κλινική εικόνα της μητέρας προκύπτει από την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δηλαδή, την αιμόλυση, τα αυξημένα ηπατικά ένζυμα και τον χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων.

Η πρόιμης έναρξης και η καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία έχουν διαφορετικές παθοφυσιολογικές και αιτιολογικές οδούς. Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της πρόιμης έναρξης προεκλαμψίας είναι ο ελλιπής μετασχηματισμός των σπειροειδών αρτηριών. Οι σπειροειδείς αρτηρίες προμηθεύουν προσωρινά με αίμα το ενδομήτριο της μήτρας και μετασχηματίζονται με σκοπό την ροή αίματος στην μήτρα και τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αποτυχία της φυσιολογικής μετατροπής των σπειροειδών αρτηριών μπορεί να προκαλέσει μία σειρά επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένης και της προεκλαμψίας (Burton *et al.*, 2009), με αποτέλεσμα την υποδιήθηση του πλακούντα και μειωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο γεγονός που οδηγεί σε ενδείξεις περιορισμού της ανάπτυξης του εμβρύου (Gathiram and Moodley, 2016). Στην πρόιμης έναρξης προεκλαμψία, δυσμορφίες στην αναδιαμόρφωση σπειροειδών αρτηριών συναντώνται στα απομακρυσμένα τμήματα των σπειροειδών αρτηριών και οδηγούν σε μειωμένη αιμάτωση της μητροπλακουντιακής κοιλότητας (Brosens *et al.*, 2011). Διακρίνεται επίσης μείωση στον όγκο του πλάσματος, μεταξύ της 14^{ης} και 17^{ης} εβδομάδας της κύησης και προηγείται των εκδηλώσεων της κλινικής διαταραχής (Salas *et al.*, 2006). Στην καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία, οι σπειροειδείς αρτηρίες, έχουν σε ορισμένες περιπτώσεις ελαφρώς αλλοιωμένη διάμετρο, χωρίς να οδηγούν σε περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου και αυτό διότι δεν υπάρχει καμία αλλαγή ή τροποποίηση των σπειροειδών αρτηριών, έτσι μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείτε υπέρμετρη διάχυση του πλακούντα (Sohlberg *et al.*, 2014).

Η προεκλαμψία μπορεί να θεωρηθεί ως βλάβη του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος που το εμποδίζει να αναγνωρίσει την εμβρυοπλακουντιακή μονάδα.

Είναι η υπερβολική παραγωγή ανοσοκυττάρων που προκαλεί έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNF- α) ο οποίος με την σειρά του επάγει την απόπτωση του κυτταροτροφοβλάστη (Genbacev *et al.*, 1999). Το σύστημα του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA), φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ελαττωματική εισβολή των σπειροειδών αρτηριών, καθώς γυναίκες με προεκλαμψία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα των HLA-G και HLA-E (Uzan *et al.*, 2011).

Συμπερασματικά η προεκλαμψία οφείλεται σε αναντιστοιχία διαθεσιμότητας μεταξύ της μητροπλακουντιακής κοιλότητας και τις απαιτήσεις του εμβρύου, οδηγώντας σε μητρικές και εμβρυικές συστηματικές φλεγμονώδεις εκδηλώσεις, όπως αυτές συνοψίζονται στην Εικόνα 2. Σε αυτό το μοντέλο προέλευσης της προεκλαμψίας, η νόσος προκύπτει από την ατελή μορφοποίηση του πλακούντα. Οι συνέπειες της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που φαίνεται συνεπής μεταξύ όλων των γυναικών που αναπτύσσουν προεκλαμψία περιλαμβάνουν μεταβλητό αντίκτυπο σε πολλά ευάλωτα συστήματα οργάνων.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Η προέλευση και οι συνέπειες της προεκλαμψίας (Magee *et al.*, 2014). Ανοσολογικοί, γενετικοί και άλλοι παράγοντες οδηγούν στον ατελή πλακούντα και τα κλινικά του συμπτώματα στο μητρικό σύνδρομο της προεκλαμψίας.

Τα πιο κοινά κλινικά μητρικά συμπτώματα της προεκλαμψίας είναι εκείνα της υπέρτασης και της πρωτεϊνουρίας, με το εγκεφαλικό επεισόδιο και το πνευμονικό οίδημα τις κύριες αιτίες θανάτου της μητέρας. Κλινικές εκδηλώσεις του εμβρύου αποτελούν το χαμηλό επίπεδο αμνιακού υγρού, έως και 30% λιγότερο, ανώμαλη οφθαλμική αρτηριακή ταχύτητα, μειωμένη εμβρυϊκή μέση εγκεφαλική αρτηριακή αντίσταση, μια ανώμαλη κυματομορφή της κοίλης φλέβας (Baschat, 2004). Η υπέρταση και η συνύπαρξη μίας ή περισσότερων από τις ακόλουθες εκδηλώσεις παρουσιάζονται στις συνήθεις κλινικές εικόνες: πρωτεϊνουρία, νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική εμπλοκή, νευρολογικές επιπλοκές όπως αλλοιωμένη διανοητική κατάσταση,

τύφλωση, εγκεφαλικό επεισόδιο, σοβαροί πονοκέφαλοι, θρομβοπενία (May *et al.*, 2011). Μετά την 20^η εβδομάδα κύησης, η προεκλαμψία μπορεί να συνοδεύεται και από άλλες εκδηλώσεις. Τέτοια συμπτώματα είναι το οίδημα, αιμολυτική αναιμία, αποκοπή πλακούντα, και θάνατο. Αυτές οι εκδηλώσεις είναι αποτέλεσμα ενδοθηλιακών δυσλειτουργιών που επηρεάζουν κυρίως το ήπαρ, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο (Karumanchi, 2017). Η νεφρική ροή πλάσματος και ο σπειραματικός ρυθμός διήθησης μειώνεται κατά περίπου 25%, σε σχέση με το 30%-50% στις υγιείς εγκυμοσύνες. Έτσι τα επίπεδα αζώτου, ουρίας του αίματος και κρεατινίνης στην προεκλαμψία είναι ελαφρώς αυξημένα σε σχέση με τις τιμές μη εγκύων γυναικών (Thangaratinam *et al.*, 2009). Η κανονική εγκυμοσύνη σχετίζεται με μια σχετικά υπερπηκτική κατάσταση, η οποία δίνει πλεονέκτημα στην εγκυμονούσα μητέρα κατά την διάρκεια του τοκετού, με την αποφυγή αιμορραγίας. Στην προεκλαμψία, αυτή η υπερπηκτικότητα είναι έντονη και συσχετίζεται συνήθως με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη θρομβοπενία, ως αποτέλεσμα της βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας (Baumwell & Karumanchi, 2007). Στο ήπαρ σε κατάσταση προεκλαμψίας παρατηρούνται αυξήσεις στις τρανσαμινάσες, οι οποίες και αποτελούν κλινικό δείκτη της διαταραχής και τα επίπεδα αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος. Η έκταση των ηπατικών αυτών βλαβών σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου και πιθανώς συνοδεύονται από περιστασιακή αιμορραγία, ισχαιμικές αλλοιώσεις και απόθεση ινώδους ιστού έως και ρήξη του ήπατος, που μπορεί να συμβεί ως επιπλοκή της εγκυμοσύνης. Οι εκδηλώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και του εγκεφάλου στην προεκλαμψία περιλαμβάνουν τους σπασμούς, την κεφαλαλγία, την θολή όραση, ακόμα και την τύφλωση. Τέτοια ακραία φαινόμενα όπως η τύφλωση οφείλονται σε αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς ή αγγειακή απόφραξη, η οποία είναι φλοιώδους

προέλευσης. Το εγκεφαλικό επεισόδιο είναι μια σοβαρή αλλά σπάνια επιπλοκή. Στην προεκλαμψία παρουσιάζονται διαφορετικοί βαθμοί εγκεφαλικής αιμορραγίας από ελάχιστη έως σοβαρή αιμορραγία, ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη και νέκρωση, που όμως η δεύτερη αποτελεί σπάνια επιπλοκή (Karumanchi, 2017).

Για τις εμβρυϊκές επιπλοκές, αυξημένος είναι ο κίνδυνος για ενδομήτριο περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου μέχρι και θάνατο. Αν και η παθογένεση αυτών των επιπλοκών είναι ακόμη άγνωστη, προκρίνεται η μειωμένη μητροπλακουντιακή ροή αίματος (Tenhola *et al.*, 2006). Είναι σημαντικό το ποσοστό εκείνων των παιδιών που γεννήθηκαν από μητέρες με προεκλαμψία, που εμφάνισαν ενδοκρινικές, διατροφικές, μεταβολικές ασθένειες, ασθένειες του αίματος με αυξημένα ποσοστά (Wu *et al.*, 2009). Επιπλέον, εκείνα τα παιδιά που εκτέθηκαν σε προεκλαμψία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, παρουσίασαν αυξημένη αρτηριακή πίεση κατά την παιδική ηλικία και εγκεφαλικά επεισόδια στην ενήλικη τους ζωή (Kajantie *et al.*, 2009).

A.4. Μοριακοί και βιοχημικοί δείκτες

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί πάνω από 400 βιοδείκτες, με εκτεταμένες και δημοσιευμένες έρευνες για τους περισσότερους από αυτούς. Ο συνδυασμός βιολογικών δεικτών και κλινικών παραμέτρων βελτιώνει την προγνωστική αξία στις μελέτες που εξετάζουν την προεκλαμψία και φέρνει βήματα πιο κοντά την επιστημονική κοινότητα στην σωστή της διάγνωση, θεραπεία αλλά και πρόγνωση, μιας και ακόμα και σήμερα, όπως τονίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.), τα μοντέλα πρόβλεψης της προεκλαμψίας που χρησιμοποιούν μόνο συνδυασμό βιολογικών δεικτών και κλινικών παραμέτρων βελτιώνουν την προγνωστική αξία της διαταραχής (Conde-Agudelo *et al.*, 2004). Προκρίνεται πως η προεκλαμψία προκαλείται από δυσλειτουργία του πλακούντα και από την

απελευθέρωση παραγόντων από τον δυσλειτουργικό πλακούντα στη μητρική κυκλοφορία προκαλώντας εκτεταμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Stegers, *et al.*, 2010). Δύο είναι οι υποψήφιες πρωτεΐνες υπεύθυνες για τον φαινότυπο της προεκλαμψίας και είναι εκείνες οι αντιαγγειογενείς πρωτεΐνες, που αποκτούν πρόσβαση στη μητρική κυκλοφορία και που δείχνουν να υπερπαράγονται από τον πλακούντα (Romero & Chaiworapongsa, 2013). Η διαλυτή τύπου Fms κινάση τυροσίνης-1 ή sFlt-1, ο ενδογενής αναστολέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα ή VEGF, ο παράγοντας ανάπτυξης του πλακούντα ή PlGF, η διαλυτή ενδογλίνη ή sEng, ο υποδοχέας του TGF-β, έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στον ορό των γυναικών με προεκλαμψία, ακόμα και εβδομάδες πριν από την εμφάνιση κλινικής έκθεσης εκδηλώσεις της νόσου (Levine, *et al.*, 2004). Επιπροσθέτως, και όπως απέδειξαν οι Venkatesha και συνεργάτες το 2006, όταν εγχέονται σε τρωκτικά, αυτά τα μόρια προκαλούν συστηματική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία καταλήγοντας σε φαινότυπο παρόμοιο με την προεκλαμψία, που συμπεριλαμβάνει σοβαρά συμπτώματα όπως η υπέρταση, η πρωτεϊνουρία, η σπειραματική ενδοθηλίωση, αιμόλυση, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων. Όσον αφορά τα μοριακά μονοπάτια που προτάθηκαν να έχουν βασικούς ρόλους στην πρόκληση του δυσλειτουργικού πλακούντα, αυτά είναι πολλαπλά. Τα μονοπάτια αυτά συμπεριλαμβάνουν την ανεπαρκή έκφραση οξυγόνου της αίμης, την υποξία του πλακούντα, ποικίλους γενετικούς παράγοντες, αυτοαντισώματα κατά του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης, το οξειδωτικό στρες, την φλεγμονή, την αλλοιωμένη σηματοδότηση λευκών αιμοσφαιρίων καθώς και την έλλειψη κατεχολ-Ο-μεθυλ-τρανσφεράσης (Parikh & Karumanchi, 2008). Αγγειογενετικοί και αντιαγγειογενετικοί βιοδείκτες όπως οι VEGF, PlGF, sFlt-1 και sEng, δείχνουν μεταβολές στα απόλυτα επίπεδα τους στην μητρική κυκλοφορία και

μάλιστα οι μεταβολές αυτές προηγούνται της κλινικής εμφάνισης της προεκλαμψίας, εβδομάδες έως μήνες, γι' αυτό και έχουν προταθεί ως δείκτες πρόγνωσης (Noori *et al.*, 2010). Οι συγκεντρώσεις των αγγειογόνων παραγόντων όπως το ελεύθερο VEGF, το ελεύθερο PlGF και το ολικό sFlt-1 καταγράφονται αλλοιωμένες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, σε μητέρες με καθυστερημένη διάγνωση προεκλαμψίας (Levine *et al.*, 2006). Τα επίπεδα του sFlt-1 αυξάνονται ξεκινώντας από την 5^η και 6^η εβδομάδα, ακόμα και όταν τα κλινικά συμπτώματα της πάθησης δεν είναι ορατά (Maynard, *et al.*, 2003). Η συγκέντρωση του PlGF και του ελεύθερου VEGF μειώνονται, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα επίπεδα είναι το αποτέλεσμα σύνδεσης με sFlt-1 (Hertig, *et al.*, 2004). Αυτός είναι ο λόγος που η αναλογία συγκέντρωσης των sFlt-1 προς PlGF χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες της προεκλαμψίας. Επίσης, τα επίπεδα συγκέντρωσης του sEng αυξάνουν απότομα κατά τις εβδομάδες 33^η έως 36^η στην προεκλαμψία και λαμβάνουν μέγιστες τιμές όταν τα κλινικά συμπτώματα είναι ορατά (Lim *et al.*, 2008). Διαγνωστικό δείκτη αποτελεί η μέτρηση της συγκέντρωσης του αντιαγγειογόνου παράγοντα sEng κατά την 13^η έως 20^η και 21^η έως 32^η εβδομάδα κύησης (Kusanovic *et al.*, 2009). Η πρωτεΐνη του πλακούντα-13 ή PP-13 είναι μέλος της οικογένειας γαλακτίνης, εκφράζεται από τους συγκυτιοτροφοβλάστες και εμπλέκεται στην εμφύτευση και την αγγειακή ανάπτυξη του πλακούντα (Than *et al.*, 2004). Τα επίπεδα του PP-13 στο πρώτο τρίμηνο είναι σημαντικά χαμηλότερα στις γυναίκες που θα αναπτύξουν προεκλαμψία (Huppertz *et al.*, 2008). Τα επίπεδα του PP-13 αυξάνονται σταδιακά κατά την διάρκεια μιας φυσιολογικής κύησης, αντίθετα από τις γυναίκες που παρουσιάζουν την διαταραχή όπου τα επίπεδα παραμένουν χαμηλά και ειδικότερα κατά το πρώτο (9-12 εβδομάδες) τρίμηνο (Khalil *et al.*, 2009). Ο συνδυασμός μετρήσεων του πρώτου τριμήνου για την PP-13 σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους καθώς συνδέεται με τις πρωτεΐνες annexin-II και

actin-B με δράσεις στην πλακουντοποίηση, μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη της νόσου και να λειτουργήσει ως βιοδείκτης (Spencer *et al.*, 2007). Απαιτούνται μεγαλύτερες και περισσότερες μελέτες ώστε να προσδιοριστεί εάν το PP-13 θα αποτελέσει πολύτιμο κλινικό δείκτη για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας. Η σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη, πρωτεάση πλάσματος-A ή PAPP-A είναι μια πεπτιδάση που παράγεται από τροφοβλάστες και είναι υπεύθυνη για την κατάλυση πρωτεϊνών δέσμευσης αυξητικού παράγοντα IGFBP-4, στην εμβρυική ανάπτυξη (Giudice *et al.*, 2002) που ρυθμίζουν τους αυξητικούς παράγοντες της ινσουλίνης σημαντικούς για την εμφύτευση, την εισβολή των τροφοβλαστών αλλά και την ανάπτυξη του πλακούντα (Hamilton *et al.*, 1998). Μειωμένα επίπεδα της PAPP-A στο πρώτο τρίμηνο της κύησης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο δυσμενών αποτελεσμάτων της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένης της προεκλαμψίας (Spencer *et al.*, 2008). Μετρήσεις της PAPP-A θα πρέπει να συνδυαστούν με κλινικούς δείκτες για να ξεπεραστεί το αποδεκτό ποσοστό ψευδούς θετικότητας (Kalousonά, *et al.*, 2014). Η μεταλλοπρωτεάση ADAM-12 είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών ADAM, που καθορίζει τις κύτταρο προς κύτταρο και κύτταρο προς μεσοκυττάριο χώρο αλληλεπιδράσεις, σε μυϊκά και νευρικά κύτταρα, κατά την γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου (Yang *et al.*, 2005). Οι Enquobahrie και συνεργάτες το 2012 ανέφεραν πως η έκφραση του γονιδίου ADAM-12 στον πλακούντα αυξάνεται στην προεκλαμψία σε σύγκριση με κανονικές γυναίκες. Το ADAM-12 συμμετέχει στο μονοπάτι σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα-β ή TGF-β (Atfi *et al.*, 2007) και εμπλέκεται στην επεξεργασία των παραγόντων ανάπτυξης που ρυθμίζουν τη δυναμική ισορροπία των επιπέδων των κυτοκινών (Jacobsen & Wewer, 2009). Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι μεταξύ της 14^{ης} και 18^{ης} εβδομάδας κύησης, η πρωτεΐνη TNF-α, η ιντερλευκίνη-10 ή IL-10 και η ιντερφερόνη-γ ή INF-γ, έχουν

σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις στην προεκλαμψία από ότι στην κανονική εγκυμοσύνη (Kumar *et al.*, 2013). Στην πρώιμης έναρξης προεκλαμψία, η TNF-α του πλάσματος και οι υποδοχείς του TNFR1, IL-1β και IL-12 καθώς και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ-70 ή Hsp-70 ήταν σημαντικά υψηλότερες από ό, τι στην καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία, ενώ οι συγκεντρώσεις της IL-10 ήταν υψηλότερες στην καθυστερημένης έναρξης από την πρώιμης έναρξης (Peracoli *et al.*, 2013). Επομένως, τα αμφιλεγόμενα συμπεράσματα όχι μόνο για τους προηγούμενους βιοχημικούς δείκτες, αλλά για το σύνολο αυτών, απαιτούν ενδελεχής επαναλήψεις των αποτελεσμάτων, συμμετοχή τους σε μεταanalύσεις και μια συστηματική ανασκόπηση των δημοσιευμένων άρθρων για τις συγκεντρώσεις όλων των μορίων στην κυκλοφορία της μητέρας.

A.5. Η γενετική της προεκλαμψίας

Ο συνωστισμός υποθέσεων προεκλαμψίας σε οικογένειες έχει καταγραφεί εδώ και χρόνια, υποδηλώνοντας σαφώς το γενετικό υπόβαθρο της διαταραχής. Η αποκωδικοποίηση των γενετικών διαδικασιών της προεκλαμψίας αποτελεί πρόκληση, καθώς ο φαινότυπος εκφράζεται μόνο στον γυναικείο πληθυσμό, όμως και οι δύο γονότυποι της μητέρας και του εμβρύου, εξετάζονται με το δεύτερο όμως να φέρει γονίδια που κληρονομούνται ωστόσο και από τον πατέρα. Έρευνες με τη χρήση διδύμων, εκτίμησαν την κληρονομικότητα της προεκλαμψίας στο 55%, με συνεισφορές από τα γονίδια της μητέρας και του εμβρύου (Thornton & Macdonald, 1999). Παράλληλα στοιχεία από την μεγαλύτερη δημοσιευμένη μελέτη διδύμων, προτείνουν την γενετική διείδυση της προεκλαμψίας σε επίπεδα μικρότερα του 50%, υποδηλώνοντας την ποικιλομορφία μέσα στα μοντέλα κληρονομικότητας (Chappell & Morgan, 2006). Η προεκλαμψία είναι μια σύνθετη γενετική διαταραχή και οι περιβαλλοντικές εκθέσεις, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας και του βάρους,

καθορίζουν επίσης εάν οι γενετικές παραλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της νόσου. Είναι πιθανό ότι δεν υπάρχει καμία αιτία ή γενετική παραλλαγή που να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις της προεκλαμψίας, αν και είναι πιθανό ότι διάφορες παραλλαγές συνδέονται με διάφορα υποσύνολα της νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν υψηλότερο ποσοστό προεκλαμψίας σε εγκυμοσύνες που γεννήθηκαν βρέφη με πατέρες οι οποίοι προέρχονταν από εγκυμοσύνες προεκλαμψίας (Skjaerven *et al.*, 2005). Τα εμβρυικά γονίδια αυξάνουν την αρτηριακή πίεση της μητέρας προκειμένου να βελτιώσουν την μητροπλακουντιακή ροή αίματος, ενώ τα μητρικά γονίδια δρουν με τον αντίθετο τρόπο (Williams & Broughton Pipkin, 2011). Επομένως, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στις μητέρες με προεκλαμψία θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως μια εμβρυϊκή προσπάθεια να αντισταθμιστεί η ανεπαρκής μητροπλακουντιακή προσφορά θρεπτικών συστατικών (Williams & Broughton Pipkin, 2011). Η προσέγγιση του υποψήφιου γονιδίου επιλέγεται εάν το γονίδιο βρίσκεται σε μια περιοχή που προσδιορίζεται να συνδέεται με την πάθηση. Έχουν εξεταστεί πάνω από 70 υποψήφια γονίδια, που αντιπροσωπεύουν μονοπάτια που εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες της προεκλαμψίας, συμπεριλαμβανομένων των αγγειοδραστικών πρωτεϊνών, της θρομβοφιλίας, του οξειδωτικού στρες, του μεταβολισμού των λιπιδίων, των ενδοθηλιακών βλαβών (Mutze *et al.*, 2008). Η προεκλαμψία όπως και οι περισσότερες γενετικά πολύπλοκες διαταραχές, δεν έχουν γενικώς αποδεκτά γονίδια ευαισθησίας.

A.5.1. Υποψήφια γονίδια

Μια επιτυχής εγκυμοσύνη απαιτεί την ανάπτυξη επαρκούς κυκλοφορίας του πλακούντα. Οι θρομβοφιλίες αυξάνουν τον κίνδυνο ανεπάρκειας του πλακούντα λόγω ισχαιμίας ή θρόμβωσης, καθώς και επιδράσεις στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των τροφοβλαστών (Isermann *et al.*, 2003). Οι ανωμαλίες των

γεγονότων θρόμβωσης είναι τεκμηριωμένες κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας (Brenner, 2002). Οι τρεις πιο ευρέως μελετημένοι θρομβοφιλικόι παράγοντες, με πιθανό ρόλο στην προεκλαμψία, είναι ο παράγοντας V Leiden ή F5, η MTHFR πρωτεΐνη και η προθρομβίνη F2 (Lin & August, 2005). Ωστόσο, μελέτες για αυτά τα τρία γονίδια έδειξαν αντιφατικά αποτελέσματα αύξησης του κινδύνου για την προεκλαμψία εκτός από τον πολυμορφισμό, SNP, 1691 G>A στο γονίδιο F5 για τον οποίο τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα.

Όσον αφορά γονίδια που σχετίζονται με την αιμοδυναμική και ενδοθηλιακή λειτουργία, η συνθετάση ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου 3 ή eNOS3, πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην αγγειακή αναδιαμόρφωση και αγγειοδιαστολή, έχειδειχθεί ότι έχει μειωμένη δραστηριότητα σε μελέτες προεκλαμψίας (Brennecke *et al.*, 1997), όμως μέχρι και σήμερα ο αυξημένος κίνδυνος και ο συσχετισμός του γονιδίου με την προεκλαμψία μένει να αποδειχθεί. Επίσης, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας ή VEGF είναι σημαντικός για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση τους, την επιβίωση και τη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας (Parazoglou *et al.*, 2004). Δύο πολυμορφισμοί στο γονίδιο που εκφράζει την VEGF, οι 405 G>C και 936 C>T, βρέθηκαν να σχετίζονται με τη σοβαρή μορφή της προεκλαμψίας (Banyasz *et al.*, 2006). Η διαλυτή κινάση τυροσίνης τύπου fms 1 ή sFlt1 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12, δεσμεύει την VEGF με υψηλή συγγένεια εμποδίζοντας την να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα της, με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα της VEGF (Chen, 2009).

Το οξειδωτικό στρες παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας, παρά την ισχυρή όμως αυτή συσχέτιση μόνο ένας μικρός αριθμός γονιδίων έχει ερευνηθεί. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της μικροσωμικής εποξειδικής υδρολάσης ή EPHX, που καταλύει την υδρόλυση ορισμένων οξειδίων ικανών να παράγουν τοξικά ενδιάμεσα

προϊόντα, όπως και η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση ή GST, ένα αντιοξειδωτικό, θα μπορούσαν να εμπλακούν στην προεκλαμψία (Canto *et al.*, 2008). Επιπροσθέτως, η λιποπρωτεϊνική λιπάση ή LPL και η απολιποπρωτεΐνη E ή ApoE, δύο ρυθμιστές του μεταβολισμού των λιπιδίων, εκφράζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον πλακούντα και ως εκ τούτου έχουν προταθεί ως πιθανά υποψήφια γονίδια (Descamps *et al.*, 2005). Μια πρόσφατη μελέτη, από τους Atkinson και συνεργάτες, αναγνώρισε αλλοιωμένη γλυκοζυλίωση των κυκλοφορούντων ισόμορφων ApoE σε προεκλαμψία και σε συνδυασμό με την εύρεση αυξημένων συγκεντρώσεων απογλυκοζυλιωμένης βασικής ισόμορφης ApoE και μειωμένη όξινη ισόμορφη ApoE, κατέληξαν πως ο συνδυασμός αυτός καθίσταται ικανός να αυξήσει τον κίνδυνο δημιουργίας πλακουντιακών αθηροτικών αλλαγών. Τα μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων, η αύξηση της υπεροξειδωσής τους που προκαλείται από αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της προεκλαμψίας. Δύο μεγάλες ρυθμιστικές αρχές του λιπιδικού μεταβολισμού, της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και της απολιποπρωτεΐνης, εκφράζονται άφθονα στον πλακούντα (Descamps *et al.*, 2005). Η μετάλλαξη, Asn291Ser της LPL συσχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα της LPL και αυξημένη δυσλιπιδαιμία (Zhang *et al.*, 2006) στην προεκλαμψία, αν και η οριστική επιβεβαίωση ακόμα αναμένεται.

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την διαμεσολάβηση του NRF2, βρίσκεται στην κορυφή του καταλόγου τέτοιων οδών. Ο πιθανός ρόλος του NRF2 στην προεκλαμψία ενισχύεται από παρόμοια ευρήματα άλλων στην βιβλιογραφία (Kwider *et al.*, 2011). Το NRF2 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες ρυθμίζοντας την έκφραση των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης ή AREs (Mann *et al.*, 2007). Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν το NRF2, το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου

δεσμεύεται με αλληλουχίες AREs, οδηγώντας στη μεταγραφική ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Ishii *et al.*, 2000). Συνολικά, η αύξηση έκφρασης του NRF2 μπορεί να υποδεικνύει αμυντική απόκριση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην προεκλαμψία.

Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες έχουν ερευνηθεί για πιθανούς ρόλους στην προεκλαμψία, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα ή TNF- α , με την υπερβολική απελευθέρωση του. Ο TNF- α έχει εμπλακεί λόγω της συμβολής του στην ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να συμβάλει στα μητρικά συμπτώματα της διαταραχής. Τα επίπεδα του TNF- α στο πλάσμα των γυναικών με προεκλαμψία είναι σημαντικά υψηλότερα από ότι σε υγιείς γυναίκες (Sharma *et al.*, 2007). Η πιο συχνά μελετημένη μετάλλαξη στην προεκλαμψία είναι η -308 G>A στη θέση του υποκινητή, η οποία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα TNF- α και τον αυξημένο κίνδυνο προεκλαμψίας (Elahi *et al.*, 2009).

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι χαρακτηριστική της προεκλαμψίας, που σχετίζεται με την υπέρταση και την πρωτεϊνουρία. Μεταξύ των διαφόρων διαμεσολαβητών που απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο, το νιτρικό οξείδιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (Williams & Morgan, 2012). Μέσα στο καρδιαγγειακό σύστημα το ενδοθηλιακό ισόμορφο της συνθετάσης νιτρικού οξειδίου ή eNOS είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση νιτρικού οξειδίου. Μειωμένη έκφραση της eNOS συνεπάγεται μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα νιτρικού οξειδίου που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την προεκλαμψία (Sandrim *et al.*, 2008). Το γονίδιο eNOS, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q35-7q36, έχει μήκος 21 έως 22 Kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια (Miyahara *et al.*, 1995). Μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών έχουν ταυτοποιηθεί για το γονίδιο eNOS, συμπεριλαμβανομένων

επαναλαμβανόμενων διαδοχικών επαναλήψεων του δινουκλεοτίδιου CA (Marsden *et al.*, 1993), αρκετοί από αυτούς έχουν συσχετιστεί με την προεκλαμψία και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις.

Ο υποδοχέας ακτιβίνης A τύπου 2 ή ACVR2A έχει ταυτοποιηθεί ως υποψήφιο γονίδιο στην θέση 2q22-23. Ο ACVR2A είναι σημαντικός υποδοχέας για την κυτταρική σηματοδοτική πρωτεΐνη ακτιβίνη A, σημαντικό ρυθμιστή της ανθρώπινης εγκυμοσύνης (Williams & Pipkin, 2011). Το ROCK2, γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση πρωτεΐνης 2, βρίσκεται εντός χρωμοσωμικής θέσης σύνδεσης με την προεκλαμψία στο χρωμόσωμα 2p25 (Laiivuori *et al.*, 2003). Το ROCK2 εκφράζεται ευρέως σε κύτταρα λείου μυός και ο προτεινόμενος ρόλος του στη αγγειοσυστολή έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα ζωικά μοντέλα (Riento & Rocks, 2003). Επιπλέον, το ROCK2 εκφράζεται από τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα και η έκφραση του αυτή αναμένεται να ρυθμιστεί ανοδικά στην προεκλαμψία (Ark *et al.*, 2005). Λεπτομερής μελέτη γονιδίων ευαισθησίας στον χρωμοσωμικό τόπο 5q15 προσδιόρισε τα γονίδια ERAP1 και ERAP2 ως σημαντικά και πιθανώς συνδεδεμένα με την προεκλαμψία (Johnson *et al.*, 2009). Το ERAP1 αποικοδομεί την αγγειοτενσίνη-2 και την μετατρέπει σε αγγειοτασίνη-2 και έχει συνδεθεί με τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης σε μη έγκυες γυναίκες με υπέρταση, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες συμμετοχής του στις μεταβολικές οδούς εμφάνισης της νόσου.

Δύο θεωρίες φαίνεται να είναι αλληλένδετες στην ανώμαλη πλακουντοποίηση, η γενετική θεωρία και η ανοσολογική θεωρία. Γονίδια που έχουν συνδεθεί με την προεκλαμψία πιθανώς αλληλεπιδρούν στα αιμοστατικά και τα καρδιαγγειακά συστήματα, καθώς και στη φλεγμονώδη αντίδραση. Ορισμένα έχουν εντοπιστεί και παρείχαν αποδείξεις σύνδεσης τους με την διαταραχή, συμπεριλαμβανομένου εκείνου

της αγγειοτενσίνης στο χρωμόσωμα 1q42-43 (Mutze *et al.*, 2008). Η προεκλαμψία μπορεί να θεωρηθεί ως βλάβη του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος που το εμποδίζει να αναγνωρίσει την εμβρυοπλάκουντιακή μονάδα. Υπερβολική παραγωγή κυττάρων ανοσίας προκαλεί έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TGF- α) η οποία επάγει την απόπτωση του εξωβιλάδους κυτταροτροφοβλάστη (Genbacev *et al.*, 1999). Επίσης το σύστημα ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA εμφανίζεται να παίζει ρόλο στην ελαττωματική εισβολή των σπειροειδών αρτηριών, καθώς οι γυναίκες με προεκλαμψία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα των HLA-G και HLA-E (Colbern *et al.*, 1994)

Το γονίδιο και η δράση του αυτοαντισώματος του υποδοχέα 1 της αγγειοτενσίνης-2 ή AT1-AA μπορεί να εξηγήσει την παθοφυσιολογία της αγγειοσύσπασης και της υπερπηκτικότητας στην προεκλαμψία (Seki, 2014). Οι φυσιολογικές λειτουργίες του AT1-AA περιλαμβάνουν την αύξηση της παραγωγής του γονιδίου sFlt-1 (Zhou, *et al.*, 2008), την μείωση της ινωδόλυσης και την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου PAI-1 με σκοπό τον έλεγχο της διάσπασης της εξωκυτταρικής μήτρας και τον έλεγχο της τροφοβλαστικής εισβολής (Bobst *et al.*, 2005). Επιπροσθέτως το AT1-AA συμμετέχει στον έλεγχο της διάσπασης της ινωδόλυσης και της εξωκυτταρικής μήτρας στο νεφρό ταυτόχρονα με την αύξηση της παραγωγής του PAI-1, με αποτέλεσμα να επιδεινώνει την πρωτεϊνουρία και τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας (Xu *et al.*, 2001). Οι προηγούμενες δράσεις μαζί και με άλλες, δύναται να εξηγήσουν όλα τα κλινικά συμπτώματα και τις παθολογικές αλλαγές κατά την προεκλαμψία. Επιπλέον, το AT1-AA δεν συναντάται στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες και σε μη εγκύους υπερτασικές γυναίκες. Αυτό το αντίσωμα βρίσκεται μόνο στην προεκλαμψία, επομένως πιστεύεται ότι παίζει ρόλο και στην παθογένεια της. Το AT1-AA δρα μόνο δεσμευόμενο στον υποδοχέα του, τον AT1. Η σηματοδότηση του

AT1 δεν ρυθμίζει μόνο τα περισσότερα γονίδια που εκφράζονται στον πλακούντα, αλλά εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης που σχετίζεται με την εισβολή των τροφοβλαστών και την αγγειογένεση (Iraní & Xia, 2008). Ακόμη και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης AT1-AA στο πλάσμα, δεν συνεπάγεται και δράση του στους ιστούς που δεν εκφράζουν το AT1. Για να αποσαφηνιστεί η σημασία του AT1-AA στην παθογένεση της προεκλαμψίας, η έκφραση του AT1 καθώς και η ποσότητα και η διάρκεια της έκφρασης αυτής πρέπει να καθοριστούν.

Είναι προφανές ότι το κυκλοφορικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης ή (RAS) παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην υγιή εγκυμοσύνη όσο και στην παθογένεια της προεκλαμψίας. Το (RAS) μπορεί να συμβάλει στην παθογένεση της προεκλαμψίας ρυθμίζοντας την παραγωγή αγγειογόνων παραγόντων μέσω του AT1. Αποδεικνύεται ότι το αγγειογόνο σύστημα και το κυκλοφορικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης δεν είναι διακριτά, αλλά μπορούν στην πραγματικότητα να συνεργαστούν για την ρύθμιση της έκφρασης των αγγειογενετικών γονιδίων και την παραγωγή αυξητικών παραγόντων (Seki, 2014). Το κυκλοφορικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη θεωρία διαταραχών δύο σταδίων της προεκλαμψίας.

Σύμφωνα με τις αλλαγές στην ρενίνη και την αγγειοτενσίνη-2 ή ANGII, η αλδοστερόνη αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και είναι σχετικά χαμηλή στις εγκυμοσύνες που εμφανίζεται προεκλαμψία. Το χαμηλό επίπεδο αλδοστερόνης μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μειωμένη αύξηση όγκου και την προκύπτουσα φτωχή εμφάνιση πλακούντα στην προεκλαμψία, γι' αυτό και αποτελεί σημαντικό γονίδιο στόχο. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων τροφοβλαστών, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυξήθηκε μετά την διέγερση του γονιδίου αλδοστερόνης, καταδεικνύοντας την σημαντικότητα της έλλειψης της δράσης του στην διαταραχή (Gennari-Moser, *et.*

al., 2011). Θετικές ή προσθετικές μεταλλάξεις του γονιδίου CYP11B2 γνωστού και ως συνθάση της αλδοστερόνης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Escher, *et al.*, 2009).

A.6. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS)

Το κυκλοφορικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης ή (RAS), είναι μια αλληλουχία σηματοδοτικών αντιδράσεων με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών (Zhang *et al.*, 2017). Το σύστημα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες, ρενίνη ή REN, το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης ή ACE, την αγγειοτενσίνη-1 ή ANG I, την αγγειοτενσίνη-2 ή ANG II, τις αγγειοτενσίνες 1 έως 7 ή ANG1-7, τον υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης 2 ή AT1R και τον υποδοχέα τύπου 2 της αγγειοτενσίνης 2 ή AT2R (Irani & Xia, 2008). Το ένζυμο ρενίνη συντίθεται και απελευθερώνεται από παρασπειραματικά κύτταρα νεφρικών αρτηριολίων σε απόκριση της χαμηλής αρτηριακής πίεσης και του χαμηλού νατρίου στην κυκλοφορία. Η απελευθέρωση ρενίνης προκαλείται εν μέρει από τις προσταγλανδίνες που παράγονται από τα κύτταρα της ωχράς κηλίδας των νεφρών (Jensen *et al.*, 1996). Η ρενίνη διασπά ενζυματικά το αγγειοτενσινογόνο, το οποίο παράγεται στο ήπαρ, στην αγγειοτενσίνη-1 (Seki, 2014). Η αγγειοτενσίνη-1 δεν είναι βιολογικά λειτουργική αν δεν διασπαστεί από το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE), που παράγεται κυρίως στο ενδοθήλιο των πνευμόνων, σε αγγειοτενσίνη-2. Οι δύο τύποι υποδοχέων αγγειοτενσίνης AT1R και AT2R ανήκουν στην έβδομη διαμεμβρανική οικογένεια υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (Chung *et al.*, 1998). Οι περισσότερες από τις επιδράσεις του ANG-II λειτουργούν μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων AT1 οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των λείων αγγειακών μυϊκών κυττάρων και τα επινεφρίδια. Ο υποδοχέας AT1 υποδέχεται την πρωτεΐνη Gq, που λειτουργεί στην οδό σηματοδότησης αύξησης του

ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Η ενεργοποίησή του, προωθεί την αγγειοσυστολή, την συμπαθητική δραστηριότητα και την απελευθέρωση αλδοστερόνης. Ο υποδοχέας AT2 εκφράζεται στο νεφρό του εμβρύου και η έκφρασή του μειώνεται κατά τη νεογνική περίοδο (Ozono *et al.*, 1997). Στους ενήλικες νεφρούς ο AT2 βρίσκεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από τον AT1 και η διέγερση του εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, αυξάνει την απόπτωση τους, προκαλεί αγγειοδιαστολή και εμπλέκεται στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού ιστού (Grishko *et al.*, 2003).

Μέλη του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης συντίθεται σε πολλούς ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι ωθήκες και ο πλακούντας (Poinsner, 1998). Η ρενίνη, το αγγειοτενσινογόνο, το ACE, οι ANG I και II, ο υποδοχέας AT1, έχουν ταυτοποιηθεί στους ιστούς του εμβρυϊκού πλακούντα. Επίσης, στις σπειροειδείς αρτηρίες του ενδομητρίου, εκφράζεται το αγγειοτενσινογόνο, η ρενίνη, το ACE και ο AT1 υποδοχέας (Morgan *et al.*, 1998). Επομένως στις εγκυμονούσες γυναίκες, το ενδομήτριο και ο εμβρυϊκός πλακούντας περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για ένα λειτουργικό σύστημα (RAS).

A.6.1 Σύστημα (RAS) και προεκλαμψία

Το σύστημα (RAS) στην προεκλαμψία διαφέρει με εκείνο σε υγιείς εγκύους. Κανονικά, εκτός από το ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης ή ACE, όλα τα λοιπά μέρη του (RAS) αυξάνουν τις συγκεντρώσεις τους στην κυκλοφορία, σε αντίθεση με την περίπτωση γυναικών με προεκλαμψία. Στις γυναίκες αυτές τα επίπεδα ρενίνης, ANG I και αλδοστερόνης είναι χαμηλότερα, εκτός από το επίπεδο του ACE που παραμένει σχεδόν σταθερό (Merrill *et al.*, 2002). Ενώ οι έγκυες γυναίκες με φυσιολογική κύηση δείχνουν μειωμένη αγγειακή ευαισθησία στην αγγειοτενσίνη-2 ή ANG II, οι γυναίκες με προεκλαμψία παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία του

φλοιού των επινεφριδίων και αγγειακού συστήματος ευαισθησία στην αγγειοτενσίνη-2 ή ANG II (Redman & Sargent, 2005). Κατά τη φυσιολογική εγκυμοσύνη οι AT1 υποδοχείς αδρανοποιούνται από αντιδραστικά είδη οξυγόνου που οδηγούν σε χαμηλότερη ευαισθησία στην σύνδεση του με την αγγειοτενσίνη-2 ή ANG II (Abdalla *et al.*, 2001), ενώ στην προεκλαμψία, ο υποδοχέας AT1 βρίσκεται συνδεδεμένος με τον υποδοχέα βραδυκινίνης ή B2, με αποτέλεσμα αυτά τα ετεροδιμερή AT1/B2 να παρουσιάζουν αντοχή στην αδρανοποίηση μέσω των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και να παραμένει ενεργός για την αγγειοτενσίνη-2 ή ANG II (Ariza, *et al.*, 2007).

Στις γυναίκες με προεκλαμψία παρατηρείται δυσλειτουργία στην ισορροπία αλάτι-νερό που κυριαρχείται κυρίως από την αλδοστερόνη ή ALD. Επιπλέον, σε σύγκριση με κανονικές εγκυμοσύνες, υπάρχει σχετικά υψηλότερο επίπεδο αλδοστερόνης ή ALD για το συγκεκριμένο χαμηλότερο επίπεδο της ρενίνης (Gallery & Brown, 1987). Όσο για το τοπικό μητροπλακουντιακό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS), έχουν καταγραφεί αμφιλεγόμενα αποτελέσματα τόσο για την υπερβολική έκφραση του υποδοχέα AT1R, την αύξηση των επιπέδων ρενίνης στο ενδομήτριο, όσο και για τα αυξημένα επίπεδα της ANG II και AT1R.

Τα οιστρογόνα διεγείρουν τη σύνθεση του αγγειοτενσινογόνου με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων κυκλοφορικής αγγειοτενσίνης κατά τις πρώτες 20 εβδομάδες κύησης. Στην προεκλαμψία φαίνεται ότι υπάρχει σχετική αύξηση του υψηλού μοριακού βάρους της αγγειοτενσίνης (Verdonk *et al.*, 2014). Πολυμορφισμοί του γονιδίου της αγγειοτενσίνης που αυξάνουν τα επίπεδα αγγειοτενσινογόνου στο πλάσμα έχουν επίσης συσχετιστεί με την προεκλαμψία, όπως αυτό αποδείχτηκε από τους Shahvaisizadeh και συνεργάτες το 2012, με τον μηχανισμό να εμπλέκει τη μείωση της ρενίνης, που είναι η συνέπεια αυτών των αυξημένων επιπέδων

αγγειοτενσίνης. Στην προεκλαμψία μπορεί να παρουσιαστούν διάφορες μεταβλητές εκδηλώσεις σε πολλαπλά συστήματα, αλλά σίγουρα συνδέεται περισσότερο με τη νεφρική λειτουργία. Η ρενίνη, η αγγειοτενσίνη-1, η αγγειοτενσίνη-2 και η αλδοστερόνη παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις στο περιφερικό αίμα στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Shah, 2005), αντίθετα σε γυναίκες με προεκλαμψία η δραστηριότητα της ρενίνης του πλάσματος και της αλδοστερόνης καταστέλλονται, με εκείνη της αλδοστερόνης να βρίσκεται σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το επίπεδο της ρενίνης, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη επινεφρίδια ευαισθησία στο ANG II. Η φυσιολογική εγκυμοσύνη σχετίζεται με μειωμένη αγγειακή ανταπόκριση στο ANG II και η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στο ANG II που μπορεί να αναπτυχθεί πριν από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Η αύξηση της σηματοδοτικής αλληλουχίας μεταξύ του ANG II και του α_1 -επινεφριδιακού υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα κυτταρικά γεγονότα, τα οποία, μαζί με τα αυξημένα επίπεδα sFlt1, εξηγούν τα πρωτογενή παθογόνα χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας.

Η αγγειοτενσίνη 1-7 αποτελεί βασικό συστατικό του (RAS) και εμφανίζει ανταγωνιστικές δράσεις της αγγειοτενσίνης-2, ενεργώντας ως ρυθμιστής του αγγειακού τόνου και απελευθερώνοντας μονοξείδιο του αζώτου (NO) και προσταγλανδίνες (Ueki *et al.*, 2015). Η αγγειοτενσίνη 1-7 δημιουργείται από την AT2 από το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης-2 ή ACE-2 (Brosnihan, *et. al.*, 2004). Η αγγειοτενσίνη 1-7 του πλάσματος αυξάνεται στην κανονική εγκυμοσύνη και μειώνεται στην προεκλαμψία και κάτι τέτοιο είναι συμβατό με τα διαφορετικά ποσοστά των προϊόντων της AT-2 που μπορεί να έχουν σχέση με την υπέρταση και μεταβολικά ελαττώματα στην προεκλαμψία (Merrill, *et. al.*, 2002). Σε αντίθεση, έχει προταθεί πως η διαταραχή οφείλεται στην παρουσία αγωνιστικών αυτοαντισωμάτων ή AA που δεσμεύονται και ενεργοποιούν τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης-2 τύπου 1

(Dechend, *et al.*, 2003). Ανοσοσφαιρίνες του ορού γυναικών με προεκλαμψία διεγείρουν τον υποδοχέα AT-1, αλλά εκείνες από τις υγιείς έγκυες γυναίκες δεν δείχνουν καμία επίδραση. Η ανοσοσφαιρίνη G ή IgG από προεκλαμπτικές γυναίκες συμβάλει στην παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου διεγείροντας το NADPH στον αγγειακό λείο μυ κυττάρων και ανθρώπινων τροφοβλαστών (Dechend, *et al.*, 2003).

Συνοψίζοντας, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Γι' αυτό και πλειάδα ερευνητών έχει υποθέσει ότι οι αλλαγές στο (RAS) παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Κατά τη διάρκεια μίας κανονικής εγκυμοσύνης το (RAS) διεγείρεται και η δραστηριότητα ρενίνης πλάσματος και τα επίπεδα αγγειοτενσίνης (AGT), αγγειοτενσίνης-2 ή (Ang II) και αλδοστερόνης αυξάνονται. Ωστόσο, σε γυναίκες με προεκλαμψία αναπτύσσεται καταστολή του συστήματος (RAS).

Μελέτες γενετικής σύνδεσης έχουν αποκαλύψει την παρουσία πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν βασικά συστατικά του (RAS) και αντιπροσωπεύουν την διακύμανση της δραστηριότητας αυτού του συστήματος.

A.7. Πολυμορφισμοί, στερεοχημικές αλλαγές πρωτεϊνών, οι ρόλοι και η σύνδεση τους με την παθοφυσιολογία της νόσου

Γενεαλογικές αναλύσεις προτείνουν ότι η μητρική ευαισθησία στην περίπτωση της προεκλαμψίας οφείλεται, είτε σε πιθανή αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα μίας μοναδικής διαφοράς σε ένα γονίδιο, είτε σε ατελή διείσδυση ενός αυτοσωμικού επικρατούς γονιδίου, ενώ άλλες αναλύσεις προκρίνουν πολυγονιδιακή αιτιολογία. Με την χρήση της τεχνικής της χαρτογράφησης χρωμοσωμάτων, προσδίδονται ρόλοι σε γονίδιο ή γονίδια στα χρωμοσώματα 1, 3, 9 ή 18 (Hayward, *et al.*, 1992), επιπλέον

σαρώσεις σε επίπεδο γονιδιώματος αποκάλυψαν στοιχεία για υποψήφιες περιοχές επί των χρωμοσωμάτων 4, 7 και 2 (Bouda, *et al.*, 2003). Μελέτες έχουν επίσης εστιάσει στο χρωμόσωμα 5, τόσο σε Αυστραλιανούς όσο και Νορβηγικούς πληθυσμούς (Johnson, *et al.*, 2009), στο χρωμόσωμα 22 σε γυναίκες με προεκλαμψία κινεζικής καταγωγής (Guo *et al.*, 2015). Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που συμμετέχουν στο σύστημα (RAS) και μελετώνται ως προς την παρουσία τους στην διαταραχή, τον πιθανό ρόλο τους αλλά και τα αποτελέσματα που προσδίδουν είναι πολλοί και κάποιοι από τους σημαντικότερους θα παρουσιαστούν παρακάτω.

Ο υποδοχέας τύπου 1 του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης 2 ή ο υποδοχέας AT1R είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος υποδοχέας αγγειοτενσίνης. Παρέχει αγγειοδιασταλτικά αποτελέσματα και ρυθμίζει την έκκριση αλδοστερόνης. Είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ελέγχει την αρτηριακή πίεση και τον όγκο στο καρδιαγγειακό σύστημα. Ο A1166C πολυμορφισμός του AT1R γονιδίου μελετάται, αν και με αβέβαια ακόμα αποτελέσματα, για τον συσχετισμό του με το ρίσκο επαγωγής της υπέρτασης κατά την εγκυμοσύνη (Salimi *et al.*, 2011). Επίσης ο πολυμορφισμός M235T (235Met/Thr) του δευτέρου εξωνίου του γονιδίου της αγγειοτενσίνης ή AGT, έχει επίσης μελετηθεί εκτενώς, με σημαντικές να είναι οι σχέσεις που παρατηρούνται μεταξύ της μετάλλαξης, του πρωτεϊνικού της προϊόντος του φαινοτύπου της υπέρτασης ή της προδιάθεσης υπέρτασης στην προεκλαμψία, μιας και η παραγόμενη πρωτεΐνη παίζει ρόλο στον ρυθμό μεταγραφής της αγγειοτενσίνης και έτσι στην αυξημένη ή μη κυκλοφορούσα AGT. Μεγαλύτερη έκφραση της 235Met/Thr στα ετεροζυγωτικά άτομα μπορεί να είναι αυτή που σχετίζεται με τις αθηρολογικές μεταβολές του πρώτου τριμήνου πριν από την προεκλαμψία (Morgan *et al.*, 1997) και να διπλασιάζει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Levesque *et al.*, 2004). Το γονίδιο της αγγειοτενσίνης εμφανίζει και τον G1035AThr174Met πολυμορφισμό που είναι

άξιος προσοχής και σχετίζεται με την προεκλαμψία μιας και προτείνεται σχέση μεταξύ μεταλλαγμένου Met235Thr AGT και Thr174Met AGT και το βάρος γέννησης (Procopciuc, *et al.*, 2011).

Δύο πολυμορφισμοί στο γονίδιο του αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης 3 ή TIMP3, που βρίσκεται στο 22 χρωμόσωμα, όπως περιγράφηκε από τους Guo *et al.*, το 2015 σχετίζονται με την εμφάνιση της προεκλαμψίας. Η πρωτεΐνη TIMP3 είναι μέλος της οικογένειας TIMP, λειτουργεί ως ανταγωνιστής των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών με σκοπό την προστασία της ομοιόστασης, την φυσιολογική αναδιαμόρφωση ιστών και αναπτυξιακές διαδικασίες μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, της εισβολής, της μετανάστευσης, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης (Cruz Munoz *et al.*, 2006). Η αυξημένη έκφραση και ο υπομεθυλιωμένος υποκινητής του TIMP3 που έχουν παρατηρηθεί στον πλακούντα, το καθιστούν ελκυστικό υποψήφιο γονίδιο προεκλαμψίας (Guo *et al.*, 2015), υποδηλώνοντας επίσης επιγενετικές αλλοιώσεις που μπορεί να συσχετιστούν με μειωμένη τροφοβλαστική διείσδυση (Xiang *et al.*, 2013). Οι δύο πολυμορφισμοί rs135025 και rs80272 έχουν συνδεθεί με καρδιαγγειακές διαταραχές και την υπέρταση, ως εκ τούτου, είναι λογικό να υποθέσετε η ανάμειξη τους στην ανάπτυξη προεκλαμψίας. Συγκεκριμένα το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs135025 και το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs80272 σχετίζονται με πολλαπλούς φαινοτύπους της προεκλαμψίας και με έκφραση βαριάς μορφής της νόσου αντίστοιχα. Οι πολυμορφισμοί βρίσκονται εντός των αλληλουχιών εσονίων του TIMP3 αλλοιώνοντας έτσι την σταθερότητα του παραγόμενου mRNA, της μεταγραφής και της μετάφρασης, επηρεάζοντας έτσι ενδεχομένως την έκφραση και τις βιολογικές ιδιότητες του TIMP3 (Kobayashi *et al.*, 2013), καθώς και ομοιοστατικούς μηχανισμούς που είτε ελέγχουν την αρτηριακή

πίεση, είτε επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, προωθώντας την εμφάνιση σοβαρών σχετιζόμενων συμπτωμάτων (Anacker *et al*, 2011).

Η μικροσωμική εποξειδική υδρολάση ή EPHX καταλύει την πρώτη φάση υδρόλυσης των εποξειδίων, παίζοντας ρόλο στην αποτοξίνωση και στις διεργασίες του μεταβολισμού (Laasanen *et al.*, 2002) και εκφράζεται από το γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στην περιοχή 1q42.1. Δύο πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί για το γονίδιο EPHX1 που παράγουν δύο μορφές της ίδιας πρωτεΐνης με τις μεταλλάξεις να βρίσκονται στο 3^ο και το 4^ο εξώνιο. Στον πολυμορφισμό του 3^{ου} εξωνίου, Tyr113His, η θυμίνη T μετατρέπεται σε κυτοσίνη C στο 113 κωδικόνιο, αλλάζοντας την στερεοχημική διάταξη της πρωτεΐνης και μειώνοντας την ενεργότητα του κατά 40% (Zusterzeel *et al.*, 2001). Στον πολυμορφισμό του 4^{ου} εξωνίου, His139Arg, η αδενίνη A μετατρέπεται σε γουανίνη G στο 139 κωδικόνιο, αλλάζοντας την στερεοχημική διάταξη της πρωτεΐνης και μειώνοντας την ενεργότητα της κατά 25% (Zusterzeel *et al.*, 2001).

Οι TLR υποδοχείς του ανοσοποιητικού συστήματος είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών, προκαλείται η δέσμευση τους και η ενεργοποίηση διαφόρων φλεγμονωδών οδών (Koga *et al.*, 2008). Η υπερέκφραση αυτών των TLR υποδοχέων μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η ενδομήτρια φλεγμονή ενεργοποιεί τόσο τον τοκετό όσο και την προεκλαμψία (Koga *et al.*, 2008). Έχει πρόσφατα παρατηρηθεί ότι η έκφραση τόσο του TLR2 όσο και του TLR4 mRNA και της πρωτεΐνης στα ουδετερόφιλα κύτταρα αυξάνεται στην πρόιμης έναρξης προεκλαμψία, αλλά όχι στην καθυστερημένης έναρξης προεκλαμψία (Xie *et al.*, 2010). Τρεις πολυμορφισμοί των TLR γονιδίων εξετάστηκαν από τους Xie *et al.*, το 2010, η μετάλλαξη rs5743708 Arg753Gln του αλληλόμορφου TLR2, η μετάλλαξη rs4986790 Asp753Gly και rs4986791 Thr753Ile

του αλληλόμορφου TLR4. Οι παραπάνω πολυμορφισμοί θεωρήθηκε πως διαφοροποιούν την δημιουργία της μητρικής φλεγμονικής αντίδρασης σε γυναίκες διαγνωσμένες με πρώιμης έναρξης προεκλαμψία.

Τα κύρια συστατικά του συστήματος (RAS) περιλαμβάνουν την ρενίνη, αγγιοτενσίνη (AGT), το ένζυμο μετατροπής της αγγιοτενσίνης (ACE), την αγγιοτενσίνη-1 ή Ang I, την αγγιοτενσίνη-2 ή AngII, τον υποδοχέα τύπου 1 της αγγιοτενσίνης 2 (AT1R) και AT2R. Ο ρόλος των γενετικών παραλλαγών του (RAS) στην παθολογική διαδικασία των καρδιαγγειακών νοσημάτων εξετάστηκε και οι πολυμορφισμοί των μελών του είναι επίσης υποψήφιοι για μελέτες γονιδιακής συσχέτισης σχετικά με την υπέρταση και την προεκλαμψία. Επιπλέον, ο πλακούντας αποτελείται από μητρικό και από εμβρυικό ιστό και τα πλακουντιακά (RAS) τμήματα είναι μερικώς προερχόμενα από την έκφραση εμβρυικών γονιδίων, επομένως και τα μητρικά και τα εμβρυικά (RAS) γονίδια συνεισφέρουν στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Ο πολυμορφισμός rs699Met235Thr, της αγγιοτενσίνης και η σχέση με την προεκλαμψία έχει μελετηθεί εκτεταμένα (Li *et al.*, 2016). Μελέτες έδειξαν ότι ο AGT rs699 συνδέεται σημαντικά με την νόσο αλλά επιδεικνύει μεγάλη ετερογένεια, με σημαντικές συσχετίσεις με τον υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας, καθώς και πιθανώς έχει πατρική προέλευση (Arngrimsson *et al.*, 1990). Γυναίκες ομόζυγες για την παραλλαγή AGT Met235Thr έχουν σημαντικά υψηλότερο αγγιοτενσινογόνο πλάσματος από ομόζυγες για την παραλλαγή T, αντιπροσωπεύοντας, πιθανό παθογόνο μηχανισμό της προεκλαμψίας (Zhang *et al.*, 2016). Η μετάλλαξη AGT Met235Thr σχετίζεται επίσης, όπως έχει μελετηθεί σε Ιαπωνικούς πληθυσμούς, με τον σχετικό δείκτη μάζας σώματος ή BMI (Kobashi *et al.*, 2002). Ο πολυμορφισμός rs3789678 του γονιδίου της αγγιοτενσίνης ενισχύει τη διαδικασία του mRNA

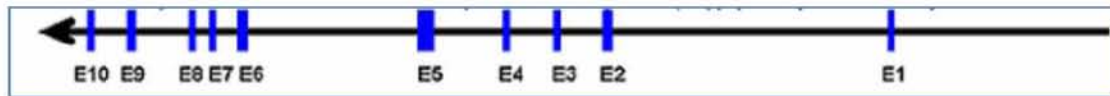
ματίσματος μέσω της δημιουργίας ενός νέου εξωνικού ενισχυτή ματίσματος (Gunda *et al.*, 2016).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων και ηλικίας μπορεί να σχετίζονται με δυναμικές διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης και της τροποποίησης της στερεοχημικής διάταξης, της λειτουργίας και της δραστηριότητας των εκάστοτε πρωτεϊνών (Jin *et al.*, 2011). Οι συμπεριφορές και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες σχετίζονται με την ηλικία και μπορεί να επηρεάζουν επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως μεταβολές στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA και την έκφραση του mRNA. Σε ηλικίες κάτω των 30 ο πολυμορφισμός του υποδοχέα αγγειοτενσίνης 2 τύπου 1 AGTR1 rs275645 και ειδικότερα ο γονότυπος GG, συσχετίστηκε αρνητικά με την προεκλαμψία αλλά αυτή η συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα άνω των 30 ετών, επιδεικνύοντας προστατευτικότητα σχετιζόμενη με την ηλικία (Li *et al.*, 2016).

Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την άποψη ότι τα εμβρυικά γονίδια και οι πολυμορφισμοί τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας, όμως περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση και την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων, καθώς και τον απαραίτητο συσχετισμό τους με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που άλλοτε ενισχύουν την δράση τους και άλλοτε την επιβραδύνουν ή την αναστέλλουν.

A.8. Το γονίδιο της ρενίνης και ο C5312T, rs12750834 πολυμορφισμός στην ανάπτυξη της διαταραχής

Το γονίδιο της ρενίνης αποτελεί τμήμα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στην θέση 1q32. Έχει μήκος 12,5kb, κωδικοποιεί 10 εξόνια, όπως αυτά περιγράφονται στην Εικόνα 1, και εκφράζεται κυρίως στους νεφρούς, στον πλακούντα, αλλά και στο ενδομήτριο και τις ωοθήκες.



Εικόνα 1. Τα εξόνια του γονιδίου της ρενίνης (Sun *et al.*, 2011).

Η πρωτεΐνη βρίσκεται τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στον μεσοκυττάριο χώρο όπου και εκκρίνεται. Η ρενίνη καταλύει το πρώτο βήμα στην οδό ενεργοποίησης της αγγειοτενσίνης που οδηγεί στην απελευθέρωση της αλδοστερόνης, την αγγειοσυστολή και την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η ρενίνη, ως πρωτεάση, διασπά το αγγειοτενσινογόνο για να σχηματίσει την αγγειοτενσίνη-1, η οποία μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη-2 από το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE), ένα σημαντικό ρυθμιστή της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Η ρενίνη είναι υπεύθυνη για το πρώτο και περιοριστικό στάδιο του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του νατρίου και της αρτηριακής πίεσης (Sun *et al.*, 2011). Μεταβολές στην δραστηριότητα της ρενίνης έχουν συσχετιστεί με την υπέρταση, την σχέση άλατος, ηλεκτρολυτών και αρτηριακής πίεσης, καθώς και την ανταπόκριση στις αντιυπερτασικές θεραπείες (Stanton *et al.*, 2009). Αρκετοί πολυμορφικοί δείκτες εντός του γονιδίου ρενίνης έχουν ερευνηθεί για τις σχέσεις τους με την αρτηριακή πίεση σε διάφορες εθνοτικές ομάδες, παρουσιάζοντας αντιφατικά αποτελέσματα. Ενώ πολλές μελέτες έχουν δείξει αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της ρενίνης και της αρτηριακής πίεσης.

Επομένως, το γονίδιο REN είναι ορθολογικά υποψήφιο για την αποκάλυψη της γενετικής βάσης εκείνων των παθήσεων που εμφανίζουν υπέρταση. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου REN έχουν συσχετιστεί με την υπέρταση, την δραστηριότητα της ρενίνης πλάσματος (Hasimu *et al.*, 2003), τον πρόωρο εμβρυικό θάνατο, σε ποικίλες εθνοτικές ομάδες, αν και συχνά με ασυνεπή αποτελέσματα. Η

ασυνέπεια μπορεί εν μέρει να σχετίζεται με τη γενετική ανομοιογένεια των πληθυσμών και την αποτυχία ελέγχου των περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο πολυμορφισμός rs6693954 στο 9^ο εσώνιο έχει αποδειχτεί σε πάνω από εννέα μελέτες πως εμφανίζεται σε διαφορετικές εθνοτικές ομάδες με υπέρταση και μάλιστα πιθανολογείται πως αυτή η περιοχή είναι σημαντική και αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο που επηρεάζει την έκφραση της ρενίνης και μεταβάλλει τον κίνδυνο της υπέρτασης (Sun *et al.*, 2011).

Η περιοχή ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου της ρενίνης περιλαμβάνει τον 5' υποκινητή του γονιδίου αλλά και πολλαπλούς ανοδικούς και καθοδικούς ενισχυτές και σιγαστήρες του γονιδίου της ρενίνης. Αυτές οι αλληλουχίες περιέχουν πολλαπλές θέσεις που ανταποκρίνονται στην θετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου. Αντίστοιχα θέσεις προκαλούν αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση της σηματοδότησης από υποδοχέα του θυρεοειδούς, του ασβεστίου και του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα ή TNF-α. Ο ανοδικός ενισχυτής που βρίσκεται 11kb από τον προαγωγό περιέχει μία διαφορά νουκλεοτιδίου σε σχέση με την αντίστοιχη αλληλουχία ποντικού, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την εξασθένιση της δραστηριότητας σε σύγκριση με εκείνη στον ποντικό. Οι πολυμορφισμοί rs6682082 και rs12750834 μπορούν να επηρεάσουν τη δράση του υποκινητή, με αποτέλεσμα διαφορές στην έκφραση του γονιδίου της ρενίνης και την αρτηριακή πίεση αίματος. Η έκφραση του γονιδίου της ρενίνης ρυθμίζεται στενά στο μεταγραφικό επίπεδο και η ρύθμιση του ελέγχεται γενετικά. Η μεταγραφή του γονιδίου εξαρτάται από τρεις περιοχές: την περιοχή του υποκινητή, ειδικές ανά ιστό περιοχές και τον ενισχυτή (Fuchs, *et al.*, 2002). Στην περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου REN, έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα cis-ενεργά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένου ενός στοιχείου απόκρισης cAMP, μία θέσης συνδέσεως Pit-1, ενός μοτίβου τύπου Ets, μία

αλληλουχία αναγνώρισης HOX-PBX και άλλων, με ορισμένα από τα στοιχεία να διαμορφώνουν την έκφραση της ρενίνης (Germain, *et al.*, 1997). Η πρόωρη γέννηση είναι η πιο σημαντική αιτία νεογνικής θνησιμότητας και νοσηρότητας και σχετίζεται τόσο γενετικά όσο και φαινοτυπικά με την προεκλαμψία. Ο πολυμορφισμός G12109A στο γονίδιο της ρενίνης σχετίζεται με την πρόωρη γέννηση και την πρόωρη ρήξη της μεμβράνης. Η συχνότητα των αλληλόμορφων A, ήταν υψηλότερη στις γυναίκες με πρόωρο τοκετό σε σύγκριση με τις γυναίκες με φυσιολογικό τοκετό, όπως και στους ετεροζυγώτες (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2016).

Η παρουσία υπερτασικών διαταραχών όπως η προεκλαμψία σε όλες τις γυναίκες με πρόωρο τοκετό βρέθηκε ελαφρώς μεγαλύτερη από την επικράτηση μεταξύ των εγκύων γυναικών με αυτές τις ανωμαλίες.

Ένα στοιχείο μήκους 466 νουκλεοτιδίων, από το 5777 έως το 5312, έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί τον υποκινητή της ρενίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων έως και κατά 45% υψηλότερα ποσοστά μεταγραφής παρουσία του αλληλόμορφου 5312T παρά στο 5312C αλληλόμορφο (Fuchs *et al.*, 2002). Η μετάλλαξη του αλληλόμορφου T στη θέση 5312 μέσα σε μία περιοχή απομακρυσμένου ενισχυτή του γονιδίου της ρενίνης έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την μεταγραφή του. Ο 5312 πολυμορφισμός του ενισχυτή της ρενίνης συμβάλλει στην μεταβολή της πίεσης του αίματος, όπως αποδείχτηκε από τους (Moore, *et al.*, 2007) και επίσης φαίνεται να προβλέπει αποκρίσεις στην αναστολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Αυτά τα ευρήματα όπως και άλλα υποδεικνύουν ότι ο προσδιορισμός γονότυπου σε αυτόν τον χρωμοσωμικό τόπο μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της ευαισθησίας, στην υπέρταση και στην επιλογή της βέλτιστης θεραπείας, για μεμονωμένους υπερτασικούς ασθενείς. Vangjeli *et al.*, το 2010 απέδειξαν για πρώτη φορά τη σημασία του γονιδίου της ρενίνης στη ρύθμιση του

επιπέδου της αρτηριακής πίεσης στους ανθρώπους και ειδικότερα όταν μελέτησαν δύο ανεξάρτητους πληθυσμούς, το αλληλόμορφο REN-5312T σχετίστηκε με αύξηση της διαστολικής πίεσης που κυμαίνονταν από 1,1 έως 1,8 mmHg. Συγκεκριμένα οι συστολικές πιέσεις έτειναν να είναι υψηλότερες στα άτομα που έφεραν 1 ή 2 αλληλόμορφα REN-5312T, δίχως οι αυξήσεις να είναι όμως σταθερά σημαντικές στατιστικά. Ο πολυμορφισμός REN-5312C/T δεν επηρεάζει την εξαιρετικά ρυθμισμένη έκκριση της ενεργού ρενίνης από τα ιξωδοστοιβαδικά κύτταρα των νεφρών στη συστηματική κυκλοφορία και φαίνεται πολύ πιο πιθανό η λειτουργικότητα να διαμεσολαβεί από αλλαγμένα επίπεδα ρενίνης στους τοπικούς ιστούς.

Αν η ρενίνη είναι ένα σημαντικό γονίδιο ευαισθησίας για το αρτηριακό, την υπέρταση, μπορεί κανείς να αναρωτηθεί γιατί αυτό δεν εντοπίστηκε σε πολλές πρόσφατες μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος που διεξήχθησαν σε σημαντικά μεγαλύτερους πληθυσμούς (Levy *et al.*, 2009). Συμπερασματικά, το αλληλόμορφο REN-5312T είχε δειχθεί προηγουμένως να οδηγεί σε αυξημένη *in vitro* έκφραση του γονιδίου της ρενίνης. Έχουμε δείξει τώρα σε 2 ανεξάρτητους πληθυσμούς ότι η μεταφορά ενός αλληλόμορφου REN-5312T σχετίζεται με αυξημένη διαστολική πίεση. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η ρενίνη είναι ένα σημαντικό γονίδιο ευαισθησίας για την αρτηριακή υπέρταση σε λευκούς.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω δεδομένα που αφορούν τον πολυμορφισμό C5312T rs12750834 του γονιδίου της ρενίνης, ο πολυμορφισμός αποφασίστηκε να μελετηθεί σε μία μελέτη σύνδεσης του με γυναίκες που εμφάνισαν συμπτώματα προεκλαμψίας κατά την τελευταία κύηση τους.

A.9. Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη έχει σκοπό την καταγραφή της πιθανής σύνδεσης του πολυμορφισμού C5312T, rs12750834 του γονιδίου της ρενίνης, στον υποκινητή, σε κλινικά διαπιστωμένο ελληνικό πληθυσμό εγκύων γυναικών με πρόιμη προεκλαμψία και τον πιθανό ρυθμιστικό χαρακτήρα του, στην έκφραση του γονιδίου στις γυναίκες που νοσούν. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό (DNA), 42 γυναικών με φυσιολογική τελευταία κύηση (ομάδα ελέγχου) και 42 γυναικών με χαρακτηριστικά και συμπτώματα προεκλαμψίας κατά την τελευταία εγκυμοσύνη τους.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. Προς μελέτη πληθυσμοί

Δύο πληθυσμοί μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ελληνικής καταγωγής. Ο πρώτος πληθυσμός ανήλθε συνολικά σε 42 υγιείς ενήλικες γυναίκες διαφόρων ηλικιών, που αποτέλεσε τον πληθυσμό ελέγχου. Όλες οι περιπτώσεις ήταν εθελοντικές. Ο δεύτερος πληθυσμός ανήλθε συνολικά σε 42 ενήλικες γυναίκες διαφόρων ηλικιών με κλινική διάγνωση προεκλαμψίας (πειραματική ομάδα) που αποτέλεσε τον προς μελέτη πληθυσμό. Το σύνολο των γυναικών είχαν τουλάχιστον μία εγκυμοσύνη κατά την διάρκεια της ζωής τους, χωρίς την εμφάνιση της διαταραχής για τον πρώτο πληθυσμό και με εμφάνιση προεκλαμψίας για τον δεύτερο. Όλες οι συμμετέχουσες γυναίκες έδωσαν τυποποιημένη ενημερωμένη συγκατάθεση συμμετοχής.

B.2. Προετοιμασία του DNA

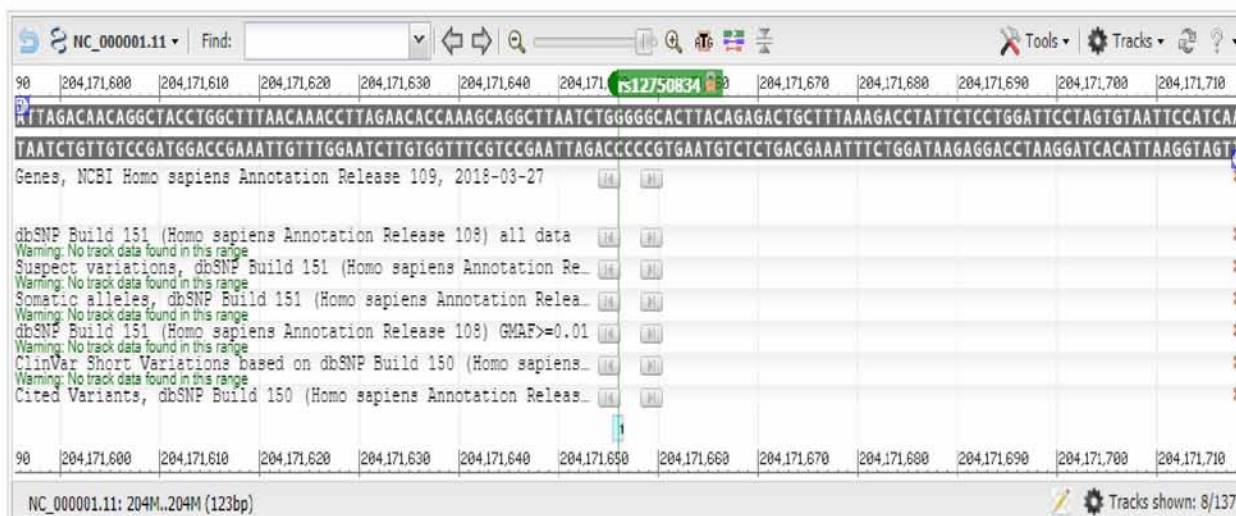
Η μέθοδος βασίζεται στη χρησιμοποίηση στηλών που φέρουν φίλτρα/μεμβράνες από πηκτική σιλικόνη (silica membrane gel), η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή σε πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την DNA πολυμεράση κατά την αντίδραση της PCR. Αρχικά γίνεται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

προσθήκη ενός διαλύματος έκλουσης και φυγοκέντρωση, θα αποδεσμευτεί από την μεμβράνη και θα συλλεχθεί στο σωληνάριο (Matson, 2008, Kumar, 2006).

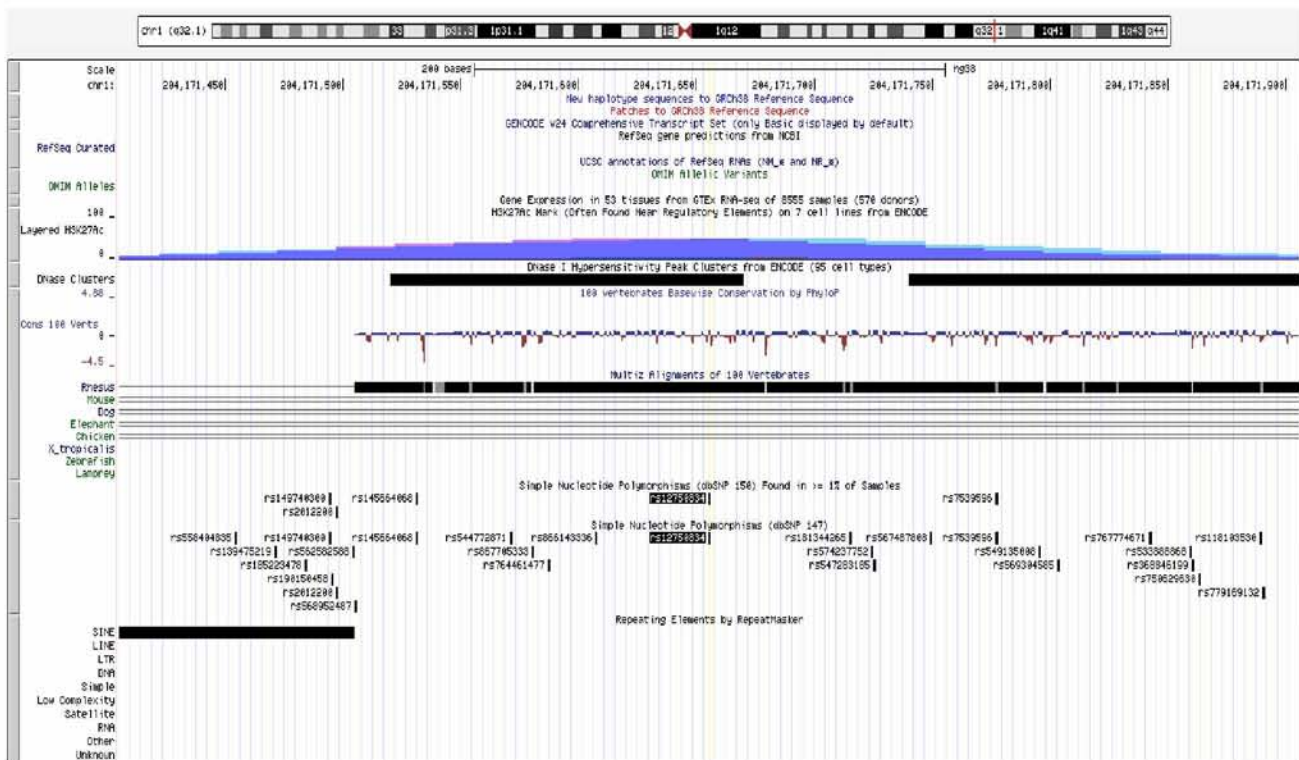
DNA για καθέναν από τους δύο πληθυσμούς μελέτης εκχυλίστηκε από δείγματα αίματος πριν από την έναρξη της μελέτης και αποθηκεύτηκε στους -4°C μέχρι να απαιτηθεί. Η απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα, πραγματοποιήθηκε με το QIAampMiniKit της QIAGEN, βασισμένο στη χρήση διαδοχικών φίλτρων και πηκτής σιλκόνης.

B.3. Γονότυπος

Ένας μοναδικός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, C5312T, του γονιδίου της ρενίνης διερευνήθηκε, με αναγνωριστικό αναφοράς: rs12750834. Όπως και το γονίδιο της ρενίνης έτσι και ο πολυμορφισμός βρίσκονται στο χρωμόσωμα 1 και ειδικότερα στην θέση 1q32.1 (μελετώντας τον genome-euro.ucsc browser), όπως εμφανίζεται στην Εικόνα 2 και στην Εικόνα 1 και με την βοήθεια των ελευθέρων προς χρήση βιοπληροφορικών συστημάτων (GenomeBrowsers). Οι Εικόνες 1 και 2 περιγράφουν τις εκατέρωθεν αλληλουχίες, τόσο ανοδικά όσο και καθοδικά του πολυμορφισμού, οι οποίες και θα πολλαπλασιαστούν με την χρήση της PCR παρακάτω.



Εικόνα 1. Αλληλουχία εντοπισμού πολυμορφισμού rs12750834 στο γονίδιο της ρενίνης. Ο πολυμορφισμός και η θέση του καταδεικνύονται με πράσινο χρώμα.



Εικόνα 2. Θέση SNP rs12750834 στο χρωμόσωμα 1, η θέση επισημαίνεται με κίτρινο χρώμα.

Τα θραύσματα DNA που περιέχουν την πολυμορφική θέση πολλαπλασιάστηκαν αρχικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και έπειτα υποβλήθηκαν σε πέψη ενζύμου περιορισμού με τα αποτελέσματα της πέψης να υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

B.4. Μελέτη του πολυμορφισμού SNP «C5312T», rs12750834, του γονιδίου RENIN

B. 4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η 270 ζευγών βάσεων περιοχή του DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό rs12750834 πολλαπλασιάστηκε τόσο από τα δείγματα ελέγχου όσο και από τα δείγματα μελέτης χρησιμοποιώντας την PCR. Οι αλληλουχίες των πρωταρχικών τμημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτές του PRIMER F και PRIMER R. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 30μl αποτελούμενος από 7μl DNA δείγματος και 23μl

μείγματος της αντίδρασης PCR, σε κάθε eppendorf 0.2ml. Το μείγμα αντίδρασης PCR παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μl		
PRIMER F	2μl		
PRIMER R	3μl		
H2O	3μl		

Πίνακας 1. Συστατικά και όγκοι του μείγματος αντίδρασης για την αντίδραση PCR.

Το μείγμα στη συνέχεια εισήχθη σε προγραμματιζόμενη PCR μηχανή, όπου η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης προχώρησε σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο διήρκεσε πέντε λεπτά στους 94°C για ένα κύκλο προκειμένου να μετουσιωθεί το DNA σε μονές αλυσίδες, οι οποίες δρουν ως πρότυπα για σύνθεση DNA. Το δεύτερο στάδιο συνίστατο από τρία υποστάδια, το πρώτο υποστάδιο διήρκεσε για 60 δευτερόλεπτα στους 94°C, το δεύτερο υποστάδιο διήρκεσε για 60 δευτερόλεπτα επίσης στους 56°C, το οποίο παρείχε τις συνθήκες για την σύνδεση των πρωταρχικών τμημάτων και το τρίτο υποστάδιο που διήρκεσε 60 δευτερόλεπτα στους 72°C για την επέκταση των πρωταρχικών τμημάτων. Αυτό το δεύτερο στάδιο επαναλήφθηκε για 40 κύκλους. Το τελικό στάδιο διήρκεσε για 10 λεπτά στους 72°C το οποίο εξασφαλίζει ότι το βήμα της επέκτασης ήταν πλήρως επιτυχημένο.

B.4.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης για επιβεβαίωση του προϊόντος PCR

Για να επιβεβαιωθεί αν ή όχι, ο πολλαπλασιασμός κάθε δείγματος ήταν επιτυχής, τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2%. μl προϊόντος PCR αναμίχθηκαν με μl βαφής και τα δείγματα φορτώθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης. Τα προϊόντα PCR λειτουργούσαν παράλληλα με τον δείκτη “ladder”, με μια σειρά

μεγεθών από 100bp. Το “gel” παρατηρήθηκε υπό υπεριώδες φως με ένα σύστημα απεικόνισης, προκειμένου να καταγραφούν τα προϊόντα PCR ως ταινίες πάνω στο πήκτωμα και να ληφθεί η φωτογραφία της εικόνας.

B.4.3. Ανάλυση με ένζυμο περιορισμού

Τα επιτυχώς ενισχυμένα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Dde I. Η περιοριστική ενδονουκλεάση Dde I αναγνωρίζει και τέμνει την παρακάτω αλληλουχία αναγνώρισης, μεταξύ κυτοσίνης και θυμίνης, στα δίκλιωνα μόρια DNA.



Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης περιορισμού των 30μl, αποτελούμενης από 10μl προϊόντος PCR και 20μl μείγματος αντίδρασης περιορισμού. Το μείγμα αντίδρασης περιορισμού παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

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

Πίνακας 2. Συστατικά και όγκοι του μείγματος αντίδρασης για την αντίδραση περιορισμού.

Οι σωλήνες erppendorf από κάθε ένα από τα συστατικά εκτός του μείγματος της αντίδρασης φυγοκεντρήθηκαν σε έναν φυγοκεντρωτή πάγκου πριν από την προσθήκη τους στο μείγμα. Όταν παρασκευάστηκε ολόκληρο το μείγμα αντίδρασης, φυγοκεντρήθηκε επίσης σε φυγοκεντρωτή πάγκου. Τα μείγματα επωάστηκαν όλο το βράδυ στους 37°C, σε υδατόλουτρο για να επιτραπεί η πλήρης πέψη του προϊόντος από την PCR.

B.4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση των υποβληθέντων σε πέψη δειγμάτων

Για να επιβεβαιωθεί αν ή όχι η πέψη κάθε δείγματος ήταν επιτυχής, τα προϊόντα πέψης περιορισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 4%. Το σύνολο των δειγμάτων περιορισμού αναμείχθηκε με μl χρωστικής ουσίας και τα δείγματα των 20μl φορτώθηκαν στην πηκτή αγαρόζης 3,5%. Τα προϊόντα PCR λειτουργούσαν παράλληλα με τον δείκτη “ladder”, με μία σειρά μεγεθών από 100bp. Το πήκτωμα εξετάστηκε υπό υπεριώδες φως από ένα σύστημα απεικόνισης, προκειμένου να καταγραφούν τα σχέδια συγκρατήσεως περιορισμού επί του πηκτώματος και ελήφθη μία φωτογραφία της εικόνας.

B.4.5. Υλικά, αναλώσιμα και αντιδραστήρια

Διαλύματα

Πρωτεΐνάση K, QIAGEN

Διάλυμα λύσης AL και έκλουσης AW1 & 2 QIAGEN

Αιθανόλη 100%

Διάλυμα έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA AE, QIAGEN

Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (100mM Tris-βορικό, 2mM Na₂ EDTA), gibco®

Αγαρόζη UltraPure™ Agarose, Invitrogen

DNA ladder 50bp (DNA “μάρτυρας”), New England Biolabs

HotStartTaq® Master Mix (Taq πολυμεράση), QIAGEN

Εκκινητές για το γονίδιο Renin (Forward & Reverse), Invitrogen

RNAase free H₂O, QIAGEN

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

Όργανα

Συσκευή Vortex, VELP SCIENTIFICA

Υδατόλουτρο BIOLine

Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5415 R

Ηλεκτρονικός ζυγός, DHAUS

Αποστακτήρας νερού, HealForce ®

Συσκευή ηλεκτροφόρισης, ThermoEC

Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με ενσωματωμένη κάμερα OVItec

Θερμικός κυκλοποιητής PCR, PCT 200 MJ RESEARCH

Μικροπιπέτες διαφόρων όγκων (τύπου Gilson)

Αναλώσιμα

Σωληνάρια eppendorf των 1,5mL & 0,2mL

QIAamp Mini spin columns & σωληνάρια συλλογής των 2mL

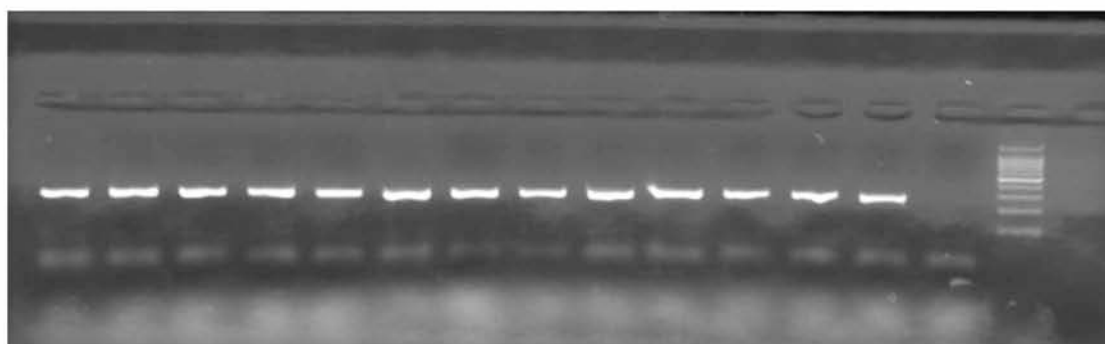
B.4.6. Μέθοδοι για στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για τις συχνότητες των διαφορετικών αλληλόμορφων στο δείγμα πληθυσμού που εξετάζεται. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 (chi-square test), λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων. Για να εξετάσουμε κατά πόσο η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ των γονοτυπικών συχνοτήτων, ανάμεσα στην ομάδα έλεγχου και στην πειραματική ομάδα ατόμων (προεκλαμψία) που συμμετείχαν στην μελέτη είναι στατιστικά σημαντική.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων της PCR

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (βλέπε εικόνα 1). Τα προϊόντα PCR λειτουργούσαν παράλληλα με τον δείκτη «ladder». Τα προϊόντα PCR εμφανίστηκαν ως μονές ζώνες και επιλέχθηκαν για γονοτυποποίηση με ανάλυση περιοριστικών ενζύμων.



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης της αλληλουχίας θραύσματος πολλαπλασιασμένης με PCR 270bp για 13 δείγματα (7control-5 προεκλαμψίας).

Η 270 ζευγών βάσεων περιοχή του DNA που περιέχει την πολυμορφική θέση rs12750834 και η κατεύθυνση της μετανάστευσης ακολουθεί την ροή από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό πόλο (από πάνω προς τα κάτω). Το μέγεθος της αλληλουχίας στο σύνολο των θέσεων δείγματος της παραπάνω εικόνας, συμβαδίζει με το αναμενόμενο μέγεθος της προς πέψη αλληλουχίας μιας και τοποθετείται ανάμεσα στο δεύτερο και τρίτο σκαλοπάτι της σκάλας, 100bp ladder plus, που αντιστοιχούν σε 200 και 300 ζεύγη αζωτούχων βάσεων.

Γ.2. Πέψη αλληλουχίας

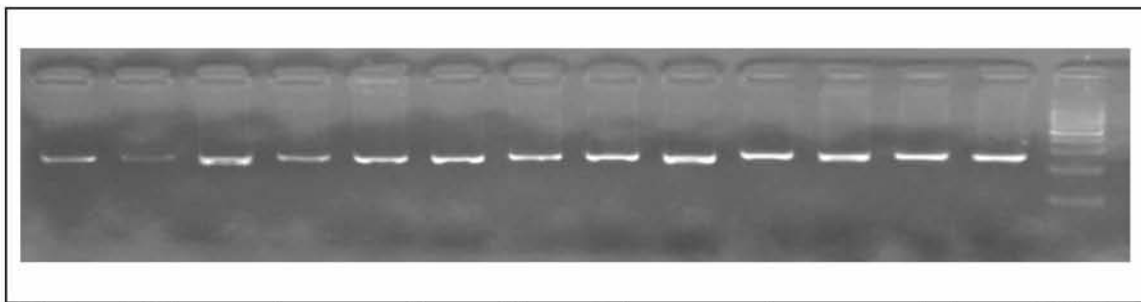
Τα επιτυχώς πολλαπλασιασμένα δείγματα DNA των 270 ζευγών βάσεων χωνεύθηκαν με το ένζυμο περιορισμού Dde I και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και παρουσιάζονται στην εικόνα 2. Η πέψη ενζύμου περιορισμού

του θραύσματος DNA των 270bp βάσεων με το ένζυμο Dde I αναμένεται να παρουσιάσει τα ακόλουθα πρότυπα ζωνών:

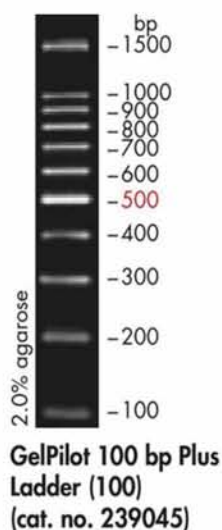
1 ζώνη των 270 ζευγών βάσεων στους ομόζυγους CC.

3 ζώνες βάσεων στους ετερόζυγους CT, με το φυσιολογικό αλληλόμορφο να αντιστοιχεί στην αλληλουχία 270 ζευγών βάσεων και τις δύο επόμενες αλληλουχίες 240 και 30 ζευγών βάσεων να αντιστοιχούν στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, μιας και τότε μόνο θα αναγνωριστεί από την περιοριστική ενδονουκλεάση.

2 ζώνες βάσεων στους ομόζυγους TT, με αλληλουχίες 240 και 30 ζευγών βάσεων να αντιστοιχούν στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, στις όμοιες γενετικές θέσεις των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων.



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης σε δείγματα που έχουν υποστεί πέψη με Dde I.



Εικόνα 3. Απεικόνιση σταθερής αλληλουχίας μέτρησης νουκλειικών οξέων.

Γ.3. Γονότυποι - Κλινικά Χαρακτηριστικά

Στον πίνακα 1 και 2 αντίστοιχα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης, μετά την δράση των περιοριστικών ενζύμων της ομάδας ελέγχου, καθώς και τα κλινικά χαρακτηριστικά τόσο των μητέρων όσο και των νεογνών. Σημειώνεται ότι στη Renin αντιστοιχεί ο πολυμορφισμός C5312T. Οι γονότυποι Renin αντιστοιχούν σε ένα αριθμό που υποδηλώνει τον αντίστοιχο πολυμορφισμό, ο CC αντιστοιχεί στον αριθμό 0, ο CT αντιστοιχεί στον αριθμό 1 ενώ ο TT στον αριθμό 2.

Control	AGE	CHILD	WEEKS OF GESTATION	BIRTH WEIGHT	RENIN-Dde I
2τοκος	37	(+) (female)	38w	3100gr	0
1τοκος	39	(+) (male)	39w	3250 (gr)	0
1τοκος	37	(+) (female)	40w	4050 (gr)	0
2τοκος	25	(+) (male)	37w	3650 (gr)	1
1τοκος	36	(+) (male)	41w	4100 (gr)	0
1τοκος	26	(+) (male)	37w	3800 (gr)	0
2τοκος	22	(+) (female)	37w	3750 (gr)	0
2τοκος	30	(+) (male)	38w	3800 (gr)	1
1τοκος	25	(+) (twins)	40w	4000 (gr)	0
3τοκος	19	(+) (male)	41w	3700 (gr)	0
1τοκος	27	(+) (twins-f-f)	36w	2800 (gr), 2400(gr)	0
2τοκος	31	(+) (male)	38w	3100 (gr)	0
1τοκος	25	(+) (male)	41w	3980 (gr)	0
1τοκος	27	(+) (female)	40w	4020 (gr)	0
1τοκος	32	(+) (female)	40w	3780 (gr)	0
1τοκος	42	(+) (female)	39w	3550 (gr)	1
1τοκος	32	(+) (male)	39w	3250 (gr)	0
1τοκος	23	(+) (male)	38w	3750 (gr)	0
2τοκος	35	(+) (female)	37w	3200 (gr)	0
3τοκος	40	(+) (female)	37w	3850 (gr)	0
1τοκος	30	(+) (male)	41w	3300 (gr)	0
1τοκος	37	(+) (female)	40w	3100 (gr)	0

1τοκος	34	(+) (male)	39w	4180 (gr)	1
1τοκος	35	(+) (female)	38w	4060 (gr)	0
1τοκος	27	(+) (twins-f-m)	41w	2600 (gr), 2200(gr)	0
1τοκος	40	(+) (male)	40w	3050 (gr)	0
1τοκος	32	(+) (female)	39w	3700 (gr)	0
3τοκος	35	(+) (male)	37w	3350 (gr)	0
1τοκος	39	(+) (male)	39w	3810 (gr)	1
3τοκος	35	(+) (female)	37w	3130 (gr)	0
1τοκος	28	(+) (female)	38w	3550 (gr)	1
1τοκος	19	(+) (female)	39w	3530 (gr)	0
1τοκος	36	(+) (male)	40w	3900 (gr)	1
1τοκος	33	(+) (male)	41w	4100 (gr)	0
1τοκος	37	(+) (male)	38w	3460 (gr)	1
1τοκος	40	(+) (female)	38w	3540 (gr)	0
1τοκος	39	(+) (male)	39w	3540 (gr)	0
1τοκος	28	(+) (male)	37w	3980 (gr)	0
1τοκος	28	(+) (female)	41w	4150(gr)	0
1τοκος	27	(+) (twins-m-m)	40w	2540 (gr), 2130(gr)	0
1τοκος	37	(+) (female)	40w	3980 (gr)	0
3τοκος	33	(+) (female)	37w	3040 (gr)	0

Πίνακας 1. Γονότυποι της ομάδας ελέγχου ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου Renin.

Preeclampsia	AGE	CHILD	WEEKS OF GESTATION	BIRTH WEIGHT	RENIN-Dde I
1τοκος	38	(+) (male)	27w	750gr	0
1τοκος	39	(+) (twins-f-f)	32w	1650gr-1450gr	0
1τοκος	35	(+) (male)	28w	750 (gr)	0
1τοκος	22	(+) (male)	32w	2315 (gr)	1
1τοκος	37	(+) (female)	35w	2600 (gr)	1
1τοκος	24	(+) (twins-m-m)	33w	2115+1810 (gr)	1
1τοκος	29	(+) (female)	32w	1420 (gr)	1
1τοκος	28	(+) (male)	32w	1300 (gr)	0
1τοκος	28	(+) (twins)	23w	εμβρυικος θανατος	0
1τοκος	18	(+) (male)	34w	2360 (gr)	0
1τοκος	29	(+) (male)	31w	1340 (gr)	0
1τοκος	32	(+) (male)	31w	1215 (gr)	0
1τοκος	26	(+) (male)	33w	1890 (gr)	1
1τοκος	25	(+) (female)	30w	1130 (gr)	0
2τοκος	34	(+) (female)	33w	1540 (gr)	0
1τοκος	41	(+) (twins-f-X)	27w	850 (gr),850 gr	1
3τοκος	34	(+) (male)	34w	2320 (gr)	0
1τοκος	22	(+) (male)	30w	1460 (gr)	0
1τοκος	36	(+) (female)	34w	1660 (gr)	0
3τοκος	41	(+) (male)	28w	690 (gr)	2
1τοκος	29	(+) (male)	31w	1420 (gr)	2
1τοκος	38	(+) (female)	31w	1080 (gr)	1
1τοκος	32	(+) (male)	33w	1700 (gr)	0
2τοκος	34	(+) (female)	34w	2590 (gr)	1
1τοκος	25	(+) (male)	31w	2140 (gr)	0
1τοκος	42	(+) (male)	32w	1800 (gr)	0
3τοκος	30	(+) (male)	32w	2400 (gr)	0
3τοκος	34	(+) (male)	34w	2410 (gr)	2
3τοκος	38	(+) (male)	34w	2390 (gr)	2
3τοκος	34	(+) (female)	34w	1830 (gr)	0
1τοκος	27	(+) (female)	34w	2000 (gr)	0

1τοκος	18	(+) (female)	34w	2430 (gr)	1
2τοκος	37	(+) (male)	34w	2100 (gr)	0
1τοκος	32	(+) (male)	32w	1600 (gr)	1
1τοκος	36	(+) (female)	32w	1260 (gr)	1
1τοκος	39	(+) (female)	32w	1440 (gr)	0
1τοκος	41	(+) (twins-f-m)	32w	1630 (gr)-1580(gr)	0
1τοκος	28	(+) (male)	31w	890 (gr)	1
1τοκος	29	(+) (male)	34w	3260(gr)	0
1τοκος	26	(+) (male)	29w	900 (gr)	2
2τοκος	38	(+) (female)	34w	1750 (gr)	1
2τοκος	32	(+) (fem-dead)	27w	750 (gr)	2

Πίνακας 2. Γονότυποι της πειραματικής ομάδας (προεκλαμψία) ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου Renin.

Στον πίνακα 3 παρακάτω παρουσιάζονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά στις δύο ομάδες της μελέτης, καθώς και η εφαρμογή του Pearson's χ^2 test.

		Group				P Pearson's χ^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. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά

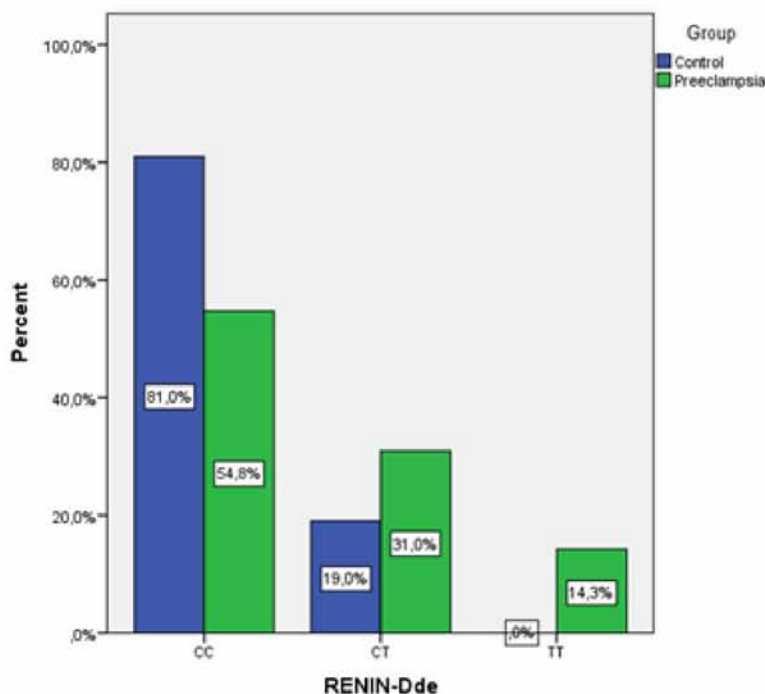
Οι γυναίκες με προεκλαμψία είχαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά πρόωρου τοκετού και γέννησαν σε μικρότερη εβδομάδα κύησης. Επίσης στην ομάδα της προεκλαμψίας το βάρος των νεογνών ήταν μικρότερο.

Στον πίνακα 4 παρακάτω περιγράφεται η παρουσία του πολυμορφισμού στις δυο ομάδες της μελέτης, από τον οποίο προκύπτει πως είναι σημαντικά υψηλότερο το ποσοστό ομόζυγων και ετερόζυγων για RENIN-Dde I που βρέθηκε στην ομάδα της προεκλαμψίας.

		Group				P Pearson's χ^2 test
		Control		Preeclampsia		
		N	%	N	%	
RENIN-Dde I	CC	34	81	23	54,8	0,007*
	CT	8	19	13	31	
	TT	0	0	6	14,3	

Πίνακας 4. Εμφάνιση πολυμορφισμών στις δύο ομάδες πλυθησμών.

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η έκφραση της RENIN-Dde I στις δύο ομάδες της μελέτης:



Στον πίνακα 5 παρακάτω δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας από την παρουσία του πολυμορφισμού στο γονίδιο της ρενίνης. Οι ετερόζυγοι CT και οι ομόζυγοι TT για τις **RENIN-Dde I** περιπτώσεις είχαν 3,51 φορές υψηλότερη πιθανότητα να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

		OR (95% ΔΕ)⁺	P
RENIN-Dde I	CC (αναφ.)		
	CT/TT	3,51 (1,32 - 9,36)	0,012

Πίνακας 5. Πιθανότητα προεκλαμψίας και Renin-SNP.

Στον πίνακα 6 παρακάτω δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας από την παρουσία του πολυμορφισμού έχοντας λάβει υπόψη το βάρος γέννησης και την εβδομάδα γέννησης, αποδुकνεύοντας πως οι CT/TT περιπτώσεις για το **RENIN-Dde I** είχαν 3,53 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

		OR (95% ΔΕ)⁺	P
RENIN-Dde I	CC (αναφ.)		
	CT/TT	3,53 (1,32 - 9,44)	0,012

Πίνακας 6. Πιθανότητα προεκλαμψίας, βάρος νεογνού, εβδομάδα γέννησης.

Ακολούθως στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η σχέση του πολυμορφισμού RENIN-Dde I με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία. Δεν βρέθηκε σημαντική σχέση του πολυμορφισμού RENIN-Dde I με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη.

		RENIN-Dde I				P Fisher's exact test
		CC		CT/TT		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	18	78,3	13	68,4	0,780
	2ος	2	8,7	3	15,8	
	3ος	3	13,0	3	15,8	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	14	60,9	10	52,6	0,454
	Κορίτσι	7	30,4	9	47,4	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	2	8,7	0	0,0	
Δίδυμη κύηση	Όχι	20	87,0	17	89,5	>0,999
	Ναι	3	13,0	2	10,5	

Πίνακας 7. Πολυμορφισμός RENIN-Dde I τόκος, φύλο νεογνού και δίδυμη κύηση.

Τελικώς, στον Πίνακα 8 ακολούθως παρουσιάζεται η σχέση του πολυμορφισμού με την εβδομάδα κύησης και με το βάρος γέννησης στην ομάδα με προεκλαμψία, για τον οποίο δεν βρέθηκε σημαντική σχέση.

		Εβδομάδα κύησης	P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
RENIN-Dde I	CC	32 (31 - 34)	0,436 ⁺
	CT	32 (32 - 34)	
	TT	30 (28 - 34)	
		Βάρος γέννησης (gr)	P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
RENIN-Dde I	CC	1655 (1340 - 2100)	0,552
	CT	1750 (1260 - 2315)	
	TT	1160 (750 - 2390)	

Πίνακας 8. Συσχετισμός βάρους γέννησης και εβδομάδας κύησης.

Συνοπτικά μπορεί να ειπωθεί πως εκείνες οι μητέρες που παρουσίασαν συμπτώματα προεκλαμψίας, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά πρόωρου τοκετού, με τα νεογνά τους ασχέτως φύλου, να έχουν μικρότερο βάρος, γεγονός που συνιστά την εμφάνιση περισσότερων (3,51 φορές) ετερόζυγων και ομόζυγων ασθενών μητέρων για το προς μελέτη πολυμορφισμό του γονιδίου της ρενίνης σε σύγκριση με τις υγιείς μητέρες, αποτελώντας ένα σημαντικό εύρημα.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη του συσχετισμού που μπορεί να υπάρχει μεταξύ του γενετικού πολυμορφισμού C5312T του γονιδίου της ρενίνης, με την εμφάνιση της προεκλαμψίας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη γενετικού υλικού (DNA), τόσο από γυναίκες με φυσιολογική κύηση όσο και από γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία, στις οποίες αναλύθηκαν κάποια κλινικά αλλά και δημογραφικά χαρακτηριστικά τους. Όπως ήταν αναμενόμενο και με βάση την παγκόσμια βιβλιογραφία, στις γυναίκες με προεκλαμψία, στην τελευταία τους γέννα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κύησης με μέσο όρο τις 32 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το 100% των γυναικών με προεκλαμψία να εμφανίζουν πρόωρο τοκετό και αντίστοιχα το βάρος του εμβρύου να παρουσιάζει μείωση, πάνω από 50% σε σχέση με τα έμβρυα που προήρθαν από φυσιολογική γέννα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σχεδόν το 5% των εμβρύων πεθαίνει στις γυναίκες που παθαίνουν προεκλαμψία κατά την διάρκεια της κύησης. Παρ' όλα αυτά από τη στατιστική μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά τον αριθμό της γέννας, το φύλο του νεογνού και τη δίδυμη κύηση, παράγοντες που δεν φαίνεται να επηρεάζουν την εμφάνιση της προεκλαμψίας.

Επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι υπάρχει γενετικό υπόβαθρο πίσω από την προεκλαμψία. Πολλά είναι τα υποψήφια γονίδια τα οποία έχουν μελετηθεί και αφορούν την θρομβοφιλία, την ενδοθηλιακή λειτουργία, το οξειδωτικό στρες, τον μεταβολισμό των λιπιδίων, αγγειοδραστικές πρωτεΐνες, αλλά και την γενετική του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς στον γενικό πληθυσμό φαίνεται ότι η προεκλαμψία είναι μία πολύπλοκη γενετική διαταραχή, η οποία παρουσιάζει όμως και περιβαλλοντική αιτιολογία.

Είναι ευρέως γνωστό ότι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πλακούντα, στην κανονική εγκυμοσύνη, αλλά και στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν όλα τα συστατικά του συστήματος κατά τη διάρκεια της κανονικής και της μη φυσιολογικής εγκυμοσύνης, δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητό και ξεκάθαρο ακόμη. Ενώ υπάρχει γενική ρύθμιση των RAS σε μία φυσιολογική εγκυμοσύνη, αυτή η λεπτή ισορροπία χάνεται στην προεκλαμψία. Ο κεντρικός ρόλος του πλακούντα στην προεκλαμψία είναι αδιαμφισβήτητος, δεδομένου ότι όλη η παθογένεια της διαταραχής αυτής οφείλεται στην ατελή πλακουντοποίηση του.

Σήμερα, οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα πεδία έρευνας στην ιατρική. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων λοιπόν που εμπλέκονται στο σύστημα RAS, παίζουν σημαντικό ρόλο στο φαινότυπο της προεκλαμψίας. Γνωρίζουμε ότι σε περιπτώσεις προεκλαμψίας η έκφραση της ρενίνης αυξάνεται στατιστικά σε σημαντικό βαθμό, και ότι ο πολυμορφισμός C5312T rs127508 παρουσιάζει αύξηση της μεταγραφής της ρενίνης, δρώντας πάνω στο σημείο του ενισχυτή της. Άρα είναι σημαντικό στοιχείο ότι στις γυναίκες της έρευνας, που είχαν εμφανίσει προεκλαμψία, μετά την ανάλυση του Dna τους, παρατηρήθηκε 3,5 φορές μεγαλύτερη συχνότητα ετερόζυγου ή ομόζυγου πολυμορφισμού C5312T rs12750834. Ακόμα ο λόγος του βάρους νεογνού προς την εβδομάδα της κύησης συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα του πολυμορφισμού, αφού όπως αναφέρθηκε αυτοί οι δύο παράγοντες αυξάνονται στατιστικά σε σημαντικό βαθμό στην προεκλαμψία. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση άλλων δημογραφικών χαρακτηριστικών με την συχνότητα του πολυμορφισμού της ρενίνης.

Όσον αφορά τις μελέτες των πολυμορφισμών και τη σύνδεση τους με ασθένειες, τονίζεται ότι ένα αλληλόμορφο που ευνοεί την εμφάνιση της προεκλαμψίας στη συγκεκριμένη περίπτωση δρα με έναν από τους τρεις παρακάτω τρόπους. Πρώτον, προκαλώντας την δυσλειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών, δεύτερον παρακαλύποντας τις ενέργειες άλλων παραγόντων και τρίτον αλληλεπιδρώντας με άλλο γενετικό δείκτη. Οπότε, αναμένεται να σχεδιασθεί και να μελετηθεί με ποιόν από τους παραπάνω τρόπους που αναφέρθηκαν το αλληλόμορφο C5312T rs12750834 οδηγεί στην εμφάνιση προεκλαμψίας, με σκοπό την δημιουργία βιοδείκτη ή την δημιουργία της κατάλληλης θεραπείας.

Συμπερασματικά, η αύξηση της έκφρασης της ρενίνης μέσω του πολυμορφισμού C5312T rs12750834, οδηγεί σε αυξημένες πιθανότητες για την εκδήλωση της προεκλαμψίας. Η περαιτέρω μελέτη για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό αλλά και για την ρενίνη μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της ευαισθησίας του συστήματος RAS, της ANG II και άρα να οδηγήσει στη διαλεύκανση του μηχανισμού της παθογένεσης και στην επιλογή της βέλτιστης θεραπείας της προεκλαμψίας, αλλά και της υπέρτασης γενικότερα. Έρευνες στο μέλλον θα μπορούσαν να στραφούν στη μελέτη της γενετικής και κληρονομικής προέλευσης του πολυμορφισμού καθώς και στην αναστολή της έκφρασης της ρενίνης μέσω του μηχανισμού που προκαλεί αυτό τον πολυμορφισμό. Επίσης, μελέτες παγκοσμίως έδειξαν ότι οι βιοδείκτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν σημαντικά στην διάγνωση, την πρόληψη αλλά και στην θεραπεία της προεκλαμψίας και αποτελούν μια πολύ σημαντική και πολλά υποσχόμενη πτυχή στην αντιμετώπιση της διαταραχής αυτής.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να αναφέρω ότι τα αποτελέσματα μας είναι ενθαρρυντικά, καθώς φάνηκε να υπάρχει τάση συσχέτισης μεταξύ του

πολυμορφισμού C5312T rs12750834, στο γονίδιο Renin και της προεκλαμψίας. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι για να εξαρθούν ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει να εξεταστεί μεγαλύτερος αριθμός τόσο φυσιολογικών, όσο και παθολογικών δειγμάτων.

Βιβλιογραφία

1. **Abalos E, a C Cuesta, a G Carroli, a Z Qureshi, b M Widmer, c JP Vogel, c, d JP Souza.** “Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health”. 2013, The WHO, 111/1471-0528.12629.
2. **Abd Alla S, Abdel-Baset A, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U.** “Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension”. *J Mol Neurosci* 2005; 26 (2–3): 185–192.
3. **AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U.** “Increased AT(1) receptor heterodimers in pre-eclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness”. *Nat Med* 2001; 7(9): 1003–1009.
4. **Allen, R.E., Rogozinska, E., Cleverly, K., Aquilina, J., Thangaratinam, S.** “Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with pre-eclampsia: A meta-analysis”. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2014, 182, 194–201.
5. **Amel A.F. El-Sayed,** “Pre-eclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements”. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 56 (2017) 593-598.
6. **Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, et al.** “Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases”. *Mol Hum Reprod.* 2011; 17: 637–52.
7. **Ariza AC, Bobadilla NA, Halhali A.** “Endothelin I and angiotensin II in pre-eclampsia”. *Rev Invest Clin* 2007; 59(1): 48–56.
8. **Ark M, Yilmaz N, Yazici G et al.** “Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and pre-eclamptic human placentas”. *Placenta* 2005; 26: 81–84.
9. **Arngrimsson, R. et al.** “Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population”. 1990 *Br J Obstet Gynaeco.* 97, 762–769.
10. **Atfi A, Dumont E, Colland F, Bonnier D, L’helgoualc’h A, et al.** “The disintegrin and metalloproteinase ADAM-12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor”. 2007 *J Cell Biol* 178: 201-208.

11. **Atkinson KR, Blumenstein M, Black MA et al.** “An altered pattern of circulating apolipoprotein E3 isoforms is implicated in pre-eclampsia”. *J Lipid Res* 2009; 50: 71–80.
12. **Banyasz I, Bokodi G, Vannay A et al.** “Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2 in retinopathy of prematurity”. *Curr Eye Res* 2006; 31: 685–690.
13. **Baltajian K, Bajracharya S, Salahuddin S, et al.** “Sequential plasma angiogenic factors levels in women with suspected pre-eclampsia”. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(1): 89e1–89e10.
14. **Baschat A.A.** “Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance”. *Obstet Gynecol Surv* 2004, 59: 617–27.
15. **Baumwell S, Karumanchi SA.** “Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms”. *Nephron Clin Pract* 2007; 106(2): c72– e81.
16. **Bezerra PC, Leao MD, Queiroz JW et al.** “Family history of hypertension as an important risk factor for the development of severe pre-eclampsia”. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89: 612–617.
17. **Bouda I., Makrydimasa G., Kalaitzidis R., Lolisa, D.E., Siamopoulos, K.C., Georgioua, I.** “Interaction between the polymorphisms of the renin-angiotensin system in pre-eclampsia”. 2003, *Reproductive Biology* 110; 8–11.
18. **Boucoiran, I., Thissier-Levy, S., Wu, Y., Wei, S.Q, Luo, Z.C., Delvin, E., Fraser, W.D., Audibert, F., Miros Study Group.** “Risks for pre-eclampsia and small for gestational age: Predictive values of placental growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase-1, and inhibin in singleton and multiple-gestation pregnancies”. *Am. J. Perinatol.* 2013, 30, 607–612.
19. **Brennecke SP, Gude NM, Di Iulio JL et al.** “Reduction of placental nitric oxide synthase activity in pre-eclampsia”. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93: 51–55.
20. **Brenner B.** “Thrombophilia and pregnancy loss”. *Thromb Res* 2002; 108: 197–202.
21. **Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R.** The “Great Obstetrical syndromes” are associated with disorders of deep placentation”. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(3): 193–201.
22. **Brown MA, et al.** “The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)”. *Hypertens Pregnancy*; 2001, 20(1): IX–XIV.

23. **Brown M.A.** "Pre-eclampsia: a lifelong disorder" *Med. J. Aust.* 179 (4) (2003) 182–183.
24. **Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, and Bell R.** "Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: Systematic review and meta-analysis". *2013 European Journal of Epidemiology* 28: 1–19.
25. **Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC.** "Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy". *Placenta*, 2009 30 (6): 473–82.
26. **Canto P, Canto-Cetina T, Juarez-Velazquez R et al.** "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and glutathione S-transferase P1 A313G are associated with a reduced risk of pre-eclampsia in Maya-Mestizo women". *Hypertens Res* 2008; 31: 1015–1019.
27. **Carty DM, Delles C, Dominiczak AF.** "Pre-eclampsia and future maternal health". *J Hypertens.* 2010; 28: 1349–1355.
28. **Cetin I, Huppertz B, Burton G, Cuckle H, Gonen R, et al.,** "Pregenesis pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies?". *2011 Placenta* 32 Suppl: S4-16.
29. **Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, et al.** "Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia". *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17(1): 3–18.
30. **Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, et al.** "Plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors have prognostic value in women presenting with suspected pre-eclampsia to the obstetrical triage area: a prospective study". *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27(2): 132–44.
31. **Changlong G., Xiaofang C., Wang Q., Guangyu W., Lisha A., Meng D., Yue Q., Ying Y., Hui L., Yuting W., Shuo W., Xingyu W and Xu M.,** "Contribution of TIMP3 polymorphisms to the development of pre-eclampsia in Han Chinese women". *J Assist Reprod Genet*, 30 June 2015.
32. **Chappell S & Morgan L.** "Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia". *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 443–458.
33. **Chen CP.** "Placental abnormalities and pre-eclampsia in trisomy 13 pregnancies". *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2009; 48(1): 3–8.

34. **Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T.** “Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors”. *Kidney Int* 1998; 54(S67): S95–S99.
35. **Colbern GT, Chiang MH, Main EK.** “Expression of the non-classic histocompatibility antigen HLA-G by pre-eclamptic placenta”. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170: 1244–1250.
36. **Conde-Agudelo, A.; Villar, J.; Lindheimer, M.** “World health organization systematic review of screening tests for pre-eclampsia”. *2004 Obstet. Gynecol,* 104, 1367–1391.
37. **Cruz-Munoz W, Sanchez OH, Di Grappa M, English JL, Hill RP, Khokha R.** “Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in timp-3-/- mice”. *Oncogene* 2006; 25: 6489–96.
38. **Descamps OS, Bruniaux M, Guilmot PF, Tonglet R, Heller FR.** “Lipoprotein metabolism of pregnant women is associated with both their genetic polymorphisms and those of their new born children”. *J Lipid Res.* 2005; 46(11): 2405–2414.
39. **Duley L.** “The global impact of pre-eclampsia and eclampsia”. *Semin Perinatol.* 2009; 33: 130–137.
40. **Duran-Reyes G, Gomes-Melendez MR, Morali De La Brena G, Mrecado-Pichardo E, Medina-Navarro R, Hicks-Gomez JJ.** “Nitric oxide synthesis inhibition suppresses implantation and decreases CGMP concentration and protein peroxidation”. *Life Sci.* 1999; 65: 2259–2268.
41. **Elahi MM, Asotra K, Matata BM et al.** “Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease”. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 163–172.
42. **El-Sherbiny W1, Nasr A, Soliman A.** “Metalloprotease (ADAM-12) as a predictor of pre-eclampsia: correlation with severity, maternal complications, fetal outcome, and Doppler parameters”. *Hypertens Pregnancy* 2012; 31(4): 442-50.
43. **Enquobahrie DA, Hevner K, Qiu C, Abetew DF, Sorensen TK, et al.** “Differential Expression of HrtA1 and ADAM-12 in Placentas from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies”. *2012, Reproductive System and Sexual Disorders:* 1: 110.
44. **Erez O, Romero R, Espinoza J, et al.** “The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of

- pre-eclampsia and small-for-gestational age”. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21(5): 279–87.
45. **Fabbro D, D’Elia AV, Spizzo R et al.** Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 56: 17–22.
 46. **Fisher SJ, McMaster M, Roberts M.** “The placenta in normal pregnancy and pre-eclampsia. In: Chesley’s Hypertensive Disorders in Pregnancy”. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press, Elsevier; 2009.
 47. **Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP.** “Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop pre-eclampsia”. *Placenta*. 2009; 30 (1): 15–24.
 48. **Fuchs S, Philippe J, Germain S, Mathieu F, Jeunemaitre X, Corvol P, et al.** Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *J Hypertens* 2002; 20: 2391-8.
 49. **Gallery ED & Brown MA** “Control of sodium excretion in human pregnancy”. *American Journal of Kidney Diseases*, 1987, 9 290–295.
 50. **Gallery, E. D., Mitchell, M. D. and Redman, C. W.** “Fall in blood pressure in response to volume expansion in pregnancy-associated hypertension (pre-eclampsia): why does it occur?”. 1984 *J. Hypertens.* 2, 177–182.
 51. **Gant N, Gilstrap.** “Hypertension in pregnancy”. 1996, ACOG. January Technical Bulletin 219.
 52. **Gathiram P, J Moodley.** “Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology”. *Cardiovasc. J. Afr.*, 2016; 27: 71-78.
 53. **Genbacev O, Difederico E, McMaster M, Fisher SJ.** “Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-eclampsia”. *Hum Reprod*. 1999; 14: 59–66.
 54. **Gennari-Moser, C., Khankin, E. V., Schuller, S., Escher, G., Frey, B. M., Portmann, C. B., Baumann, M. U., Lehmann, A. D., Surbek, D., Karumanchi, S. A. et al.** “Regulation of placental growth by aldosterone and cortisol”. 2011 *Endocrinology* 152, 263–271.
 55. **Gerhardt A, Goecke TW, Beckmann MW et al.** The G20210A prothrombin-gene mutation and the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 5G/5G genotype are associated with early onset of severe pre-eclampsia. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 686–691.
 56. **Ghulmiyyah L, Sibai B.** “Maternal mortality from pre-eclampsia/eclampsia”. *Semin Perinatol*. 2012; 36: 56–59.
 57. **Giudice LC, Conover CA, Bale L, et al.** “Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability

- in the placental bed during human implantation". *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(5): 2359–66.
58. **Grishko V, Pastukh V, Solodushko V, Gillespie M, Azuma J, Schaffer S.** "Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(6): H2364–H2372.
 59. **Gunda, P., Nagalingam, S. & Tirunilai, P.** "Role of tagged SNPs of the AGT gene in causing susceptibility to essential hypertension". *2016 Clinical and experimental hypertension* 38, 520–525.
 60. **Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK.** "Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1". *Exp Cell Res* 1998; 244(1): 147–56.
 61. **Harihana N, Shoemaker A, Wagner S.** "Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia". *Clin Pract* 2016; 13: 33e7.
 62. **Heida KY, Bots ML, de Groot CJ, van Dunne FM, Hammoud NM, Hoek A, Laven JS, Maas AH, Roeters van Lennep JE, Velthuis BK, and Franx A.** "Cardiovascular risk management after reproductive and pregnancy-related disorders: A Dutch multidisciplinary evidence-based guideline". *2016 European Journal of Preventive Cardiology* 23: 1863–1879.
 63. **Hertig A, Berkane N, Lefevre G, et al.** "Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of pre-eclampsia". *Clin Chem* 2004; 50(9): 1702–3.
 64. **Hayward C, Livingstone J, Holloway S, Liston WA, Brock DJH.** "An exclusion map for pre-eclampsia: assuming autosomal recessive inheritance". *1992 Am J Hum Gen*; 50: 749–57.
 65. **Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M.** "Perinatal outcome in women with recurrent pre-eclampsia compared with women who develop pre-eclampsia as nulliparas". *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186: 422–426.
 66. **Huppertz B.** "Placental origins of pre-eclampsia: challenging the current hypothesis". *Hypertension* 2008; 51(4): 970–975.
 67. **Huppertz B, Sammar M, Chefetz I, Neumaier-Wagner P, Bartz C, Meiri H.** "Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of pre-eclampsia". *Fetal Diagn Ther* 2008; 24(3): 230–6.

68. **Irani R.A. and Xia Y.** “The Functional Role of the Renin-Angiotensin System in Pregnancy and Pre-eclampsia”. *Placenta*. 2008 September; 29(9): 763–771.
69. **Isermann B, Sood R, Pawlinski R et al.** “The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy”. *Nat Med* 2003; 9: 331–337.
70. **Jacobsen J and Wewer UM.** “Targeting ADAM-12 in human disease: head, body or tail?”. 2009, *Curr Pharm Des* 15: 2300-2310.
71. **Jafar N., N Hippalgaonkar, NI Parikh.** “Pre-eclampsia and Hypertension in Pregnancy”, *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*, 2018, 154-159.
72. **Jennifer U, Marie Carbone1, Olivier Piconne1, Roland Asmar, Jean-Marc Ayoubi.** “Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis and management”. *Vascular Health and Risk Management* 2011, 7: 467–474.
73. **Jensen BL, Schmid C, Kurtz A.** “Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells”. *Am J Physiol* 1996; 271(3 Pt 2): F659–F669.
74. **Johnson MP, Roten LT, Dyer TD et al.** “The ERAP2 gene is associated with pre-eclampsia in Australian and Norwegian populations”. *Human Genetics* 2009; 126(5): 655–666.
75. **Jim B., S. Sharma, T. Kebede, A. Acharya.** “Hypertension in pregnancy: a comprehensive update” *Cardiol. Rev.* 18 (4) (2010).
76. **Jin, H. S. et al.** “Age-dependent association of the polymorphisms in the mitochondria-shaping gene, OPA1, with blood pressure and hypertension in Korean population”. 2011, *American journal of hypertension* 24, 1127–1135.
77. **Jin H, Ma KD, Hu R, et al.** “Analysis of expression and comparative profile of normal placental tissue proteins and those in pre-eclampsia patients using proteomic approaches”. *Anal Chim Acta* 2008; 629(1–2): 158–64.
78. **Kajantie E, Eriksson JG, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ.** “Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study”. *Stroke* 2009; 40(4): 1176–80.
79. **Kalousová et al.** “Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and pre-eclampsia”. *Adv Clin Chem.*, 2014, 63: 169-209.
80. **Karumanchi S.A.** “Biomarkers in Pre-eclampsia”. 2017, *Biomarkers of Kidney Disease*, C-14, 555-594.

81. **Karumanchi SA, Lindheimer MD.** “Advances in the understanding of eclampsia”. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10: 305–12.
82. **Kenny LC, Broadhurst D, Brown M, Dunn WB, Redman CW, Kell DB, Baker PN.** “Detection and identification of novel metabolomic biomarkers in pre-eclampsia”. *Reprod Sci.* 2008; 15: 591–597.
83. **Kenny, L., Broadhurst, D.I., Dunn W., Brown, M., North, R.A., et al.** “Robust Early Pregnancy Prediction of Later Pre-eclampsia Using Metabolomic Biomarkers”, 2010, *Hypertension.* 2010; 56: 741-749.
84. **Khalil A, Cowans NJ, Spencer K, Goichman S, Meiri H, Harrington K.** “First trimester maternal serum placental protein 13 for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk”. *Prenat Diagn* 2009; 29(8): 781–9.
85. **Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF.** “WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review”. *Lancet* 2006; 367: 1066–74.
86. **Kobashi, G. et al.** “The M235T variant of the angiotensinogen gene and the body mass index are useful markers for prevention of hypertension in pregnancy: a tree-based analysis of gene-environment interaction”. 2002 *Semin Thromb Hemost.* 28, 501–506.
87. **Kobayashi N, Hanaoka M, Droma Y, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K, et al.** “Polymorphisms of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene are associated with resistance to high-altitude pulmonary edema (HAPE) in a Japanese population: a case control study using polymorphic microsatellite markers”. 2013, *PLoS One*; 8, e71993.
88. **Koga K, Mor G.** “Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface”. *Reprod Sci* 2008; 15(3): 231–242.
89. **Kulkarni Hemant,** “ADAM-12: The Usual Suspect in Pre-eclampsia”. *Reproductive System and Sexual Disorders: Current Research*, 2013, Volume 2, Issue 2, 2: 121.
90. **Kumar A, Begum N, Prasad S, Agarwal S, Sharma S.** IL-10, “TNF-alpha & IFN-gamma: potential early biomarkers for pre-eclampsia”. *Cell Immunol* 2013; 283(1–2): 70–74.
91. **Kusanovic JP, Romero R, Chaiworapongsa T, et al.** “A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop pre-eclampsia”. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22(11): 1021–38.

92. **Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, Pecks U, Rath W, Pufe T, et al.** “Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2): implications for pre-eclampsia”. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286(50): 42863-72.
93. **Laasanen, J., Romppanen, E., Hiltunen, M., Helisalmi, S., Mannermaa, A., Punnonen K. and Heinonen S.** “Two exonic single nucleotide polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene are jointly associated with pre-eclampsia”, 2002, *European Journal of Human Genetics*, 10, 569 – 573.
94. **Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V et al.** “Susceptibility loci for pre-eclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families”. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 168–177.
95. **LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS et al.** “Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during pre-eclampsia”. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9: 480–485.
96. **Levine RJ, Lam C, Qian C, et al.** “Soluble endoglin and other circulating anti-angiogenic factors in pre-eclampsia”. *N Engl J Med* 2006; 355(10): 992–1005.
97. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.** “Circulating angiogenic factors and the risk of pre-eclampsia”. *N Engl J Med* 2004; 350: 672–683.
98. **Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, Glazer NL, Morrison AC, Johnson AD, Aspelund T, Aulchenko Y, Lumley T, Kottgen A, Vasan RS, Rivadeneira F, Eiriksdottir G, Guo X, et al.** Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet.* 2009; 41: 677– 687.
99. **Li X., Tan H., Zhou H., Hu S., Zhang T., Li Y., Dou Q., Lai Z., and Chen F.** “Renin–angiotensin–aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and pre-eclampsia: A case–control gene association study”. 2016, *Nature, Sci. Rep.* 6, 38030.
100. **Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH, Kim MY, Ryu HM.** “Effective prediction of pre-eclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors”. *Obstet Gynecol* 2008; 111(6): 1403–9.
101. **Lin J & August P.** “Genetic thrombophilias and pre-eclampsia: a meta-analysis”. *Obstet Gynecol* 2005; 105: 182–192.

102. **Lisonkova S, K.S. Joseph.** “Incidence of pre-eclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease”. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 209 (2013) 544.
103. **Magee, L.A., Pels, A., Helewa, M., Rey, E., von Dadelszen, P.** “Diagnosis, evaluation and management of the hypertensive disorders of pregnancy”. 2014, *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women’s Cardiovascular Health* 4, 2014, 105–145.
104. **Mandy J. Bell.** “A Historical Overview of Pre-eclampsia-Eclampsia”, *Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2010 September; 39(5): 510–518.
105. **Manyonda, I.T., Slater, D.M., Fenske, C., Hole, D., Choy, M.Y. and Wilson, C.** “A role for noradrenaline in pre-eclampsia: towards a unifying hypothesis for the pathophysiology”. *Br J Obstet Gynaecol*, 1998 105, 641-8.
106. **Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al.** “Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene”. *J Biol Chem.* 1993; 268(23): 17478–17488.
107. **Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Osterman MJ, Kirmeyer S, Mathews TJ, and Wilson EC.** (2011) “National Vital Statistics Reports” 60: 1–70.
108. **May K, Rosenlöf L, Olsson MG, Centlow M, Mörgelin M, et al.** “Perfusion of human placenta with hemoglobin introduces pre-eclampsia-like injuries that are prevented by $\alpha 1$ -microglobulin”. *Placenta*, 2011, 32: 323-332.
109. **Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA.** “Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in pre-eclampsia”. *J Clin Invest.* 2003; 111: 649–658.
110. **Mann GE, Niehueser-Saran J, Watson A, Gao L, Ishii T, de Winter P, et al.** “Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and pre-eclampsia”. *Sheng Li Xue Bao* 2007; 59(2): 117-27.
111. **Medica I, Kastrin A, Peterlin B.** “Genetic polymorphisms in vasoactive genes and pre-eclampsia: a meta-analysis”. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 131(2): 115–126.
112. **Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB.** “Angiotensin (1–7) in normal and pre-eclamptic pregnancy”. *Endocrine* 2002; 18(3): 239–245.

113. **Mihn D, Razvun C, Malutun A, Michaela C.** “Evaluation of maternal systemic inflammatory response in pre-eclampsia”. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2015; 54: 160-6.
114. **Mikhail, M.S., Anyaegbunam, A., Garfinkel, D., Palan, P.R., Basu, J. and Romney, S.L.** “Pre-eclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene in women with pre-eclampsia”. *Am J Obstet Gynecol*, 1994 171, 150-7.
115. **Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, et al.** “Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene”. *Eur J Biochem.* 1994; 223(3): 719–726.
116. **Moore N, Niamh D, O'Brien P., et al.** “Renin Gene Polymorphisms and Haplotypes, Blood Pressure and Responses to Renin-Angiotensin System Inhibition”. 2007, *Hypertension.* 50: 340-7.
117. **Morgan T, Craven C, Nelson L, Lolouel JM & Ward K** “Angiotensinogen T235 variant expression is elevated in decidual spiral arteries”. 1997, *Journal of Clinical Investigation* 100: 1406–1415.
118. **Morgan T, Craven C, Ward K.** “Human spiral artery renin-angiotensin system”. *Hypertension* 1998; 32(4): 683–687.
119. **Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W.** “Genes and the pre-eclampsia syndrome”. *J Perinat Med.* 2008; 36: 38–58.
120. **Myers, J.E., Kenny, L.C., McCowan, L.M., Chan, E.H., Dekker, G.A., Poston, L., Simpson, N.A., North, R.A., Consortium, S.** “Angiogenic factors combined with clinical risk factors to predict preterm pre-eclampsia in nulliparous women: A predictive test accuracy study”. *BJOG* 2013, 120, 1215–1223.
121. **Norikazu Ueki, Satoru Takeda, Daisuke Koya, and Keizo Kanasaki1,** “The Relevance of the Renin-Angiotensin System in the Development of Drugs to Combat Pre-eclampsia” *International Journal of Endocrinology*, Volume 2015, Article ID 572713, 12 pages.
122. **Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kato T, Kowa H, Kurahashi H, Udagawa Y.** “Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia”. *Placenta* 2007; 28(5–6): 487–97.
123. **Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ.** “Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after pre-eclampsia and gestational hypertension”. *Circulation* 2010; 122(5):478–87.

124. **Odibo AO, Zhong Y, Longtine M, Tuuli M, Odibo L, et al.** “First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with pre-eclampsia and fetal growth restriction”. 2011, *Placenta* 32: 333-338.
125. **Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM.** “Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney”. *Hypertension* 1997; 30(5): 1238–1246.
126. **Palomaki GE, Haddow JE, Haddow HR, et al.** “Modeling risk for severe adverse outcomes using angiogenic factor measurements in women with suspected preterm pre-eclampsia”. *Prenat Diagn* 2015; 35(4): 386–93.
127. **Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI et al.** “Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia”. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 321–324.
128. **Parikh SM, Karumanchi SA.** “Putting pressure on pre-eclampsia”. *Nat Med* 2008; 14(8): 810–2.
129. **Park J., Song K., Jang Y. and Kim Yoon S.** “A Polymorphism of the Renin Gene rs6682082 Is Associated with Essential Hypertension Risk and Blood Pressure Levels in Korean Women”. 2015, *Yonsei Med J* 56(1): 227-234.
130. **Peracoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, et al.** “High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset pre-eclampsia”. *J Reprod Immunol* 2013; 100(2): 129–134.
131. **Poisner AM.** “The human placental renin-angiotensin system”. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(3): 232–252.
132. **Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA.** “Pre-eclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease”. *Circulation* 2011; 123(24): 2856–69.
133. **Rana S, Hacker MR, Modest AM, Salahuddin S, Lim KH, Verlohren S, Perschel FH, Karumanchi SA.** “Circulating angiogenic factors and risk of adverse maternal and perinatal outcomes in twin pregnancies with suspected pre-eclampsia”. *Hypertension*. 2012; 60: 451–458.
134. **Redman CW, Sacks GP, Sargent IL.** “Pre-eclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy”. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180-2.
135. **Redman CW, Sargent IL.** “Latest advances in understanding pre-eclampsia”. *Science* 2005; 308(5728): 1592–1594.

136. **Redman CW, Sargent IL.** “Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia”. *Placenta*, 2007.11.016.
137. **Riento K & Ridley AJ.** “Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour”. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 446–456.
138. **Roberts JM.** “Endothelial dysfunction in pre-eclampsia.” *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16: 5–15.
139. **Roberts JM, Gammill HS.** “Pre-eclampsia: Recent insights. Hypertension”. 2005; 46: 1243–1249.
140. **Roberts JM, Hubel CA.** “The two stage model of pre-eclampsia: Variations on the theme”. *Placenta*. 2009; 23: S32–S37.
141. **Romero R, Chaiworapongsa T.** “Pre-eclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an anti-angiogenic state”. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 2775–7.
142. **Romero R, Nien JK, Espinoza J, et al.** “A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop pre-eclampsia and deliver a small for gestational age neonate”. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21(1): 9–23.
143. **Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-Tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine RJ, Karumanchi SA.** “A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop pre-eclampsia and deliver a small for gestational age neonate”. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008; 21: 9–23.
144. **Rodríguez-Sánchez I. P, Suárez-Caro S., Rivas-Solís E, et al.** “Association of the polymorphism 12109 g>A from the REN gene as a risk factor for preterm birth”. 2016; *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, Oct-Dec; 17(4).
145. **Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, Rosso P.** “Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with pre-eclampsia or fetal growth restriction”. *Hypertension* 2006; 47(2): 203–208.
146. **Salimi S, Mokhtari M, Yaghmaei M, Jamshidi M & Naghavi A** “Association of angiotensin-converting enzyme intron 16 insertion/ deletion and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms with pre-eclampsia in South East of Iran”. 2011, *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 941515.

147. **Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE.** “Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of anti-angiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in pre-eclampsia”. *Hypertension*. 2008; 52(2): 402–407.
148. **Shah, D.M.** “Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of pre-eclampsia”, 2005. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F614–F625.
149. **Shahvaisizadeh, F., Movafagh, A., Omrani, M. D., Vaisi-Raygani, A., Rahimi, Z. and Rahimi, Z.** “Synergistic effects of angiotensinogen -217 G→A and T704C (M235T) variants on the risk of severe pre-eclampsia”. 2012 *JRAAS*, doi: 10.1177.
150. **Sharma A, Satyam A & Sharma JB. Leptin.** “IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women”. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 21–30.
151. **Sifakis S, Zaravinos A, Maiz N, Spandidos DA, Nicolaides KH.** First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(5): 472e1–7.
152. **Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, et al.** “Differential placental gene expression in severe pre-eclampsia”. *Placenta* 2009; 30(5): 424–33.
153. **Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ et al.** “Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort”. *BMJ* 2005; 331: 877.
154. **Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, Lindgren P, Ortiz-Nieto F, Wikstrom AK, Wikstrom J.** “Placental perfusion in normal pregnancy and early and late pre-eclampsia: a magnetic resonance imaging study”. *Placenta* 2014; 35(3): 202–206.
155. **Souza JP, Gulmezoglu AM, Carroli G, Lumbiganon P, Qureshi Z.** WHO MCS Research Group. The World Health Organization multicountry survey on maternal and new born health: study protocol. *BMC Health Serv Res* 2011; 11: 286.
156. **Spencer CA, Allen VM, Flowerdew G, Dooley K, Dodds L.** “Low levels of maternal serum PAPP-A in early pregnancy and the risk of adverse outcomes”. *Prenat Diagn* 2008; 28(11): 1029–36.
157. **Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Kuhnreich I, Meiri H.** “Second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index and maternal serum PP13 as markers of pre-eclampsia”. *Prenat Diagn* 2007; 27(3): 258–63.

158. **Stanton AV, Dicker P, O'Brien ET.** "Aliskiren monotherapy results in the greatest and the least blood pressure lowering in patients with high- and low-base line PRA levels, respectively". 2009, *Am J Hypertens*; 22: 954–957.
159. **Staff A.C., Benton S.J., Peter von Dadelszen, James M. Roberts, Robert N. Taylor, Robert W. Powers, D. Stephen Charnock-Jones, Christopher W.G. Redman.** "Redefining Pre-eclampsia Using Placenta-Derived Biomarkers". 2013, *Hypertension*. 2013; 61: 932-942.
160. **Staff AC, Johnsen GM, Dechend R, Redman CW.** "Pre-eclampsia and uteroplacental acute atherosclerosis: immune and inflammatory factors". *J Reprod Immunol* 2014; 101–102: 120–126.
161. **Stegers, E.A.; von Dadelszen, P.; Duvekot, J.J.; Pijnenborg, R.** "Pre-eclampsia". *Lancet* 2010, 376, 631–644.
162. **Sun B., Williams J. S., Pojoga L., Chamarthi B., et al.** "Renin Gene Polymorphism: It's Relationship to Hypertension, Renin Levels and Vascular Responses". 2011, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 12(4): 564–571.
163. **Sutherland A, Cooper DW, Howie PW, Liston WA, MacGillivray I.** "The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptic and controls". 1981 *Br J Obstet Gynaecol*; 88: 785–91.
164. **Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL.** "Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin". *PLoS One* 2013; 8(2):
165. **Tenhola S, Rahiala E, Halonen P, Vanninen E, Voutilainen R.** "Maternal pre-eclampsia predicts elevated blood pressure in 12-year-old children: evaluation by ambulatory blood pressure monitoring". *Pediatr Res* 2006; 59(2): 320–4.
166. **Tewksbury, D. A. and Dart, R. A.** "High molecular-weight angiotensinogen levels in hypertensive pregnant-women". 1982, *Hypertension* 4, 729–734.
167. **Than NG, Pick E, Bellyei S, et al.** "Functional analyses of placental protein 13/galectin-13". *Eur J Biochem* 2004; 271(6): 1065–78.
168. **Thangaratnam S, Coomarasamy A, O'Mahony F, et al.** "Estimation of proteinuria as a predictor of complications of pre-eclampsia: a systematic review". *BMC Med* 2009; 7:10.
169. **Thilaganathan, Wormald B, Zanardini C, Sheldon J, Ralph E, Papageorgiou AT.** "Early-pregnancy multiple serum markers and second-

- trimester uterine artery Doppler in predicting pre-eclampsia". *Obstet Gynecol.* 2010; 115: 1233–1238.
170. **Thornton JG & Macdonald AM.** "Twin mothers, pregnancy hypertension and pre-eclampsia". *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106: 570–575.
 171. **Tidwell, S.C., Ho, H.N., Chiu, W.H., Torry, R.J., Torry, D.S.** "Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical pre-eclampsia". *Am. J Obstet. Gynecol.* 2001, 184, 1267–1272.
 172. **Tranquilli, A.L., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J, Sibai, B.M., Steyn, W., Zeeman, G.G., Brown, M.A.** "The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the isshp". *Pregnancy Hypertens.* 2014, 4, 97–104.
 173. **Treloar SA, Cooper DW, Brennecke SP et al.** "An Australian twin study of the genetic basis of pre-eclampsia and eclampsia". *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 374–381.
 174. **Ukah, U.V., Dane A. De Silva, Beth Payne, Laura A. Magee, Jennifer A. Hutcheon, Helen Browne, J. Mark Ansermino, Tang Lee, Peter von Dadelszen.** "Prediction of adverse maternal outcomes from pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy: A systematic review". 2018, *Pregnancy Hypertension (2018)* 11: 115–123.
 175. **Vaisbuch E, Whitty JE, Hassan SS, Romero R, Kusanovic JP, Cotton DB, Sorokin Y, Karumanchi SA.** "Circulating angiogenic and anti-angiogenic factors in women with eclampsia". *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204: 152.
 176. **Vangjeli, C., Clarke, N., Quinn U., Dicker P., Tighe, O., Ho, C., O'Brien, E., et al.** "Confirmation That the Renin Gene Distal Enhancer Polymorphism REN-5312C/T Is Associated With Increased Blood Pressure". 2010, *Circ Cardiovasc Genet*; 3: 53-59.
 177. **Varniera N, M.A. Brownc, M. Reynoldsb, F. Pettitc, G. Davisc, G. Mangosc, A. Henrya,b.** "Indications for delivery in pre-eclampsia". *Pregnancy Hypertension (2018)* 11: 12–17.
 178. **Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al.** "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of pre-eclampsia". *Nat Med* 2006; 12(6): 642–9.
 179. **Verdonk K, Visser W, Van Den Meiracker AH, Danser AH.** "The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad". *Clin Sci (Lond)* 2014; 126(8): 537–544.

180. **Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, et al.** “The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in pre-eclamptic patients”. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206 (1): 58e1–8.
181. **Villar K, Say L, Gulmezoglu AM, et al.** “Eclampsia and pre-eclampsia: a health problem for 2.000 years”. *Pre-eclampsia*. London: RCOG Press; 2003: 189–207.
182. **White, J.M.** “ADAMS: Modulators of cell–cell and cell–matrix interactions”. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15, 598–606.
183. **Williams, P.J. and Broughton Pipkin F.** “The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy”. (2011), *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 25, 405–417.
184. **Williams P.J., Morgan L.** “The role of genetics in pre-eclampsia and potential pharmacogenomic interventions”. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2012, 5: 37–51.
185. **Wu CS, Nohr EA, Bech BH, Vestergaard M, Catov JM, Olsen J.** “Health of children born to mothers who had pre-eclampsia: a population-based cohort study”. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(3): 269e1–269e10.
186. **Wu P, Van den Berg C. , Alfirevic Z. , Shaughn O’Brien ,Maria Röthlisberger , Philip Newton Baker , Louise C. Kenny , Karolina Kublickiene and Johannes J. Duvekot.** “Early Pregnancy Biomarkers in Pre-Eclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis”, 2015, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 23035-23056.
187. **Xiang Y, Zhang X, Li Q, Xu J, Zhou X, Wang T, et al.** “Promoter hypomethylation of TIMP3 is associated with pre-eclampsia in a Chinese population”. *2013 Mol Hum Reprod.*; 19: 153–9.
188. **Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RC, Choi KC, et al.** “Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia”. 2010, *BJOG*; 117: 99–108.
189. **Xie, F., Hu, Y., Speert, D.P., Turvey, S., Peng, G., Money, D.M., Magee, L.A. and von Dadelszen, P.** “Toll-like Receptor Gene polymorphisms and Pre-eclampsia Risk: A Case-Control Study and Data Synthesis”. 2010, *Hypertension in Pregnancy*, 29: 390–398.
190. **Yang, P.; Baker, K.A.; Hagg, T.** “A disintegrin and metalloprotease 21 (ADAM-21) is associated with neurogenesis and axonal growth in developing and adult rodent CNS”. *J. Comp. Neurol.* 2005, 490, 163–179.

191. **Yang J, Shang J, Zhang S., Li H. and Liu H.** “The role of the renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: genetic polymorphisms and microRNA”. 2013 *Role of RAAS in pre-eclampsia*, 50: 2, R54.
192. **Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, Burton GJ.** “Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction”. *Am J Pathol.* 2008; 173: 451–462.
193. **Zafarmand MH, Nijdam ME, Franx A, Grobbee DE, Bots ML.** “The angiotensinogen gene M235T polymorphism and development of pre-eclampsia/eclampsia: a meta-analysis and meta-regression of observational studies”. *J Hypertens.* 2008; 26(9): 1726–1734.
194. **Zeeman GG.** “Neurologic complications of pre-eclampsia”. *Semin Perinatol.* 2009; 33 (3): 166–172.
195. **Zhang C, Austin MA, Edwards KL et al.** “Functional variants of the lipoprotein lipase gene and the risk of pre-eclampsia among non-Hispanic Caucasian women”. *Clin Genet* 2006; 69: 33–39.
196. **Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, Berkowitz G.** “Epidemiology of pregnancy-induced hypertension.” *Epidemiol Rev.* 1997; 19:218–232.
197. **Zhang H., Li Y.X., Peng W.J., Li Z.W., Zhang C., Di H., Shen X., Jun-Feng Zhu and Wei-Rong Yan.** “The Gene Variants of Maternal/ Fetal Renin-Angiotensin System in Pre-eclampsia: A Hybrid Case- Parent/Mother-Control Study”. 2017, *Scientific Reports* 7: 5087.
198. **Zhong Y, Tuuli M, Odibo AO.** “First-trimester assessment of placenta function and the prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction”. *Prenatal Diagn* 2010; 30(4): 293–308.
199. **Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, et al.** “Angiotensin receptor agonistic auto antibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice”. *Nat Med* 2008; 14(8): 855-62.
200. **Zintzaras E, Kitsios G, Harrison GA et al.** “Heterogeneity-based genome search meta-analysis for pre-eclampsia”. *Hum Genet* 2006; 120: 360–370.
201. **Zusterzeel PL, Peters WH, Burton GJ et al.** “Susceptibility to pre-eclampsia is associated with multiple genetic polymorphisms in maternal biotransformation enzymes”. *Gynecol Obstet Invest* 2007; 63: 209–213.