



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**" Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ
ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (e-NOS) ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ"**

υπό

ΝΙΚΟΛΑΟΥ Δ. ΖΔΟΥΚΟΠΟΥΛΟΥ

Μαιευτήρα Γυναικολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

© 2013 Νικόλαος Ζδουκόπουλος

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5^η/10-07-2013 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Ιωάννης Ε. **Μεσσήνης**
Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης **Στεφανίδης**
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ηλίας **Ζιντζαράς**
Καθηγητής Βιομαθηματικών-Βιομετρίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αλέξανδρος **Δαπόντε**
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Νταφόπουλος**
Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αντώνιος **Γκαράς**
Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της διδακτορικής διατριβής, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τους Καθηγητές της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής - Καθηγητή Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, Καθηγητή Ηλία Ζιντζαρά και Καθηγητή Ιωάννη Στεφανίδη-, χωρίς τη συνδρομή των οποίων δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Επιπλέον, θα αποτελούσε παράλειψη να μην αναφερθώ σε μια σειρά προσώπων που συνέβαλαν ιδιαίτερα στην πραγματοποίηση του ερευνητικού έργου, μεταξύ των οποίων την κ. Δοξάνη Χρύσα, Ιατρό, τον κ. Κίτσιο Γεώργιο, Ιατρό, το προσωπικό του εργαστηρίου Γενετικής και τους ιατρούς και μαίες της Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τους ευχαριστώ όλους θερμά για τη συμβολή και τη συμπαράστασή τους.

Νικόλαος Ζδουκόπουλος

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ατομικά στοιχεία

Ημερομηνία γεννήσεως: 01/02/1978.

Τόπος γεννήσεως: Λάρισα.

Διεύθυνση Κατοικίας: Νίκαια Λάρισας, ΤΚ 41005.

Τηλέφωνο: 2410-921256, 6947445077.

E-mail: nzdoukor@med.uth.gr

Εκπαίδευση- Προϋπηρεσία

1989-1995. Μέση εκπαίδευση: Γυμνάσιο Νίκαιας Λάρισας.

Γενικό Λύκειο Νίκαιας Λάρισας.

1996-2003. Εισαγωγή κατόπιν πανελληνίων εξετάσεων και φοίτηση στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

2003-2004. Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Γόννων Λάρισας

2004-2005. Έμμισθος εσωτερικός βοηθός στη Χειρουργική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.

2006-σήμερα. Υποψήφιος διδάκτωρ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2007-2008. Δωδεκάμηνη θητεία στις Ένοπλες Δυνάμεις (Στρατιώτης Υγειονομικού).

2009-2013. Έμμισθος εσωτερικός βοηθός στη Μαιευτική Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Διπλώματα

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Λίαν καλώς-2003).

Πτυχίο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Βιολογία της Αναπαραγωγής» (Άριστα-2009).

Άδεια χρησιμοποίησης τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας Μαιευτικής-Γυναικολογίας (2013)

Μέλος επιστημονικών εταιριών

Ιατρικός Σύλλογος Λάρισας

Δημοσιεύσεις

1. **Zdoukopoulos N**, Doxani C, Messinis IE, Stefanidis I, Zintzaras E. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene in preeclampsia: a candidate-gene association study. BMC Pregnancy Childbirth. 2011 Nov 3;11:89.
2. Papandreou CN, Doxani C, **Zdoukopoulos N**, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Bakalos G, Ziogas DC, Koufakis T, Zintzaras E. Evidence of association between methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to breast cancer: a candidate-gene association study in a South-eastern European population. DNA Cell Biol. 2012 Feb;31(2):193-8.
3. Zintzaras E, Grammatikou M, Kitsios GD, Doxani C, **Zdoukopoulos N**, Papandreou C, Patrikidou A. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer: a genetic association study and meta-analysis. J Hum Genet. 2010 Nov;55(11):743-8.
4. Zintzaras E, **Zdoukopoulos N**. A field synopsis and meta-analysis of genetic association studies in peripheral arterial disease: The CUMAGAS-PAD database. Am J Epidemiol. 2009 Jul 1;170(1):1-11.
5. **Zdoukopoulos N**, Zintzaras E. Genetic risk factors for placental abruption: a HuGE review and meta-analysis. Epidemiology. 2008 Mar;19(2):309-23.

**" Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ
ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (e-NOS) ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ"**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΖΔΟΥΚΟΠΟΥΛΟΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων),
2. **Δρ. Ηλίας Ζιντζαράς**, Καθηγητής Βιομαθηματικών-Βιομετρίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης**, Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η προεκλαμψία είναι μία πολυσυστηματική διαταραχή που επιπλέκει το 2-8% των κύσεων παγκοσμίως ενώ συνιστά παράλληλα σημαντική αιτία μητρικής και νεογνικής νοσηρότητας και θνητότητας, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ορίζεται ως κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από πρωτοεμφανιζόμενη υπέρταση και λευκωματουρία μετά την εικοστή εβδομάδα της κύησης και ενίοτε εξελίσσεται σε πολυοργανική διαταραχή με ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά. Τα κλινικά ευρήματα στην προεκλαμψία μπορεί να έχουν το χαρακτήρα μητρικού συνδρόμου (υπέρταση και λευκωματουρία με ή χωρίς άλλες πολυσυστηματικές διαταραχές) ή εμβρυικού συνδρόμου (ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, ελαττωμένο αμνιακό υγρό και διαταραχές οξυγόνωσης του εμβρύου). Παρά τη μείζονα συμμετοχή της προεκλαμψίας στη μητρική και νεογνική θνητότητα και νοσηρότητα, η αιτία της παραμένει αινιγματική. Η αιτιοπαθογένεια της εικάζεται ότι οφείλεται σε αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, γεγονός που την χαρακτηρίζει ως πολυπαραγοντική διαταραχή.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τη χαρτογράφηση των γονιδίων που συνεισφέρουν στην αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας προσανατολίζονται σε δύο κύριες προσεγγίσεις: α) στις μελέτες γενετικής σύνδεσης οι οποίες διεξάγονται σε οικογένειες με συνάθροιση περιστατικών προεκλαμψίας, και β) στις μελέτες γενετικής συσχέτισης οι οποίες διεξάγονται σε πάσχουσες και μάρτυρες από το γενικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός των υπευθύνων γενετικών παραγόντων έχει αποδειχθεί δυσχερής και μόνο ένας μικρός αριθμός ευρημάτων έχει έως σήμερα επαληθευτεί. Η περιορισμένη πρόοδος στη διαλεύκανση της γενετικής αιτιολογίας του νοσήματος έχει αποδοθεί σε παράγοντες σχετικούς με την

πολυγονιδιακή φύση της προεκλαμψίας αλλά και σε μεθοδολογικές ανεπάρκειες όπως η ελλιπής στατιστική ισχύς των μελετών, ο πτωχός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ατόμων και η μη αξιολόγηση γενετικών και περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων.

Δεδομένων των περιορισμών στην κατανόηση της γενετικής αιτιολογίας της προεκλαμψίας, στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήθηκε μία κλινική προσέγγιση για την ταυτοποίηση γενετικών τόπων σχετιζόμενων με τη νόσο. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε και διεξήχθη μία μελέτη γενετικής συσχέτισης του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθέτασης του μονοξειδίου του αζώτου (*e-NOS* ή *NOS3*) σε σχέση με την προεκλαμψία σε Θεσσαλικό πληθυσμό. Η επιλογή του γονιδίου *NOS3* βασίστηκε στο ρόλο του ως σημαντικού ρυθμιστή του αγγειακού τόνου στην μητροπλακουντιακή κυκλοφορία καθώς και στην εκτεταμένη διερεύνησή του σχετικά με την αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας στη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η συσχέτιση τριών γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* (4b/a, T-786C and G894T) και των απλοτύπων τους σε ένα δείγμα ασθενών και μαρτύρων που αποτελείτο από 102 ασθενείς με προεκλαμψία και 176 γυναίκες με ιστορικό ανεπίπλεκτων κυήσεων. Ωστόσο, η ανάλυση των παραπάνω πολυμορφισμών και των απλοτύπων τους δεν αποκάλυψε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την προεκλαμψία. Η μελέτη μας, ως εκ τούτου, δε φαίνεται να αποδίδει σημαντικό ρόλο στους μελετηθέντες πολυμορφισμούς όσον αφορά στην αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας. Εντούτοις, δεδομένης της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου και του μικρού μεγέθους του δείγματος ασθενών-μαρτύρων που μελετήθηκε, μία μικρή συμβολή των ανωτέρω πολυμορφισμών στην αιτιολογία της προεκλαμψίας σε συνδυασμό με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, δεν μπορεί να αποκλεισθεί.

Abstract

Preeclampsia is a multisystem disorder that complicates 2-8% of pregnancies worldwide, while representing at the same time a major contributor to maternal and neonatal mortality and morbidity, especially in developing countries. Preeclampsia is considered a clinical syndrome and is generally defined as new hypertension and substantial proteinuria at or after 20 weeks' gestation. The clinical findings of preeclampsia can manifest as either a maternal syndrome (hypertension and proteinuria with or without other multisystem abnormalities) or fetal syndrome (fetal growth restriction, reduced amniotic fluid, and abnormal oxygenation). However, despite its major complications, the underlying cause of preeclampsia remains elusive. The etiology of the disorder is currently considered to be multifactorial, stemming from the complex interaction between genetic and environmental factors.

The research efforts to map the predisposing genes and mutations have been divided in two major approaches: 1. Linkage analysis studies, which are performed in extended pedigrees that have shown accumulation of the disease, and 2. Genetic association studies, which are conducted in cases and controls retrieved from the general population. However, the identification of the responsible genetic factors has been proven to be very difficult and few positive findings have shown replication validity. This limited progress has been attributed to factors related to the polygenic nature of the disease and to methodological issues as well, such as the limited statistical power of individual studies, the poor phenotypic characterization of enrolled subjects and the lack of accounting for genetic and environmental interactions.

Given the limited understanding of the genetic etiology of preeclampsia, the current doctoral thesis aimed to perform a clinical approach to the genetics of preeclampsia, in order to identify responsible genetic loci. To this end, a preeclampsia genetic association study of *NOS3* gene polymorphisms and haplotypes was conducted in cases and controls derived from the Thessalian general population. Endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) is an important regulator of vascular tone and contributes to the reduction of the uteroplacental resistance seen in normal pregnancy. Therefore, the endothelial nitric oxide synthase gene (*NOS3*), has emerged as a logical candidate gene in the development of preeclampsia and has received considerable attention by researchers worldwide. In specific, we examined the association of three common variants of the *NOS3* gene (4b/a, T-786C and G894T) and their haplotypes in a case-control sample of 102 patients with preeclampsia and 176 women with a history of uncomplicated pregnancies. However, the single locus analysis for the three variants and the analysis of haplotypes revealed no significant association in relation to clinical status. Preeclampsia, nevertheless, is a complex disease with multifactorial etiology and given that our sample size was small, a minor contributory pathogenetic role of *NOS3* variants in conjunction with other genetic or environmental factors cannot be excluded.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	13
1.1. Προεκλαμψία.....	13
1.1.1. Διάγνωση και κλινική εικόνα.....	14
1.1.2. Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου.....	18
1.1.3. Αιτιολογία και παθογένεια.....	21
1.1.4. Γενετική της προεκλαμψίας.....	25
1.1.5. Ο ρόλος των πολυμορφισμών της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS3).....	35
1.2. Σκοπός της μελέτης.....	39
2. Υλικά και μέθοδοι.....	40
2.1. Χαρακτηρισμός και ταξινόμηση του υπό μελέτη πληθυσμού.....	40
2.2. Απομόνωση και γονοτύπωση του γενετικού υλικού.....	41
2.3. Στατιστική ανάλυση.....	46
3. Αποτελέσματα.....	53
3.1. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά.....	53
3.2. Ανάλυση γονότυπων.....	54
3.3. Ανάλυση γενετικών μοντέλων.....	55
3.4. Ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης.....	56
3.5. Ανάλυση απλότυπων.....	57
4. Συζήτηση.....	59
4.1. Μεθοδολογικά ζητήματα.....	59
4.2. Συζήτηση των αποτελεσμάτων.....	67
4.3. Συμπεράσματα.....	68
5. Βιβλιογραφία.....	70

1. Εισαγωγή

1.1. Προεκλαμψία

Η προεκλαμψία αποτελεί μία πολυσυστηματική διαταραχή αγνώστου αιτιολογίας που συναντάται αποκλειστικά στην ανθρώπινη κύηση (1). Χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική απάντηση στην πλακουντοποίηση και σχετίζεται με άνοδο της συστηματικής αγγειακής αντίστασης, αυξημένη συνάθροιση των αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξεως και δυσλειτουργία των κυττάρων του ενδοθηλίου των αγγείων (2). Η νόσος αναγνωρίζεται από τη σύγχρονη ανάπτυξη αρτηριακής υπέρτασης και λευκωματουρίας, ενώ ενίοτε εξελίσσεται σε πολυοργανική διαταραχή με ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά (3). Η προεκλαμψία παραμένει ακόμη και σήμερα κύρια αιτία μητρικής νοσηρότητας και θνητότητας, περιγεννητικών θανάτων, πρόωρου τοκετού και ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης (1). Για την αιτιοπαθογένειά της, η οποία δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, ενοχοποιείται κυρίως η ατελής πλακουντοποίηση και η διάχυτη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ενώ ο τελικός φαινότυπος του προεκλαμπτικού συνδρόμου διαμορφώνεται επιπλέον από το προϋπάρχον καρδιαγγειακό και μεταβολικό προφίλ της μητέρας (3). Επί του παρόντος, οι γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας αναγνωρίζονται βάσει επιδημιολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών αλλά τα διαγνωστικά της κριτήρια και η ακριβής αιτιολογία της παραμένουν ασαφή και βιολογικοί δείκτες που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν προς αυτή την κατεύθυνση εκλείπουν (1). Ως εκ τούτου η πρόληψή της είναι ακόμη ανέφικτη και η κλινική αντιμετώπισή της είναι συμπτωματική με στόχο το καλύτερο δυνατό μητρικό και περιγεννητικό αποτέλεσμα.

1.1.1. Διάγνωση και κλινική εικόνα

Η διάγνωση της προεκλαμψίας τίθεται συνήθως με την διαπίστωση αρτηριακής υπέρτασης σε συνδυασμό με λευκωματουρία (2, 4, 5). Ως αρτηριακή υπέρταση ορίζεται η ανίχνευση αρτηριακής πίεσης ίσης ή μεγαλύτερης του 140mmHg (συστολική) ή 90mmHg (διαστολική) σε δύο τουλάχιστο μετρήσεις με χρονική διαφορά άνω των 4-6 ωρών, μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης, σε γυναίκες που δεν είχαν ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης (2, 4-6). Οι μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης που χρησιμοποιούνται για να τεθεί η διάγνωση δεν πρέπει να απέχουν μεταξύ τους πάνω από 7 ημέρες (2, 4, 7). Η υπέρταση θεωρείται σοβαρή εάν διατηρούνται οι τιμές της συστολικής ή της διαστολικής αρτηριακής πίεσης μεγαλύτερες των 160mmHg ή των 110mmHg αντίστοιχα (7, 8). Ως λευκωματουρία ορίζεται η απέκκριση στα ούρα τουλάχιστο 300mg πρωτεΐνης κάθε 24 ώρες. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα ούρων 24ώρου τότε η λευκωματουρία ορίζεται ως συγκέντρωση πρωτεΐνης τουλάχιστο 300mg/L ($\geq 1+$ στο stick ούρων) σε δύο τουλάχιστο τυχαία δείγματα ούρων που ελήφθησαν με χρονική διαφορά μεταξύ τους μεγαλύτερη από 4-6 ώρες (2, 4). Εφόσον χρησιμοποιηθούν μετρήσεις με stick ούρων, αυτές δε θα πρέπει να απέχουν χρονικά μεταξύ τους περισσότερο από 7 ημέρες (2, 7). Η διάγνωση της προεκλαμψίας στηρίζεται επιπλέον σε ακριβείς μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης, οι οποίες εξαρτώνται και από τεχνικούς παράγοντες όπως το μέγεθος της περιχειρίδας, η θέση του χεριού σε σχέση με το επίπεδο της καρδιάς και η καλή λειτουργία του πιεσόμετρου. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι οι μετρήσεις της πρωτεΐνης που βασίζονται στο stick ούρων συχνά δεν αντιστοιχούν στις μετρήσεις σε δείγμα ούρων 24ώρου (9, 10). Ως εκ τούτου, ο ιδανικός έλεγχος για τη διαπίστωση της λευκωματουρίας θα πρέπει να είναι η ποσοτική μέτρηση σε δείγμα ούρων 24ώρου (10). Επί απουσίας λευκωματουρίας, η διάγνωση της προεκλαμψίας πρέπει να

πιθανολογείται όταν η αρτηριακή υπέρταση συνδυάζεται με επίμονη κεφαλαλγία, άλγος επιγαστρίου ή δεξιού υποχονδρίου με ναυτία ή έμετο, ή με θρομβοκυττοπενία και αυξημένα ηπατικά ένζυμα (5).

Η προεκλαμψία θεωρείται σοβαρή όταν η λευκωματουρία συνδυάζεται με σοβαρή αρτηριακή υπέρταση ή όταν η αρτηριακή υπέρταση συνδυάζεται με σοβαρή λευκωματουρία (>5g σε δείγμα ούρων 24ώρου) (10). Επιπλέον, η προεκλαμψία θεωρείται σοβαρή επί της παρουσίας πολυοργανικής συμμετοχής όπως σε περίπτωση πνευμονικού οιδήματος, σπασμών, ολιγουρίας (<500mL το 24ώρο), θρομβοκυττοπενίας (<100,000 αιμοπετάλια/μL), αυξημένων ηπατικών ενζύμων που συνοδεύονται με επίμονο άλγος υπογαστρίου ή δεξιού υποχονδρίου, ή σοβαρών και επίμονων συμπτωμάτων εκ του κεντρικού νευρικού συστήματος (π.χ. πονοκέφαλος, θολή όραση, σκοτώματα, διαταραχή επιπέδου συνείδησης) (5).

Τα προαναφερθέντα κριτήρια (πρωτοεμφανιζόμενη υπέρταση και λευκωματουρία μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης) είναι κατάλληλα για τη διάγνωση της προεκλαμψίας στις περισσότερες υγιείς ατόκους γυναίκες. Σε κάποιες γυναίκες ωστόσο, η ανάπτυξη σοβαρής υπέρτασης της κύησης (χωρίς λευκωματουρία) σχετίζεται με μεγαλύτερη μητρική και περιγεννητική νοσηρότητα από αυτή γυναικών με ήπια προεκλαμψία (8). Ακόμη, η υπέρταση ή η λευκωματουρία μπορεί να εκλείπουν στο 10-15% των γυναικών που θα αναπτύξουν αιμόλυση, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και θρομβοκυττοπενία (σύνδρομο HELLP) και στο 38% των γυναικών που θα εμφανίζουν εκλαμψία (11, 12). Οι παραπάνω καταστάσεις σχετίζονται με πολύ μεγαλύτερη μητρική και περιγεννητική νοσηρότητα από ότι η ήπια προεκλαμψία και αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την μελλοντική έρευνα για μεθόδους πρόληψης και αποτελεσματικότερης αντιμετώπισης της προεκλαμψίας (1, 12).

Η κλινική εικόνα με την οποία εμφανίζεται η προεκλαμψία ποικίλει ανάλογα με τα εμπλεκόμενα όργανα και συστήματα. Τα περισσότερο επιρρεπή στη φλεγμονή και την ενδοθηλιακή βλάβη είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, οι πνεύμονες, το ήπαρ, οι νεφροί και το κυκλοφορικό σύστημα ενώ σε αυξημένο κίνδυνο βρίσκονται και ο πλακούντας με το έμβρυο (3). Συνεπάγεται δε ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των οργάνων και συστημάτων που προσβάλλονται τόσο περισσότερες είναι οι μητρικές και περιγεννητικές επιπλοκές. Οι κλινικοί ιατροί οφείλουν να επαγρυπνούν ώστε να μην υποεκτιμήσουν τα κλινικά σημεία και συμπτώματα της σοβαρής προεκλαμψίας καθώς αυτά μπορεί να είναι μη ειδικά (π.χ. ναυτία και έμετοι). Επιπλέον χρειάζεται να έχουν πάντα υπόψη ότι η σοβαρή προεκλαμψία μπορεί να εκδηλωθεί αιφνίδια και ως εκ τούτου δε θα πρέπει να εφησυχάζουν όταν η νόσος έχει χαρακτηριστεί ήπια (3).

Μία σοβαρή μορφή προεκλαμψίας που συνδέεται με αυξημένες μητρικές και περιγεννητικές επιπλοκές εμφανίζεται με ανάπτυξη μικροαγγειοπαθητικής αιμόλυσης, κατανάλωσης αιμοπεταλίων και ηπατοκυτταρικής βλάβης λόγω περιπυλαίας ή εστιακής παρεγχυματικής νέκρωσης (σύνδρομο HELLP) (12). Οι ασθενείς αυτές έχουν συχνά άλγος επιγαστρίου ή δεξιού υποχονδρίου (40-90%) (12). Τα παραπάνω κλινικά συμπτώματα σε συνδυασμό με κεφαλαλγία, διαταραχές όρασης και ναυτία ή έμετο φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη προγνωστική αξία για την εμφάνιση μητρικών επιπλοκών από ότι έχουν οι εργαστηριακές παράμετροι (13). Το σύνδρομο HELLP επιπλέκει το 10-20% των περιπτώσεων σοβαρής προεκλαμψίας και αναπτύσσεται λιγότερο συχνά στις τελειόμηνες κύσεις. Σε ποσοστό 20% ωστόσο, αναπτύσσεται προς το τέλος της κύησης ενώ στο 30% εμφανίζεται μετά τον τοκετό (14). Άμεσες επιπλοκές του συνδρόμου HELLP αποτελούν η αποκόλληση πλακούντα (9-20%), η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (5-56%) και η οξεία νεφρική

ανεπάρκεια (7-36%) (3). Λιγότερο συχνές επιπλοκές είναι η εκλαμψία (4-9%), το πνευμονικό οίδημα (3-10%) και το υποκάψιο ηπατικό αιμάτωμα (<2%) (14). Η πιθανότητα εμφάνισης των επιπλοκών μπορεί να είναι πλασματικά υψηλή δεδομένου ότι τα στοιχεία αυτά προέρχονται κυρίως από τεταρτοβάθμια νοσηλευτικά ιδρύματα (15). Το συνολικό ποσοστό της σοβαρής μητρικής νοσηρότητας στη σοβαρή προεκλαμψία, συμπεριλαμβανομένης της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς, της εγκεφαλικής αιμορραγίας και των επιπλοκών του συνδρόμου HELLP, κυμαίνεται στο 15% (15). Η ενδοθηλιακή βλάβη σε συνάρτηση με την ελαττωμένη συμπαθητική νεύρωση στην οπίσθια εγκεφαλική κυκλοφορία καθιστούν τον εγκέφαλο λιγότερο ικανό για κατάλληλη νευρογενή απάντηση στην αυξημένη αρτηριακή πίεση και συνεπώς αρκετά ευάλωτο (3). Η εγκεφαλική βλάβη που προκύπτει μπορεί να εκδηλωθεί ως φλοιϊκή τύφλωση ή ως εκλαμψία (16).

Η εκλαμψία επιπλέκει το 1-2% των περιπτώσεων σοβαρής προεκλαμψίας και ορίζεται ως η εμφάνιση τονικο-κλονικών σπασμών σε γυναίκα έγκυο ή λεχώιδα, όταν δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλη αιτία (17). Αν και είναι δύσκολο να προβλεφθεί, στο 79% των περιπτώσεων εμφανίζονται πρόδρομα σημεία και συμπτώματα την εβδομάδα που προηγείται του πρώτου εκλαμπτικού σπασμού. Αυτά περιλαμβάνουν κεφαλαλγία (56%), διαταραχές όρασης (23%), άλγος επιγαστρίου (17%), αρτηριακή υπέρταση (48%), πρωτεϊνουρία (46%) και σύγχρονη εμφάνιση υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας (38%) (18). Επιπλέον, η υπέρταση και η πρωτεϊνουρία μπορεί να διαρκέσουν για αρκετές εβδομάδες μετά τον τοκετό (19).

Η προεκλαμψία δύναται να επιδεινωθεί ή και να πρωτοεμφανιστεί μετά τον τοκετό καθώς και να εξελιχθεί σταδιακά σε σοβαρές άτυπες μορφές παρόμοιες με την εκλαμψία (20). Δεν πρέπει να παραβλέπουμε ακόμη ότι γυναίκες με σημεία και συμπτώματα προεκλαμψίας μπορεί να πάσχουν από πλειάδα άλλων νόσων οι οποίες

οφείλουν να ληφθούν υπόψη στη διαφορική διάγνωση και να αποκλειστούν. Οι περιγεννητικές επιπλοκές στις γυναίκες με προεκλαμψία σχετίζονται με την εμφάνιση αποκόλλησης πλακούντα (0-6%), ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης (5-18%) και περιγεννητικής θνητότητας (0-9%), ενώ εξαρτώνται από τη βαρύτητα της νόσου και την ηλικία κύησης της ασθενούς (4).

1.1.2. Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Η προεκλαμψία επιπλέκει το 2-8% των κύσεων, ενώ μαζί με τις υπόλοιπες υπερτασικές διαταραχές της κύησης συνεισφέρει σημαντικά στη μητρική θνησιμότητα παγκοσμίως (21, 22). Στην Νότια Αμερική και την Καραϊβική οι υπερτασικές διαταραχές της κύησης ευθύνονται για το 26% περίπου των μητρικών θανάτων ενώ στην Αφρική και την Ασία για το 9% των θανάτων (22). Αν και η μητρική θνησιμότητα είναι πολύ χαμηλότερη στις ανεπτυγμένες χώρες από ότι στις αναπτυσσόμενες, το 16% των μητρικών θανάτων παγκοσμίως σχετίζεται με τις υπερτασικές διαταραχές της κύησης (21). Ωστόσο, η επίπτωση της προεκλαμψίας σταδιακά αυξάνεται και στις δυτικές χώρες πιθανότατα λόγω του αυξημένου επιπολασμού προδιαθεσικών παραγόντων όπως η χρόνια αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία (23, 24). Επιπλέον, με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας σχετίζονται και μερικοί εθνικοί πληθυσμοί (Αφρο-αμερικανοί, Φιλιπινέζοι) (25, 26), όπως και γυναίκες από τα χαμηλότερα κοινωνικο-οικονομικά στρώματα του πληθυσμού (27).

Αρκετοί παράγοντες έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας. Η προεκλαμψία γενικά θεωρείται νόσος της πρώτης κύησης και η πιθανότητα για την εμφάνισή της αυξάνει σε γυναίκες με περιορισμένη έκθεση στο

σπέρμα του συντρόφου τους πριν από τη σύλληψη (28-30). Η πιθανή προστατευτική δράση της μακροχρόνιας έκθεσης στο σπέρμα του συντρόφου τους θα μπορούσε να εξηγήσει τα αυξημένα ποσοστά της προεκλαμψίας σε γυναίκες μικρότερες των 20 ετών. Μία προηγηθείσα έκτρωση (αυτόματη ή τεχνητή) ή μία ανεπίπλεκη κύηση με τον ίδιο σύντροφο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας, αν και η προστατευτική αυτή δράση χάνεται με την αλλαγή συντρόφου (30, 31).

Επιπλέον, μελέτες από τη Σκανδιναβία και τις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν επιβεβαιώσει τη σημασία της πατρικής συμβολής (32, 33). Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι άνδρες που είχαν την πατρότητα μίας προεκλαμπτικής εγκυμοσύνης είχαν διπλάσιες πιθανότητες να συμβάλλουν στην εμφάνιση προεκλαμψίας και σε μία διαφορετική γυναίκα ανεξάρτητα από το αν η δεύτερη αυτή γυναίκα είχε προηγούμενο ιστορικό προεκλαμψίας ή όχι. Έτσι, οι γυναίκες αυτές είχαν αυξημένες πιθανότητες (~3%) για προεκλαμψία στη δεύτερή κύησή τους εάν ο σύντροφός τους είχε ήδη την πατρότητα μίας προεκλαμπτικής κύησης στο παρελθόν (33).

Στις πολυτόκες, η πιθανότητα προεκλαμψίας αυξάνει από 2.5% σε γυναίκες με ιστορικό ενός τοκετού σε 3.4% σε γυναίκες με ιστορικό πέντε τοκετών (34).

Ακόμη, μία προηγηθείσα φυσιολογική κύηση σχετίζεται με μικρή πιθανότητα για εμφάνιση προεκλαμψίας σε επόμενη κύηση, ενώ η προηγηθείσα προεκλαμψία είναι ισχυρός παράγοντας κινδύνου για την επανεμφάνισή της με την πιθανότητα αυτή να αγγίζει το 14% (35, 36). Επιπρόσθετα, οι γυναίκες με επανεμφανιζόμενη προεκλαμψία έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν τη σοβαρή μορφή της νόσου καθώς και υψηλότερα ποσοστά σοβαρών επιπλοκών όπως πρόωρο τοκετό, αποκόλληση πλακούντα και εμβρυϊκό θάνατο (37).

Οι πολύδυμες κύησεις αποτελούν γνωστό προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση προεκλαμψίας. Η πιθανότητα να νοσήσει μία γυναίκα είναι 2-3 φορές

μεγαλύτερη σε μία δίδυμη κύηση, από ότι σε μία μονήρη (38). Επιπλέον, η επίπτωση των υπερτασικών διαταραχών στις δίδυμες κυήσεις είναι μεγαλύτερη στις πρωτοτόκες από ότι στις πολυτόκες (39). Ακόμη, η προεκλαμψία συναντάται συχνότερα στην περίπτωση υδατιδώδους μύλης κύησης η οποία θα πρέπει να πιθανολογείται όταν η προεκλαμψία εμφανίζεται πριν τις 20 εβδομάδες. Η πολύδυμη και η μύλη κύηση σχετίζονται με αυξημένη πλακουντιακή μάζα, επομένως η προδιάθεση για προεκλαμψία αποδίδεται στην αυξημένη ποσότητα κυκλοφορούντων πλακουντιακών παραγόντων και στην κατ' επέκταση ισχυρότερη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση από τη μητέρα (40, 41). Επίσης, οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχουν ενοχοποιηθεί, εφόσον τόσο η θεραπεία της υπογονιμότητας *per se* όσο και η θεραπεία με δωρεά γαμετών σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά προεκλαμψίας (42, 43).

Η παχυσαρκία είναι αδιαμφισβήτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη προεκλαμψίας καθώς ο κίνδυνος αυξάνει με την αύξηση του δείκτη μάζας-σώματος (28, 44). Η παγκόσμια άνοδος στην επίπτωση της παχυσαρκίας πιθανόν να αυξήσει και τη συχνότητα της προεκλαμψίας (45). Η παχυσαρκία συνδέεται στενά με την αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία αποτελεί ανεξάρτητο προδιαθεσικό παράγοντα για την προεκλαμψία (46). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η παχυσαρκία ή η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζονται με τη νόσο δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν τη δυσλιπιδαιμία και το αυξημένο οξειδωτικό στρες, την υπεραντιδραστικότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και την ενισχυμένη σωληναριακή επαναρρόφηση του νατρίου, καθώς και την άμεση επίδραση της υπερινσουλιναιμίας στην πλακουντοποίηση (28).

Η υγιής κύηση αφ' εαυτή, είναι μία κατάσταση συστηματικής φλεγμονής, τουλάχιστο στο τρίτο τρίμηνο. Δεδομένου του παραπάνω γεγονότος, πιθανολογείται

ότι η προεκλαμψία δεν είναι μία ξεχωριστή οντότητα αλλά το ακραίο άκρο του φάσματος της μητρικής φλεγμονώδους αντίδρασης που προκαλείται από την κύηση καθεαυτή (1). Συνεπώς, κάθε παράγοντας που ενισχύει την αντίδραση αυτή θα μπορούσε δυνητικά να προδιαθέτει στην προεκλαμψία (47). Οπότε, παράγοντες που αυξάνουν την μητρική φλεγμονώδη αντίδραση, όπως λοιμώξεις και αυτοάνοσες διαταραχές, προδιαθέτουν γυναίκες στην προεκλαμψία (48-50). Σχετικά πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι κάποιες μητρικές λοιμώξεις, όπως του ουροποιητικού, η περιοδοντίτιδα και λοιμώξεις από χλαμύδια και κυτταρομεγαλοϊό, σχετίζονται με την προεκλαμψία (49, 50). Επιπλέον, η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση διαδραματίζει πιθανότατα σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο η παχυσαρκία προδιαθέτει στην προεκλαμψία (51).

Στις γυναίκες με προεκλαμψία έχουν ανιχνευθεί υψηλότερα ποσοστά θρομβοφιλικών διαταραχών σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (52, 53). Εν τούτοις, πιο πρόσφατες μελέτες δεν μπόρεσαν να αναπαράγουν τα παραπάνω ευρήματα (54). Η ασυμφωνία των μελετών θα μπορούσε να οφείλεται στην ετερογένεια του υπό μελέτη πληθυσμού, επειδή η συχνότητα της θρομβοφιλίας πιθανολογείται ότι διαφέρει μεταξύ των γυναικών που εμφανίζουν πρόωμη και όψιμη έναρξη της νόσου (55). Παρόλα αυτά, προς το παρόν δεν έχουν εξαχθεί ασφαλή συμπεράσματα για την υπαιτιότητα των θρομβοφιλικών διαταραχών στην εμφάνιση της προεκλαμψίας (1).

1.1.3. Αιτιολογία και παθογένεια

Αν και η αιτία της προεκλαμψίας παραμένει εν πολλοίς άγνωστη, οι κυρίαρχες υποθέσεις στηρίζονται στην διαταραχή της πλακουντιακής λειτουργίας στα πρώτα στάδια της κύησης (3). Η ατελής αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών

θεωρείται ευρέως μία πρόιμη, αλλά όχι απαραίτητα η πρωταρχική, διαταραχή στην παθογένεια της προεκλαμψίας (3). Η αναδιαμόρφωση, ή αλλιώς φθαρτοποίηση, των σπειροειδών αρτηριών είναι μία φυσιολογική διαδικασία, το πρώτο στάδιο της οποίας τοποθετείται περί την εμφύτευση (56). Διαταραχές σε αυτό το στάδιο θα μπορούσαν να αυξήσουν την πιθανότητα της προεκλαμψίας και να εξηγήσουν την αυξημένη επίπτωσή της σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα ή καθ' ἑξίν εκτρώσεις (57, 58). Οι μεταβολές στις σπειροειδείς αρτηρίες οφείλονται στη διείσδυση της τροφοβλάστης μέσα σε αυτές και αντικατάσταση της μυϊκής και ελαστικής στιβάδας τους από ινώδη και ινιδώδη ιστό (59). Η αλληλεπίδραση, σε αυτό το επίπεδο, των HLA αντιγόνων C, E και G της τροφοβλάστης, με τα NK και τα δενδριτικά κύτταρα της μητέρας, θεωρείται σημαντική για τη ρύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης (60-62). Επιπλέον, έχει ανακοινωθεί ότι ορισμένοι συνδυασμοί HLA-C αντιγόνων και NK υποδοχέων προδιαθέτουν στην προεκλαμψία (63).

Η μεσολάχιος αιματική ροή φαίνεται να αρχίζει μεταξύ 7^{ης} και 8^{ης} εβδομάδας της κύησης με την εμφάνιση συνδετικών διαύλων μεταξύ των σπειροειδών αρτηριών και των μεσολάχιων χώρων (64). Η απόφραξη των παραπάνω διαύλων στα πρώιμα στάδια της κύησης από συσσωματώματα τροφοβλαστικών κυττάρων, θα μπορούσε να εξυπηρετεί την προστασία του εμβρύου από υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (3). Ορισμένοι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι η πρόιμη απώλεια της προστατευτικής δράσης αυτών των συσσωματωμάτων είναι ικανή να οδηγήσει σε εκτρώσεις ή ακόμη και σε προεκλαμψία (65). Σταδιακά, τα συσσωματώματα τροφοβλαστικού ιστού υποχωρούν και εμφανίζεται αιματική ροή στους μεσολάχιους χώρους. Η έναρξη της μεσολάχιος κυκλοφορίας γίνεται προοδευτικά από την περιφέρεια προς το κέντρο του πλακούντα και τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες που εμφανίζονται αρχικά στην περιφέρεια σχετίζονται με την υποσττροφή των λαχνών και τη δημιουργία του

χόριου (65). Συνεπώς, αυξημένη περιφερική αιμάτωση στα πρώτα στάδια της κύησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε εκτεταμένη υποστροφή λαχνών τοπικά και τελικά σε μικρό πλακούντα, συμβάλλοντας έτσι σε πιθανή ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου ή και σε προεκλαμψία (65).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναδιαμόρφωση των αρτηριών του φθαρού και του μυομητρίου συντελούνται κυρίως κατά τη διάρκεια της παρατηρούμενης αύξησης της περιεκτικότητας οξυγόνου στον πλακούντα (10^η-12^η εβδομάδα) (66). Σε γυναίκες που μετέπειτα εμφάνισαν προεκλαμψία, διαπιστώθηκαν διαταραχές της πλακουντιακής ροής ήδη από τις 12 εβδομάδες (67). Παράλληλα, η τροφοβλαστική διείσδυση στα εν τω βάθει τμήματα των σπειροειδών αρτηριών του μυομητρίου συμβαίνει μετά τη 15^η εβδομάδα και μπορεί να είναι επακόλουθο της ήδη αυξημένης αιματικής ροής (68). Επομένως, η ατελής τροφοβλαστική διείσδυση στις σπειροειδείς αρτηρίες του μυομητρίου θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία των διαταραχών της πλακουντιακής ροής (3). Η ατελής αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών σε αυτό το επίπεδο ελαττώνει τη διάμετρο του τμήματος των αγγείων που βρίσκεται στο μυομήτριο και οδηγεί σε μειωμένη μητροπλακουντιακή ροή και επεισόδια ατελούς πλακουντιακής αιμάτωσης (3). Η επακόλουθη υποξία και επαναοξυγόνωση δημιουργεί ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που προκαλούν οξειδωτικό στρες και πλακουντιακή δυσλειτουργία (69, 70). Πιθανολογείται ότι τα άγνωστα, επί του παρόντος, αίτια που οδηγούν στο πρώτο στάδιο της προεκλαμψίας (πλακουντιακό), περιλαμβάνουν την άτυπη ή υπέρμετρη μητρική ανοσολογική απάντηση στους τροφοβλάστες και την ατελή φθαροποίηση, ή προετοιμασία εν γένει του ενδομητρίου, να υποδεχθεί το κύημα (71, 72). Η επιβεβαίωση των παραπάνω υποθέσεων θα καθιστούσε την προεκλαμψία ως μία νόσο ανεπιτυχούς αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο γενετικά διαφορετικών οργανισμών (73).

Το δεύτερο στάδιο της προεκλαμψίας, αυτό της συστηματικής μητρικής νόσου, χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη ενδοθηλιακή ενεργοποίηση και γενικευμένη υπερ-φλεγμονώδη κατάσταση σε σχέση με τη φυσιολογική κύηση (74). Τα επεισόδια πλακουντιακής υποξίας και επαναιμάτωσης οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, διαταραχή της αρχιτεκτονικής της συγκυτιοτροφοβλάστης και απελευθέρωση διάφορων συστατικών από τους μεσολάχιους χώρους στη μητρική κυκλοφορία, ενεργοποιώντας έτσι την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (75). Τα κυκλοφορούντα βιοενεργά προϊόντα αποδόμησης περιλαμβάνουν μικροσωματίδια συγκυτιοτροφοβλάστης καθώς και πληθώρα αντι-αγγειογενετικών παραγόντων προερχόμενων εκ της συγκυτιοτροφοβλάστης (76). Η υπέρμετρη συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση που συναντάται στην προεκλαμψία έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία ακολουθείται από την κλινικά εμφανή νόσο (77, 78). Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου συμβάλλει σε διαταραχές του ενδαγγειακού όγκου και σε αντιστροφή αρκετών καρδιαγγειακών προσαρμοστικών αλλαγών που συναντώνται στην φυσιολογική κύηση. Τα παραπάνω καθιστούν την προεκλαμψία νόσο χαμηλής παροχής αίματος και υψηλών αγγειακών αντιστάσεων, με παραδόξως ελαττωμένη δραστηριότητα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (79).

Η πρώιμη (η οποία επιπλέκεται συχνά από ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης) ή η όψιμη έναρξη της προεκλαμψίας, εξαρτάται από το μέγεθος που θα αποκτήσει ο πλακούντας κατά το πρώτο στάδιο της νόσου (80). Ωστόσο, η διαταραχή της πλακουντοποίησης δεν πρέπει να θεωρείται η αιτία της προεκλαμψίας αλλά ένας ισχυρός προδιαθετικός παράγοντας (74). Ακόμα και με έναν πλακούντα με φυσιολογικό μέγεθος για την ηλικία κύησης, διάφορες καρδιαγγειακές ή μεταβολικές προδιαθετικές διαταραχές δύνανται να πυροδοτήσουν έναν καταρράκτη

πλακουντιακής και συστηματικής φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, προκαλώντας έτσι μία όψιμη έναρξη της νόσου (81). Η παραπάνω άποψη υποστηρίζεται από τη φυσιολογική μορφολογία των πλακουντιακών λαχνών στην προεκλαμψία όψιμης έναρξης, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις της πρώιμης εμφάνισής της (82).

1.1.4. Γενετική της προεκλαμψίας

Η συνάθροιση περιστατικών προεκλαμψίας μέσα σε ορισμένες οικογένειες είχε αναγνωρισθεί ήδη από τον 19^ο αιώνα και υποδεικνύει τη συσχέτιση της νόσου με γενετικούς παράγοντες (83). Η διαλεύκανση του γενετικού υπόβαθρου της προεκλαμψίας παρουσιάζει προκλήσεις όχι μόνο επειδή ο φαινότυπος εκφράζεται αποκλειστικά σε έγκυες γυναίκες, αλλά και γιατί είναι αναγκαίος ο έλεγχος δύο γονότυπων, της μητέρας και του εμβρύου. Τα γονίδια της μητέρας και του εμβρύου δύνανται να έχουν ανεξάρτητη επίδραση στην πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας, ή και να αλληλεπιδρούν (84). Μελέτες σε δίδυμες αδερφές, οι οποίες ερευνούσαν την σχετική συνεισφορά γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιολογία της προεκλαμψίας, παρείχαν αρχικά απογοητευτικά αποτελέσματα. Έδειξαν απόκλιση στον αριθμό περιστατικών προεκλαμψίας μεταξύ μονοζυγωτικών αδερφών, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα η νόσος να κληρονομείται μέσω της μητέρας (85). Ωστόσο οι παραπάνω μελέτες ήταν μικρές σε μέγεθος. Μία μεγαλύτερη έρευνα, η οποία έκανε χρήση του εκτεταμένου Σουηδικού αρχείου δίδυμων γεννήσεων, υπολόγισε ότι σε ποσοστό 55% η προεκλαμψία κληρονομείται μέσω μητρικών και εμβρυικών γονιδίων (86). Στοιχεία της παραπάνω μελέτης αποκάλυψαν ότι η διεισδυτικότητα της νόσου ήταν μικρότερη από 50%, υποδεικνύοντας την ύπαρξη διαφορετικών μοντέλων κληρονομικότητας (87).

Για ένα μικρό αριθμό οικογενειών, η προεκλαμψία φαίνεται να ακολουθεί τους νόμους κληρονομικότητας του Mendel. Μεταβιβάζεται δηλαδή μέσω μίας μονογονιδιακής γενετικής αλλαγής, με υψηλή διεισδυτικότητα (88). Ωστόσο, για τον κυρίως πληθυσμό, η προεκλαμψία αντιπροσωπεύει μία σύνθετη γενετική διαταραχή που προκύπτει από πολυάριθμες κοινές γενετικές αλλαγές σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος. Η κάθε μία από αυτές έχει μικρή επίδραση, αλλά δρώντας αθροιστικά συνεισφέρουν στην προδιάθεση στη νόσο (84). Επιπλέον, η τελική εκδήλωση της νόσου θα εξαρτηθεί από την αλληλεπίδραση των χαμηλής διεισδυτικότητας αλληλόμορφων με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Είναι απίθανο ένα γενετικό αλληλόμορφο, ή μόνο μία αιτία εν γένει, να ευθύνεται για όλες τις περιπτώσεις της νόσου, αν και θεωρείται πιθανό διαφορετικά γονίδια να σχετίζονται με διαφορετικές υποομάδες ασθενών (84).

Ο ρόλος τόσο του μητρικού όσο και του εμβρυικού γονότυπου θεωρείται σήμερα βασικός. Αυτό υποστηρίζεται από επιδημιολογικές μελέτες που επισημαίνουν αυξημένα ποσοστά πατρότητας προεκλαμπτικών κυήσεων σε άνδρες οι οποίοι γεννήθηκαν επίσης από προεκλαμπτικές κυήσεις (89). Ακόμη, η εμφάνιση προεκλαμψίας σε κόρες εξ αγχιστείας, γυναικών που είχαν εμφανίσει επίσης τη νόσο, υποστηρίζει τη γενετική συνεισφορά και των δύο γονέων (84). Η σύνδεση της γενετικής συνεισφοράς αμφοτέρων των γονέων με την αιτιοπαθογένεια της νόσου περιγράφεται από την υπόθεση της γενετικής «σύγκρουσης». Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζει ότι τα εμβρυικά (πατρικά) γονίδια, επιδιώκοντας να μεταφέρουν περισσότερα θρεπτικά συστατικά στο έμβρυο, δρουν ώστε να αυξηθεί η πίεση της μητέρας και κατά συνέπεια η μητροπλακουντιακή αιματική ροή. Αντίθετα, τα μητρικά γονίδια, προσπαθώντας να ελέγξουν την αύξηση της μητροπλακουντιακής ροής, δρουν αντιρροπιστικά (90). Αν και οι περισσότερες γενετικές μελέτες μέχρι

στιγμής έχουν επικεντρωθεί μόνο στα μητρικά γονίδια, η ανάλυση όλων των εμπλεκόμενων γονότυπων θεωρείται πλέον αναγκαία (54).

Ο κληρονομικός χαρακτήρας της προεκλαμψίας, έτσι όπως διαπιστώθηκε από τις επιδημιολογικές παρατηρήσεις, έδωσε ώθηση στην εκτεταμένη έρευνα για τον προσδιορισμό των προδιαθεσικών γενετικών παραγόντων. Οι ερευνητικές προσπάθειες για την χαρτογράφηση των υπεύθυνων γονιδίων επικεντρώθηκε σε δύο κύριες προσεγγίσεις: α) στις μελέτες γενετικής σύνδεσης, οι οποίες διεξάγονται σε οικογένειες με συνάθροιση περιστατικών προεκλαμψίας, και β) στις μελέτες γενετικής συσχέτισης, οι οποίες διεξάγονται σε πάσχουσες και μάρτυρες από το γενικό πληθυσμό.

Μελέτες γενετικής σύνδεσης

Ως σύνδεση ορίζεται η τάση των αλληλόμορφων που βρίσκονται κοντά πάνω σε ένα χρωμόσωμα να μεταβιβάζονται μαζί, ως αδιαίρετη μονάδα, κατά τη διάρκεια της μείωσης. Η ανάλυση σύνδεσης χρησιμοποιεί μελέτες οικογενειών για να καθορίσει εάν δύο γονίδια συνδέονται όταν μεταβιβάζονται από τη μία γενεά στην επόμενη. Αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική μεθοδολογία της ιατρικής γενετικής καθώς είναι η μοναδική μέθοδος που επιτρέπει τη χαρτογράφηση γονιδίων τα οποία είναι ανιχνεύσιμα μόνο από τα κληρονομικά τους γνωρίσματα, δηλαδή στις περιπτώσεις νοσημάτων στα οποία το υπεύθυνο γονίδιο δεν έχει απομονωθεί (91, 92). Η πλειονότητα των γονιδίων που προκαλούν γενετικά νοσήματα εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία, διότι δεν έχει διευκρινιστεί η βιοχημική και μοριακή τους βάση.

Στην ανάλυση σύνδεσης εκτιμάται η πιθανότητα ανασυνδυασμού κάποιων γενετικών θέσεων στα ομόλογα χρωμοσώματα κατά τη μείωση. Προκειμένου να διεξαχθεί όμως μία τέτοιου είδους μελέτη, θα πρέπει οι γενετικές θέσεις να είναι πολυμορφικές, να εμφανίζουν δηλαδή 2 ή περισσότερα αλληλόμορφα με ικανή συχνότητα. Η διάκριση λοιπόν των ομόλογων χρωμοσωμάτων βασίζεται στη χρησιμοποίηση γενετικών δεικτών, οι οποίοι καθορίζουν το κάθε ένα από αυτά. Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούσαν αντιγόνα επιφανείας ή πρωτεΐνες με διαφορετικό ηλεκτροφορητικό προφίλ. Οι σύγχρονοι γενετικοί δείκτες είναι είτε μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms – SNPs) είτε πολυμορφισμοί δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδίων που έχουν βρεθεί σε αφθονία στο ανθρώπινο γονιδίωμα (βραχείες αξονικές επαναλήψεις – short tandem repeats – STRs) (91-93). Οι SNPs αποτελούν συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες και κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το γονιδίωμα (1 πολυμορφισμός ανά 1000 – 2000 νουκλεοτίδια). Συνήθως διαθέτουν 2 αλληλόμορφα που αντιστοιχούν σε 2 διαφορετικές βάσεις που είναι δυνατό να καταλαμβάνουν μία συγκεκριμένη θέση. Πάνω από 12×10^6 SNPs έχουν ανακαλυφθεί και καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων του Human Genome Project.

Οι βραχείες αξονικές επαναλήψεις ή μικροδορυφορικοί δείκτες (microsatellite markers) αποτελούν επαναλήψεις δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδίων. Ο αριθμός αυτών των επαναλήψεων ποικίλλει μεταξύ δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων και καθιστά τους μικροδορυφορικούς δείκτες ιδιαίτερα χρήσιμους για μελέτες ανάλυσης σύνδεσης. Πρώτον, η ύπαρξη πολλών αλληλίων (δηλ. πολλών μεγεθών επαναλήψεων) σε ένα πληθυσμό, αυξάνει την πιθανότητα ετεροζυγωτίας για κάθε άτομο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%. Δεύτερον, είναι εύκολη η γονοτύπωση και η δημιουργία τους με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τέλος, δεκάδες χιλιάδες τέτοιων

δεικτών έχουν προσδιοριστεί σε όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθιστώντας όλες τις περιοχές του ικανές για μελέτη με ανάλυση σύνδεσης (91-93).

Οι μέθοδοι με τις οποίες γίνεται η ανάλυση σύνδεσης σύνθετων γενετικών νοσημάτων, τα οποία από τη φύση τους δεν οφείλονται σε μονογονιδιακές μεταλλάξεις ούτε κληρονομούνται με μεντελιανή κληρονομικότητα, ονομάζονται μη παραμετρικές. Με τις μεθόδους αυτές δε γίνεται καμία υπόθεση όσον αφορά τον αριθμό των γενετικών τόπων ή το ρόλο του περιβάλλοντος στην παθογένεια του νοσήματος. Αντιθέτως, βασίζονται στην υπόθεση ότι 2 προσβεβλημένοι συγγενείς θα έχουν κοινά προδιαθεσικά αλληλία (93). Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μη παραμετρική μέθοδος είναι η μέθοδος των προσβεβλημένων ζευγών-αδελφών (affected sibpair method). Αναλύεται το γονιδίωμα αδελφών που εκδηλώνουν το νόσημα και αναζητείται η ύπαρξη γενετικών τόπων στους οποίους υπάρχουν αλληλία με συχνότητα μεγαλύτερη του 50% (ποσοστό που αναμένεται με βάση την τυχαιότητα). Αν ένας γενετικός τόπος είναι σημαντικός για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, η ύπαρξη κοινών αλληλίων στα προσβεβλημένα άτομα θα είναι μεγαλύτερη της αναμενόμενης (50%). Η αξιολόγηση της ευρισκόμενης απόκλισης από το 50% γίνεται με τη στατιστική δοκιμασία του μέγιστου λόγου των αναλογιών (maximum likelihood odds ratio).

Στη μέθοδο των προσβεβλημένων αδελφών, το DNA τους αναλύεται με τη μεθοδολογία των σαρώσεων ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης (GWLS) (93). Το DNA αναλύεται με τη χρήση εκατοντάδων πολυμορφικών δεικτών που διασπείρονται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος προς αναζήτηση κοινών περιοχών μεταξύ των αδελφών σε συχνότητα μεγαλύτερη από την αναμενόμενη με βάση την τυχαιότητα. Η ανεύρεση υψηλής συχνότητας κοινών αλληλίων στη θέση ενός πολυμορφικού δείκτη, υποδηλώνει ότι ένας γενετικός τόπος σχετιζόμενος με το νόσημα εντοπίζεται πλησίον

του δείκτη (94, 95). Οι μη παραμετρικές μέθοδοι παρόλα αυτά εμφανίζουν μειονεκτήματα, το βασικότερο εκ των οποίων είναι η έλλειψη ευαισθησίας και ακρίβειας. Η έλλειψη ευαισθησίας αντανακλάται στο γεγονός ότι μεγάλοι αριθμοί αδελφών (sibpairs) απαιτούνται για την ανεύρεση σημαντικής απόκλισης από την αναμενόμενη (50%) κοινή ύπαρξη αλληλίων. Στην πράξη, οι γονιδιωματικές αναζητήσεις δεν είναι πιθανό να προσδιορίσουν γενετικούς τόπους στους οποίους λίγα σπάνια αλληλόμορφα συμβάλλουν σε μικρό βαθμό σε ένα νόσημα. Οι μη παραμετρικοί μέθοδοι προσδιορίζουν ευρείες περιοχές με κοινά αλλήλια και όχι μια μικρή, κριτική περιοχή που περιλαμβάνει ένα γονίδιο που συμβάλλει στο νόσημα (96).

Κατά τη διάρκεια των δύο προηγούμενων δεκαετιών διενεργήθηκαν αρκετές σαρώσεις ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης, που στόχευαν στην ανίχνευση γενετικών τόπων υπεύθυνων για την εμφάνιση σύνθετων διαταραχών όπως η προεκλαμψία. Οι παραπάνω σαρώσεις χρησιμοποίησαν ζεύγη προσβεβλημένων με προεκλαμψία αδελφών και αναγνώρισαν περιοχές με στατιστικά σημαντική σύνδεση στα χρωμοσώματα 2p13 (97) και 2p25 και 9p13 (98). Επιπλέον, περιοχές ενδεικτικές σύνδεσης βρέθηκαν στα χρωμοσώματα 2q, 9p, 10q, 11q και 22q (99, 100), ενώ αξίζει αναφοράς το γεγονός ότι καμία μελέτη δεν αναπαρήγαγε τα θετικά αποτελέσματα κάποιας άλλης. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν τις πληθυσμιακές διακυμάνσεις καθώς και διαφορές στην πυκνότητα των μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε μελέτη. Ωστόσο, ως μείζων παράγοντας στην αδυναμία αναπαραγωγής αποτελεσμάτων παρόμοιων μελετών, πάνω σε σύνθετα νοσήματα, ενοχοποιείται η μειωμένη στατιστική ισχύς των μελετών αυτών. Η μετά-ανάλυση πέντε σαρώσεων ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης αποκάλυψε αρκετές περιοχές

ενδεικτικές σύνδεσης αλλά υποστήριξε ότι τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων (101).

Μελέτες γενετικής συσχέτισης

Η ανάλυση σύνδεσης που περιγράφηκε μέχρι στιγμής βρίσκει εφαρμογή στην αναζήτηση γονιδίων και γενετικών τόπων χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό που προέρχεται από οικογένειες. Στο γενικό πληθυσμό έχουν εφαρμογή οι μελέτες γενετικής συσχέτισης (genetic association studies, GAS). Οι μελέτες αυτές στοχεύουν στην ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ ενός ή περισσότερων γενετικών μεταβλητών (αποκαλούμενων πολυμορφισμών) και ενός γνωρίσματος το οποίο μπορεί να είναι ένα διακριτικό χαρακτηριστικό, ή μία νόσος (102). Η ύπαρξη ενός αλληλίου σε ένα γενετικό τόπο, σε αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ονομάζεται συσχέτιση (association). Η συσχέτιση διαφέρει από τη σύνδεση στο ότι το ίδιο αλληλίο (ή αλληλία) σχετίζεται με το γνώρισμα με παρόμοιο τρόπο σε όλο τον πληθυσμό, ενώ η σύνδεση επιτρέπει να σχετίζονται με το γνώρισμα διαφορετικά αλληλία, σε διαφορετικές οικογένειες. Εν τούτοις, οι γενετικές συσχετίσεις προκύπτουν μόνο επειδή οι διάφοροι πληθυσμοί μοιράζονται κοινή καταγωγή και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι μελέτες γενετικής συσχέτισης αποτελούν μια ειδική μορφή μελετών γενετικής σύνδεσης όπου η διευρυμένη οικογένεια είναι κατ' ουσία ο γενικότερος πληθυσμός (102). Πρόσφατα, έχει γίνει η διαπίστωση ότι η γενετική προδιάθεση σε κοινές, σύνθετες διαταραχές οφείλεται πιθανόν σε πολλά γονίδια, αρκετά εκ των οποίων ασκούν μία μικρή επίδραση. Το παραπάνω γεγονός, σε συνδυασμό με την αναγνώριση μεγάλων αριθμών πολυμορφισμών (SNPs) σε όλο το γονιδίωμα και τον περιορισμό του κόστους

γονοτύπωσης (genotyping), έχει οδηγήσει στην ευρεία εφαρμογή των μελετών γενετικής συσχέτισης στη γενετική επιδημιολογία (102).

Τα μοντέλα μελέτης που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι αυτά των ασθενών-μαρτύρων και της κοόρτης. Όπως και στη συμβατική επιδημιολογία, η προοπτική μελέτη κοόρτης αποτελεί το καλύτερο μοντέλο (103). Εκτός όμως από την περίπτωση στην οποία η νόσος είναι πολύ κοινή, το δείγμα που θα συλλεχθεί θα έχει πολύ μικρό αριθμό πασχόντων και τα δείγματα ασθενών-μαρτύρων που θα προκύψουν θα είναι μικρά. Επιπλέον, η ετερογένεια των ασθενών θα έχει αντίκτυπο στην ισχύ της μελέτης και θα δυσκολέψει τη σύγκριση με ασθενείς άλλων μελετών (103). Βάσει των παραπάνω περιορισμών, το μοντέλο ασθενών-μαρτύρων παραμένει το συχνότερα χρησιμοποιούμενο στις μελέτες γενετικής συσχέτισης.

Στις μελέτες γενετικής συσχέτισης εφαρμόζονται δύο ξεχωριστές προσεγγίσεις. Εκείνη του υποψήφιου γονιδίου (candidate gene) και αυτή της ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (genome-wide).

i) Μελέτες υποψήφιου γονιδίου

Η προσέγγιση του υποψήφιου γονιδίου (candidate gene approach) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην προεκλαμψία και έχει επικεντρωθεί κυρίως στο γονότυπο της μητέρας. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην επιλογή ενός γονιδίου ως υποψήφιο για διερεύνηση. Η παραπάνω επιλογή βασίζεται στον πιθανό βιολογικό ρόλο του γονιδίου στην παθογένεση της προεκλαμψίας και ισχυροποιείται εφόσον το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται σε γενετικό τόπο που έχει αναγνωρισθεί από μελέτες γενετικής σύνδεσης (84). Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο μοντέλο μελέτης, όπως έχει αναφερθεί, είναι αυτό των ασθενών-μαρτύρων, το οποίο συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ των δύο ομάδων. Η ισχύς της συσχέτισης

εκτιμάται από τον λόγο των αναλογιών ή πηλίκο των διαγώνιων γινομένων (odds ratio). Εάν η συχνότητα του αλληλίου είναι ίδια σε ασθενείς και μάρτυρες, ο λόγος των αναλογιών θα είναι 1. Η απόκλιση της τιμής του λόγου αναλογιών από την τιμή 1, είναι ενδεικτική της ισχύος της συσχέτισης (104).

Η διενέργεια μελετών γενετικής συσχέτισης, απαιτεί προσεκτική επιλογή του υπό μελέτη πληθυσμού, σχολαστική μεθοδολογία γονοτύπωσης καθώς και αποφυγή του φαινομένου της πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης. Επί του παρόντος έχουν μελετηθεί πάνω από 70 γονίδια, τα οποία συμμετέχουν σε ποικιλία βιολογικών διαδικασιών όπως στον μηχανισμό πήξης και ινοδάλυσης, στην ενδοθηλιακή λειτουργία, στην αγγειοδιαστολή, στο οξειδωτικό στρες, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στην ανοσολογική απάντηση (105). Όπως υποδεικνύουν και οι έρευνες σε άλλες πολυπαραγοντικές νόσους, οι μελέτες υποψήφιου γονιδίου δύσκολα αναπαραγάγουν τα συμπεράσματά τους με αποτέλεσμα να μην οδηγούν σε κοινώς αποδεκτά συμπεράσματα (84). Αν και το γεγονός αυτό αποδίδεται εν μέρει στις γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ένας πιο σημαντικός λόγος είναι ότι το μικρό μέγεθος των περισσότερων μελετών τις καθιστά μη ικανοποιητικής ισχύος για τη διερεύνηση αλληλίων μικρής γενετικής επίδρασης. Άλλοι λόγοι οι οποίοι μπορούν να καλύψουν την πραγματική επίδραση ενός γονιδίου, περιλαμβάνουν την ύπαρξη τροποποιητικών γονιδίων (γενετική επίσταση) ή διαφόρων περιβαλλοντικών επιδράσεων στον υπό μελέτη πληθυσμό (106).

ii) Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης

Οι μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (genome-wide association studies-GWAS) εξετάζουν την γενετική ποικιλομορφία σε όλη την έκταση του γονιδιώματος, με τη χρησιμοποίηση μικροσυστοιχιών γονοτύπωσης

μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, προς ανίχνευση συσχετίσεων με κλινικούς φαινότυπους (107). Η πραγματοποίησή τους διευκολύνθηκε με την ολοκλήρωση του Human Genome Project και την τεχνολογική πρόοδο των μεθόδων γονοτύπωσης, που είναι ικανές να ελέγξουν περισσότερους από 10^6 δείκτες ταυτόχρονα, με τη βοήθεια των γονοτυπικών πλατφόρμων (SNP-microchips) (108). Αντί λοιπόν να εστιάζεται το ενδιαφέρον σε βιολογικά υποψήφια γονίδια, το γονιδίωμα σαρώνεται χωρίς προεπιλογή για περιοχές, γονίδια ή πολυμορφισμούς. Εξαιτίας αυτής της διερεύνησης της γενετικής ποικιλομορφίας σε ευρεία γονιδιωματική βάση, οι παραπάνω μελέτες έχουν χαρακτηριστεί ως προσέγγιση «ελεύθερη υποθέσεων» (“hypothesis-free”) ή «αγνωστική» (109).

Οι GWAS γίνονται δυνατές με τη γονοτύπωση ενός αριθμού αντιπροσωπευτικών πολυμορφισμών (tagSNPs) μέσω των οποίων συνάγεται ο γονότυπος πολυμορφισμών που βρίσκονται σε κοντινούς γενετικούς τόπους (φαινόμενο ανισσοροπίας σύνδεσης- linkage disequilibrium). Έτσι, η ανάλυση $3 \cdot 10^5$ με 10^6 προσεκτικά επιλεγμένων tagSNPs, δύναται να αποκαλύψει το μεγαλύτερο μέρος των πολυμορφικών θέσεων του ανθρώπινου γονιδιώματος (84). Παρά όμως τις μεγάλες δυνατότητες των μελετών αυτών, πρέπει να εκπληρώνουν συγκεκριμένες συνθήκες προκειμένου τα αποτελέσματά τους να θεωρούνται αξιόπιστα. Επειδή η γενετική συνεισφορά του καθενός πολυμορφισμού ξεχωριστά είναι περιορισμένη, μόνο μεγάλες, ικανοποιητικής ισχύος μελέτες μπορούν να αναγνωρίσουν τέτοιους πολυμορφισμούς. Δύο χιλιάδες ασθενείς θεωρούνται το κατώτερο όριο για μία GWAS (84). Επιπλέον, απαιτείται ένα αυστηρό όριο στατιστικής σημαντικότητας λόγω του μεγάλου αριθμού στατιστικών συγκρίσεων που εκτελούνται σε μία GWAS ($P < 5 \cdot 10^{-7}$) (110). Επί του παρόντος, μόνο μία μελέτη ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης έχει διεξαχθεί σε ασθενείς με προεκλαμψία (111). Η μελέτη αυτή

αναγνώρισε τρεις πολυμορφισμούς με στατιστικά σημαντική συσχέτιση , στην περιοχή 2q14.2, σε απόσταση 15kb από το γονίδιο της ανασταλτίνης B (*INHBB*). Αν και οι πολυμορφισμοί αυτοί δε φαίνεται εκ πρώτης όψεως να συνδέονται παθοφυσιολογικά με την εμφάνιση της προεκλαμψίας, η εγγύτητά τους με το γονίδιο της ανασταλτίνης B ίσως προσφέρει, κατά τους συγγραφείς, ένα αιτιολογικό υπόβαθρο.

1.1.5. Ο ρόλος των πολυμορφισμών της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (*NOS3*)

Οι μεταβολές στη συστατικότητα των αγγείων κατά τη διάρκεια της κύησης οφείλονται εν μέρει στα αυξημένα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο παράγεται στο αγγειακό ενδοθήλιο με τη βοήθεια της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (endothelial nitric oxide synthase-eNOS) (112). Το μονοξείδιο του αζώτου συμμετέχει στις φυσιολογικές μεταβολές της κύησης προάγοντας την διαστολή των αγγείων μέσω της χαλάρωσης των λείων μυϊκών ινών, και μετριάζοντας τη συνάθροιση των αιμοπεταλίων (113). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το μονοξείδιο του αζώτου σχετίζεται με την αύξηση του όγκου του αίματος και της καρδιακής παροχής, καθώς και με την ελάττωση της αρτηριακής πίεσης που συναντώνται στη φυσιολογική κύηση (114). Καθώς το μονοξείδιο του αζώτου φαίνεται να διαδραματίζει καίριο ρόλο στην αγγειοδιαστολή κατά την κύηση, η ελαττωμένη βιοδιαθεσιμότητά του θα μπορούσε να συνδέεται με την αύξηση των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων που συνυπάρχει στην προεκλαμψία (115). Έτσι, η εξωγενής ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου eNOS σε εγκυμονούντα ποντίκια (116) προκάλεσε την εμφάνιση συνδρόμου παρόμοιου με την προεκλαμψία,

με παρουσία συμπτωμάτων όπως αυξημένη νεφρική αγγειοσύσπαση, πρωτεϊνουρία και καθυστέρηση της εμβρυϊκής ενδομήτριας ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, σε γυναίκες με προεκλαμψία έχουν αναφερθεί ελαττωμένα επίπεδα, τόσο των μεταβολιτών του μονοξειδίου του αζώτου στην ομφαλική φλέβα και το αμνιακό υγρό (117), όσο και του μονοξειδίου του αζώτου στο πλάσμα του αίματος (114, 118). Δεδομένων λοιπόν των παραπάνω, σε συνδυασμό με το ότι η βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου καθορίζεται στο επίπεδο της σύνθεσής του, το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο eNOS (*e-NOS* ή *NOS3*), έχει προκύψει λογικά ως ένα υποψήφιο γονίδιο για τις υπερτασικές διαταραχές της κύησης, και ειδικότερα την προεκλαμψία (119, 120).

Το γονίδιο *NOS3* κλωνοποιήθηκε το 1993 και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q35-36. Εκτείνεται σε μήκος 4.4 kb DNA, περιλαμβάνει 26 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 135-kD που περιέχει 1.203 αμινοξέα. Το ένζυμο eNOS συνθέτει NO διαρκώς μέσα από μια αντίδραση που περιλαμβάνει τη μετατροπή της L-arginine σε L-citrulline. Το γονίδιο *NOS3* έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου περιλαμβάνουν πολυάριθμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), έναν πολυμορφισμό ένθεσης/έλλειψης στο ιντρόνιο 4 και έναν μικροδορυφορικό δείκτη CA επαναλήψεων στο ιντρόνιο 13 (121). Ο μόνος συχνός πολυμορφισμός που οδηγεί σε αμινοξική αντικατάσταση στο μόριο της ώριμης πρωτεΐνης είναι ο πολυμορφισμός G894T ή Glu298Asp (rs1799983), στον οποίο η αντικατάσταση γουανίνης/θυμίνης στο εξόνιο 7 οδηγεί σε αντικατάσταση γλουταμικού/ασπαρτικού οξέος στη θέση 298 της πρωτεΐνης. Έχουν επίσης περιγραφεί πολλοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου, αν και δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για το εάν κάποιος εξ αυτών εδράζεται εντός της γνωστής αλληλουχίας κάποιου μεταγραφικού παράγοντα του *NOS3*. Αντίστοιχα, δεν έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί στην 3'-αμετάφραστη

περιοχή του γονιδίου, οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σταθερότητα του RNA μορίου (122).

Οι λειτουργικά σημαντικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου δεν έχουν ακόμη καθοριστεί. Το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει κυρίως επικεντρωθεί σε 3 δυνητικά λειτουργικούς πολυμορφισμούς: στον πολυμορφισμό T786C του προαγωγέα (rs2070744), στον πολυμορφισμό ένθεσης/έλλειψης του ιντρονίου 4 (4a/b ins/del) και στον πολυμορφισμό του εξωνίου 7 G894T.

i) T786C

Η θέση του πολυμορφισμού αυτού στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *NOS3* έχει δώσει το ερέθισμα για διενέργεια μελετών λειτουργικότητας. Χαμηλότερα επίπεδα mRNA και NO στον ορό έχουν βρεθεί σε άτομα φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου -786C. Πρόσφατα, έχει περιγραφεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που παρουσιάζει διαφορετική συνδεσιμότητα με τους προαγωγείς του γονιδίου που φέρουν τα αλληλία -786T και -786C. Επιπλέον, μελέτες για την αξιολόγηση της παραγωγής NO in vivo, έδειξαν ότι άτομα ομόζυγα για το αλληλίο -786C είχαν ελαττωμένη μέγιστη απάντηση βραχιόνιας ροής αίματος στην ακετυλοχολίνη (122).

ii) 4a/b ins/del

Δεδομένης της θέσης του πολυμορφισμού αυτού σε ιντρόνιο, οι πιθανότητες λειτουργικής σημαντικότητάς του είναι μειωμένες. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν ότι ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλα λειτουργικά αλληλία σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου *NOS3*. Οι μελέτες λειτουργικότητας του πολυμορφισμού αυτού έχουν αποφέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ορισμένες από αυτές αναφέρουν ότι οι φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου έχουν ελαττωμένα

επίπεδα NO στο πλάσμα και μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου eNOS (122-124).

iii) G894T (Glu298Asp)

Μελέτες αποσαφήνισης μοριακών μηχανισμών έχουν αναδείξει έναν λειτουργικό ρόλο για τον πολυμορφισμό G894T, ενώ έχουν περιγραφεί και συσχετίσεις του με τη σύνθεση του NO και την ενδοθηλιακή λειτουργία (125, 126). Επιπλέον, έχει προταθεί και ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός G894T επηρεάζει αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Η αντικατάσταση Glu298Asp εδράζεται εντός μιας αγκύλης στην εξωτερική επιφάνεια της δομής της συνθετάσης και δεν έρχεται σε επαφή με το ενεργό κέντρο του ενζύμου ή τη δι-επιφάνεια διμερισμού, υποδηλώνοντας ότι εάν ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός, η επίδρασή του θα ασκείται με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο της κατάλυσης της eNOS (122). Πρόσφατα, έχει περιγραφεί ότι η πρωτεΐνη eNOS που περιέχει το αμινοξύ Asp στη θέση 298 υπόκειται σε εκλεκτική πρωτεολυτική διάσπαση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειακούς ιστούς. Εάν αυτή η παρατήρηση είναι ακριβής, τότε τα διασπασμένα θραύσματα της eNOS θα στερούνται ενζυμικής ενεργότητας (122).

1.2. Σκοπός της μελέτης

Ο κεντρικός ρόλος του NO στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και οι πιθανές λειτουργικές επιπτώσεις συχνών πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* αποτέλεσαν το έναυσμα πολλών μελετών υποψηφίου γονιδίου (*NOS3*) στην προεκλαμψία (114). Οι πλέον συχνά μελετώμενοι πολυμορφισμοί του γονιδίου είναι τρεις: ο πολυμορφισμός T786C του προαγωγέα (rs2070744), ο πολυμορφισμός ένθεσης/έλλειψης του ιντρονίου 4 (4a/b) και ο πολυμορφισμός του εξωνίου 7 G894T. Δυστυχώς όμως, τα αποτελέσματα των μελετών γενετικής συσχέτισης για τους παραπάνω πολυμορφισμούς του γονιδίου *NOS3*, είναι αντικρουόμενα και μη συμπερασματικά, και η συμβολή τους στην παθογένεση της προεκλαμψίας αβέβαιη. Προκειμένου να συνεισφέρουμε στη διαλεύκανση του ρόλου των παραπάνω πολυμορφισμών στην προεκλαμψία, σχεδιάσαμε και διεξήγαμε, στο πλαίσιο της παρούσης διδακτορικής διατριβής, μία μελέτη γενετικής συσχέτισης για την προεκλαμψία, σε ομογενή Καυκάσιο πληθυσμό ελληνικής καταγωγής, από την περιοχή της Θεσσαλίας.

Επιπλέον, λόγω των φαινομένων της ανισορροπίας σύνδεσης και της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών στα πλαίσια των απλότυπων, οι μεμονωμένοι γονότυποι ενός γονιδίου μπορεί να μην αποτελούν αξιόπιστους γενετικούς δείκτες ενός νοσήματος (127). Επειδή λοιπόν η ανάλυση απλοτύπων είναι δυνατό να παρέχει περισσότερες πληροφορίες και να αποτελεί μια ισχυρότερη στατιστικά προσέγγιση, στην παρούσα μελέτη γενετικής συσχέτισης επιχειρήθηκε επιπλέον η ανάλυση απλότυπων του γονιδίου *NOS3*.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Χαρακτηρισμός και ταξινόμηση του υπό μελέτη πληθυσμού

Ο υπό μελέτη πληθυσμός συγκροτήθηκε σε δύο ξεχωριστές ομάδες, την ομάδα των ασθενών και την ομάδα των μαρτύρων. Η ομάδα των ασθενών αποτελείτο από γυναίκες με προεκλαμψία, ενώ την ομάδα των μαρτύρων απάρτιζαν γυναίκες με ανεπίπλεκτες κυήσεις και χωρίς ιστορικό προεκλαμψίας. Η προεκλαμψία ορίστηκε ως η ανάπτυξη αρτηριακής υπέρτασης σε συνδυασμό με πρωτοεμφανιζόμενη λευκωματουρία. Ως αρτηριακή υπέρταση ορίστηκε η ανίχνευση αρτηριακής πίεσης ίσης ή μεγαλύτερης του 140mmHg (συστολική) ή 90mmHg (διαστολική) σε δύο τουλάχιστο μετρήσεις με χρονική διαφορά άνω των 4-6 ωρών, ενώ η λευκωματουρία αντιστοιχούσε σε απέκκριση στα ούρα τουλάχιστο 300mg πρωτεΐνης σε διάστημα 24 ωρών.

Σε κάθε γυναίκα που συμμετείχε στη μελέτη αναζητήθηκαν, μέσω συστηματοποιημένου ερωτηματολογίου, φυσικής εξέτασης και εργαστηριακών εξετάσεων, τα παρακάτω κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά: ηλικία, ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, προηγηθείσες κυήσεις και τοκετοί, συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, λεύκωμα ούρων 24ώρου καθώς και το βάρος του νεογνού κατά τη γέννηση. Από κάθε γυναίκα ελήφθησαν 5ml φλεβικού αίματος μετά τον τοκετό, για προσδιορισμό αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων καθώς και για απομόνωση DNA. Επιπλέον, από όλες τις συμμετέχουσες ελήφθη πλήρες ιατρικό ιστορικό. Οι ασθενείς δεν είχαν συγγένεια εξ' αίματος με τους μάρτυρες, ενώ όλες οι γυναίκες συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους στο τμήμα λεχωίδων της Μαιευτικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού

Νοσοκομείου Λάρισας. Όλες οι συμμετέχουσες προέρχονταν από την περιοχή της Θεσσαλίας και ανήκαν σε Καυκάσιο πληθυσμό ελληνικής καταγωγής.

Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν: 1. Γυναίκες με χρόνια υπέρταση, 2. Γυναίκες με υπέρταση που εμφανίστηκε πριν την 20^η εβδομάδα της κύησης, και 3. Γυναίκες με ιστορικό αυτοάνοσων, νεφρικών, καρδιαγγειακών και ενδοκρινολογικών νοσημάτων. Συνολικά, σε αυτή την αναδρομική μελέτη, συμπεριλήφθηκαν 102 ασθενείς με προεκλαμψία και 176 μάρτυρες, όλες εκ των οποίων υπέγραψαν ένα έντυπο έγγραφης συγκατάθεσης προ του χαρακτηρισμού τους ως υπό μελέτη πληθυσμού.

2.2. Απομόνωση και γονοτύπωση του γενετικού υλικού

Οι αιματολογικοί (αιματοκρίτης, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια) και βιοχημικοί (ηπατική-νεφρική λειτουργία, ηλεκτρολύτες) δείκτες καθορίστηκαν με καθιερωμένες μεθόδους από το αιματολογικό και το βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Εν συνεχεία, προκειμένου να γίνει η ανάλυση των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3*, ακολουθήθηκαν διαδοχικά τα παρακάτω βήματα: 1) εξαγωγή του DNA, 2) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, 3) κατάτμηση του DNA με ένζυμα περιορισμού (περιοριστικές ενδονουκλεάσες-*restriction enzymes*) και 4) ηλεκτροφόρηση των παραγόμενων θραυσμάτων σε γέλη (πηκτή) αγαρόζης προς ανίχνευση των αντίστοιχων ζωνών για κάθε πολυμορφισμό [πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος περιορισμού (*restriction fragment length polymorphism / RFLP*)]. (128, 129).

Η εξαγωγή του DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος και περιλαμβάνει την λύση των κυτταρικών μεμβρανών, την αποδόμηση των

πυρηνικών μεμβρανών, την απελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή και το διαχωρισμό του από τα άλλα μακρομόρια (130). Στην παρούσα μελέτη, η εξαγωγή του DNA έγινε από περιφερικό ολικό αίμα με την εμπορικά διαθέσιμη συσκευή QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το DNA που απομονώθηκε με την παραπάνω τεχνική, χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR). Η τεχνική της PCR επιτρέπει, *in vitro*, τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (130). Με την τεχνική αυτή είναι δυνατό να επιτευχθεί η ενίσχυση οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA, επιλέγοντας δύο εκκινητές (primers) που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου. Με τον τρόπο αυτό, οι εκκινητές καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος (130). Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου σε δοκιμαστικό σωλήνα *erppendorf* με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή και αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, έκαστος εκ των οποίων περιλαμβάνει τρία στάδια:

- I. Θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου με μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο (denaturation).
- II. Υβριδισμός των εκκινητών με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing).
- III. Πρόσθεση συμπληρωματικών βάσεων στα άκρα 3' των εκκινητών και επέκταση των νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων με κατεύθυνση 5'→3' (extension).

Για τη λειτουργία της μεθόδου είναι απαραίτητη η παρουσία ειδικής DNA πολυμεράσης (DNA Taq polymerase), ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές-primers), διαλύματος ελεύθερων 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), διαλύματος MgCl₂ και μικρής ποσότητας DNA (εκμαγείο) (130). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφισμό παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και αποτελούν εκκινητές που έχουν χρησιμοποιηθεί κατ' επανάληψη με επιτυχία στη βιβλιογραφία (128, 129).

Πίνακας 1: Ζεύγη εκκινητών για την εκτέλεση της PCR κάθε πολυμορφισμού.

Πολυμορφισμός	Ζεύγος εκκινητών
G894T	5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3'
4a/b	5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3' 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'
T786C	5'-TGGCCTGAAGTGCCTGGAGAGT-3' 5'-AAGTGGGGGACACAAAAGAGCA-3'

Τη διαδικασία της PCR ακολούθησε η πέψη του προϊόντος αυτής με ένζυμα περιορισμού (RFLP analysis). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA, μήκους συνήθως 4-8 νουκλεοτιδίων, και προκαλούν κατάτμησή του κοντά ή μέσα στην αλληλουχία αναγνώρισης (130). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών που αναγνωρίζει κάθε ένζυμο περιορισμού, εξαρτώνται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος DNA που εξετάζεται. Συνεπώς όταν η αλληλουχία του DNA που εξετάζεται είναι διαφορετική, όπως στην περίπτωση

ύπαρξης πολυμορφικών θέσεων, το μήκος των τμημάτων (θραυσμάτων) του DNA που θα προκύπτει μετά την επώαση με τα ένζυμα περιορισμού θα είναι διαφορετικό (130).

Το τελικό στάδιο της διαδικασίας γονοτύπωσης των πολυμορφισμών του *NOS3* περιελάμβανε τον έλεγχο των προϊόντων της PCR-RFLP σε πηκτή αγαρόζης 3% , παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr), και κατόπιν τοποθέτηση της πηκτής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Αρχικά, έγινε ανάμιξη του προϊόντος της PCR-RFLP με μία χρωστική (βρωμοφαινόλη) και ακολούθησε εισαγωγή του στην πηκτή αγαρόζης. Εν συνεχεία, εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης κατά μήκος της πηκτής, έτσι ώστε το αρνητικά φορτισμένο DNA να κατευθυνθεί προς την άνοδο. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε εμφάνιση της πηκτής σε διάλυμα EthBr προκειμένου να βαφούν οι ζώνες του DNA, και κατόπιν τοποθέτησή της σε συσκευή UV όπου και έγινε η φωτογράφιση του DNA.

Τα εργαστηριακά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για τη γονοτύπωση κάθε πολυμορφισμού παρουσιάζονται στους ακόλουθους 3 πίνακες. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα έφεραν κωδικοποίηση έτσι ώστε το εργαστηριακό προσωπικό να αγνοεί την κλινική κατάταξη των ατόμων κατά τη διαδικασία γονοτύπωσης (blinded genotyping).

1. Protocol: NOS3 4a/b polymorphism

PCR:

Reaction composition:

HotStarTaq Plus Master mix	10μL
Primer A + Primer B(10μM)	1.5 μL

Coral Load Concentrate:	2 μ L
Template DNA	1.5 μ L
dd H ₂ O	5 μ L
<u>Total volume</u>	<u>20μL</u>
<u>Cycling protocol:</u>	
Initial activation step: 5 min – 95 C (HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step)	
3-step cycling	
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturation: 1min - 94 C • Annealing: 1min - 56 C • Extension: 1min – 72 C 	
Number of cycles: 35	
Final extension: 10min - 72 C.	

<u>2. Protocol: NOS3 T786C polymorphism</u>	
HotStarTaq	12,5 μ L
H ₂ O	7 μ L
DNA	2,5 μ L
Total volume	24 μ L
Cycling conditions	
94o → 5 min	} 34 cycles
94o → 45 sec	
60o → 30sec	
72o → 30sec	
72o → 7 min	
Incubation at 37o C for 4h with 10U <i>NaeI</i> (3 μ L buffer 10x, 2 μ L H ₂ O, 1 μ L <i>NaeI</i> per tube)	

<u>3. Protocol: eNOS G894T polymorphism</u>	
<u>PCR:</u>	
<u>Reaction composition:</u>	
10X PCR buffer minus Mg	2 μ L
10mM dNTP mixture:	0.4 μ L
50 mM MgCl ₂ :	0.8 μ L
Primer mix (A+ B)(10 μ M each)	1 μ L
Taq DNA Polymerase (5U/ μ L)	0.5 μ L

dd H ₂ O	12.3μL
Template DNA	3μL
<u>Total volume</u>	<u>20μL</u>
<u>Cycling protocol:</u>	
Initial activation step: 10 min – 94 C	
3-step cycling	
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturation: 45sec- 94 C • Annealing: 45sec- 61 C • Extension: 45sec – 71 C 	
Number of cycles: 37	
Final extension: 10min - 72 C.	
Incubation overnight at 37 C with 7.5U <i>Ban II</i> (R0119L)(2.5 μL buffer +2.5 μL <i>Ban II</i>)	
Electrophoresis 2% agarose gel	

2.3. Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό SPSS v11.5 (SPSS Inc.) και κάθε αποτέλεσμα εθεωρείτο στατιστικά σημαντικό εφόσον $p \leq 0.05$, ενώ οι συσχετίσεις εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (Odds Ratio, OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Αρχικά προσδιορίστηκαν οι τιμές των κλινικών παραμέτρων, οι οποίες εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών έγινε με το μη-παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U, το οποίο συνέκρινε την μηδενική (null hypothesis) με μία εναλλακτική υπόθεση. Η μηδενική υπόθεση, σε αντίθεση με την εναλλακτική, δηλώνει ότι οι δύο ομάδες ελέγχου δεν διαφέρουν μεταξύ τους για την εκάστοτε ελεγχόμενη μεταβλητή. Αντιθέτως, προκειμένου να ελεγχθεί το κατά πόσο οι κατανομές των κατηγορικών μεταβλητών διαφέρουν μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε το τεστ χ^2 (chi-square).

Στη συνέχεια ακολούθησαν οι εξής αναλύσεις: 1) Έλεγχος της ισορροπίας στην κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου (μάρτυρες), κατά Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE), 2) Εκτίμηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* με την προεκλαμψία, 3) Έλεγχος για πιθανή ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) μεταξύ των πολυμορφισμών G894T, T786C και 4a/b, 4) Υπολογισμός και σύγκριση των απλότυπων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Πιο αναλυτικά:

1) Μία από τις σημαντικότερες έννοιες στη γενετική πληθυσμών είναι η αρχή των Hardy-Weinberg. Η αρχή αυτή δηλώνει ότι σε έναν πληθυσμό ο οποίος δεν υπόκειται σε εξωτερικές εξελικτικές πιέσεις όπως, μεταλλάξεις, μεταναστεύσεις και φυσική επιλογή, οι συχνότητες των γονοτύπων θα επιτύχουν κατάσταση ισορροπίας μετά από μία γενεά τυχαίου συνδυασμού (ζευγαρώματος) (131). Όταν αυτή η ισορροπία επιτευχθεί, οι γονοτυπικές συχνότητες θα εξαρτώνται μόνο από τη συχνότητα των αλληλίων. Συγκεκριμένα, για ένα γενετικό τόπο με δύο αλληλία *A* και *a* και αντίστοιχες συχνότητες αυτών *p* και *q*, η αρχή Hardy-Weinberg προβλέπει ότι οι συχνότητες των γονοτύπων θα είναι p^2 για τους *AA* ομοζυγώτες, $2pq$ για τους *Aa* ετεροζυγώτες και q^2 για τους *aa* ομοζυγώτες (132). Αποκλίσεις από την παραπάνω ισορροπία οφείλονται συνήθως σε εργαστηριακά σφάλματα γονοτύπωσης, σε πληθυσμιακή διαστρωμάτωση, σε σφάλματα κατά την επιλογή των μαρτύρων καθώς και στην ύπαρξη στατιστικής συσχέτισης μεταξύ της νόσου και του ελεγχόμενου γενετικού τόπου (133). Ο τελευταίος μάλιστα λόγος είναι εκείνος για τον οποίο στις μελέτες γενετικής συσχέτισης προτιμάται να ελέγχεται μόνο η ομάδα των μαρτύρων για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg, και όχι και εκείνη των ασθενών (131).

Βάσει των παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι μελέτες γενετικής συσχέτισης είναι δυνατό να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα εάν η γονοτυπική κατανομή στην ομάδα των μαρτύρων αποκλίνει από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Συνεπώς, ο έλεγχος αυτής της ισορροπίας αποτελεί ένα μέτρο ελέγχου της ποιότητας σχεδιασμού και εκτέλεσης κάθε μελέτης γενετικής συσχέτισης (133). Αν και συνήθως ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg γίνεται με το χ^2 τεστ, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας ακριβής έλεγχος (exact test) για την ομάδα των μαρτύρων (134). Η επιλογή αυτή έγινε επειδή, ενώ και τα δύο τεστ είναι συγκρίσιμων επιδόσεων, ο ακριβής έλεγχος υπερέχει σε πληθυσμιακά δείγματα μικρού μεγέθους, όπου η ασυμπτωτική κατανομή του χ^2 τεστ αποδεικνύεται ανεπαρκής (135).

2) Προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της συσχέτισης μεταξύ του κάθε πολυμορφισμού και της προεκλαμψίας, κατασκευάστηκε αρχικά ένας πίνακας συνάφειας 2x3 για κάθε πολυμορφισμό (contingency table). Κάθε κελί του πίνακα περιείχε το σύνολο των ατόμων με ένα συγκεκριμένο γονότυπο, τόσο για τους μάρτυρες όσο και τους ασθενείς. Ο έλεγχος της μη συσχέτισης των σειρών με τις στήλες (μηδενική υπόθεση) έγινε με το χ^2 τεστ το οποίο επιτρέπει τη σύγκριση της παρατηρούμενης με την αναμενόμενη συχνότητα, για κάθε κελί του πίνακα. Το αποτέλεσμα του τεστ αντιστοιχεί σε μία τιμή κριτηρίου p (p-value), η οποία εκφράζει την πιθανότητα η τυχόν παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να οφείλεται στην τύχη.

Ακολούθως, με βάση τον ίδιο πίνακα συνάφειας, μετρήθηκε ο γενικευμένος λόγος αναλογιών (generalized odds ratio, OR_G). Ο λόγος αναλογιών (OR) χρησιμοποιείται αρκετά συχνά στις μελέτες γενετικής συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων και αποτελεί ένα μέτρο της ισχύος της συσχέτισης μεταξύ της εκάστοτε νόσου και

του υπό έλεγχο πολυμορφισμού. Ορίζεται δε ως η πιθανότητα της έκθεσης των ασθενών στον εξεταζόμενο γενετικό παράγοντα, σε σύγκριση με αυτή των μαρτύρων και εάν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικό της μονάδας, υποδηλώνει την ύπαρξη συσχέτισης. Επιπλέον, προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας των γονιδίων, οι λόγοι αναλογιών εφαρμόζονται σε πίνακες συνάφειας που κατασκευάζονται βάσει προκαθορισμένων γενετικών μοντέλων. Επειδή συνήθως ελλείπουν οι βιολογικές ενδείξεις που να δικαιολογούν την εφαρμογή ενός συγκεκριμένου, ελέγχονται διάφορα μοντέλα τα οποία παρέχουν ποικιλία αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματά τους, παρόλα αυτά, ερμηνεύονται δύσκολα και βασίζονται σε διαφορετικές και πιθανόν ανεπιβεβαίωτες υποθέσεις (104). Αντίθετα, η εφαρμογή του γενικευμένου λόγου αναλογιών (OR_G) μπορεί να ξεπεράσει τη δυσκολία της εκ των προτέρων επιλογής ενός συγκεκριμένου μοντέλου κληρονομικότητας και να εκτιμήσει τις γενετικές συσχετίσεις, ποσοτικοποιώντας με πιο αξιόπιστο τρόπο την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (136).

Κατόπιν, προκειμένου να ελεγχθεί η σημαντικότητα ορισμένων γενετικών μοντέλων κληρονομικότητας, κατασκευάστηκαν τρεις πίνακες συνάφειας με βάση το επικρατές μοντέλο (φορείς της μετάλλαξης έναντι ομοζυγωτών άγριου τύπου), το υπολειπόμενο μοντέλο (ομοζυγώτες της μετάλλαξης έναντι φορέων του άγριου τύπου) και το μοντέλο αντίθεσης αλληλίων (σύνολο μεταλλαγμένων αλληλίων έναντι συνόλου αλληλίων άγριου τύπου) για κάθε πολυμορφισμό του γονιδίου *NOS3*. Αρχικά, για κάθε μοντέλο, οι συσχετίσεις εξετάστηκαν με τον λόγο αναλογιών και το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης. Το διάστημα εμπιστοσύνης του λόγου αναλογιών παρέχει ένα εύρος τιμών μέσα στο οποίο είναι πιθανό να περικλείεται η πραγματική τιμή του λόγου, για τον μελετώμενο πληθυσμό. Επιπρόσθετα, η στατιστική σημαντικότητα κάθε γενετικού μοντέλου εξετάστηκε με την εφαρμογή του τεστ

ακριβείας του Fisher (Fisher's exact test). Το τεστ του Fisher ελέγχει την εγκυρότητα της μηδενικής υπόθεσης της μη συσχέτισης και προτιμάται όταν το μέγεθος του δείγματος είναι περιορισμένο. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε πολλαπλή λογαριθμιστική εξάρτηση (λογαριθμιστική παλινδρόμηση – multiple regression analysis) για να γίνει προσαρμογή της γενετικής συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού με την προεκλαμψία, λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή επίδραση της ηλικίας των γυναικών. Για όλους τους παραπάνω υπολογισμούς, ως μεταλλαγμένα αλληλία θεωρήθηκαν τα 786C*, 4a* και 894T*.

3) Ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ δύο γενετικών τόπων παρατηρείται όταν αυτοί κληρονομούνται μαζί συχνότερα από ότι προβλέπει ο τρίτος νόμος του Μέντελ για την ανεξαρτησία των χαρακτήρων. Αλληλία σε ανισορροπία σύνδεσης, συνυπάρχουν στον ίδιο απλότυπο πιο συχνά από ότι θα αναμενόταν λόγω τύχης και η μεταξύ τους ανισορροπία αντανakλά το ιστορικό των γενετικών ανασυνδυασμών που έχει γίνει στον πληθυσμό του συγκεκριμένου απλότυπου (96). Γενικά, η ανισορροπία σύνδεσης δύο γενετικών τόπων ελαττώνεται με την αύξηση της μεταξύ τους γενετικής απόστασης, ενώ δεν υφίσταται μεταξύ αλληλίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα (137). Μεταξύ των μέτρων που έχουν προταθεί για την εκτίμηση της ανισορροπίας σύνδεσης, τα σημαντικότερα είναι τα D' και r^2 . Λαμβάνουν και τα δύο τιμές ανάμεσα στο μηδέν (ισορροπία) και το ένα (πλήρης ανισορροπία) αλλά η ερμηνεία τους έχει μικρές διαφορές. Το D' είναι ανεξάρτητο της συχνότητας των επιμέρους αλληλίων, έτσι ώστε να δύναται να ισούται με ένα (πλήρης ανισορροπία) ενώ οι επιμέρους συχνότητες των αλληλίων δύο γενετικών τόπων διαφέρουν. Αντίθετα, το r^2 αντανakλά τη στατιστική ισχύ ανίχνευσης ανισορροπίας σύνδεσης, ενώ $r^2=1$ μόνο όταν τα δύο αλληλία βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία και επιπλέον εμφανίζονται με

την ίδια συχνότητα (138). Στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκαν τα μέτρα D' και r^2 για τους πολυμορφισμούς G894T, T786C και 4a/b, ενώ η στατιστική σημαντικότητά των αποτελεσμάτων εξετάστηκε με έναν ακριβή έλεγχο (exact test) (134).

4) Οι απλότυποι αποτελούν συνδυασμούς αλληλίων που βρίσκονται σε κοντινούς γενετικούς τόπους επάνω στο ίδιο χρωμόσωμα. Ορισμένοι δε συνδυασμοί εμφανίζονται συχνότερα από άλλους, λόγω του περιορισμένου γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ των μελετώμενων γενετικών τόπων. Οι απλότυποι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη μελέτη της γενετικής βάσης των πολυπαραγοντικών ασθενειών, ο οποίος συνίσταται τόσο στην αναγνώριση των προδιαθεσικών γονιδίων, όσο και στην αποσαφήνιση των βιολογικών τους λειτουργιών (139). Επιπρόσθετα, οι μέθοδοι ανάλυσης μεμονωμένων πολυμορφισμών έχουν περιορισμένη ισχύ ανίχνευσης μίας γενετικής επίδρασης, όταν αυτή προϋποθέτει συγκεκριμένο συνδυασμό αλληλίων σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους (πολυμορφισμούς). Το παραπάνω πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με τις μεθόδους ανάλυσης απλότυπων, οι οποίες ελέγχουν όλους τους μελετώμενους πολυμορφισμούς ταυτόχρονα (140). Παρόλα αυτά, οι μοριακές τεχνικές άμεσης αναγνώρισης απλότυπων έχουν πολύ υψηλό κόστος, ενώ οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές γονοτύπωσης προσδιορίζουν μόνο τον γονότυπο. Στις περιπτώσεις αυτές, οι απλότυποι αντιμετωπίζονται ως ελλείποντα δεδομένα και υπολογίζονται συνήθως με τη βοήθεια του αλγόριθμου “expectation-maximization (EM)” (141). Ο αλγόριθμος EM επιτρέπει την εκτίμηση της συχνότητας των απλότυπων στους μάρτυρες και τους ασθενείς και κατόπιν τις συγκρίνει μεταξύ τους. Αποτελεί δε έναν από τους πιο διαδεδομένους στατιστικούς αλγόριθμους εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς του, ενώ παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες όταν ο αριθμός των πολυμορφισμών που

εξετάζονται ταυτόχρονα δεν ξεπερνά τους δέκα (139). Στην παρούσα μελέτη, ο υπολογισμός και η σύγκριση των απλότυπων έγινε με το λογισμικό SHEsis (142), το οποίο βασίζεται στον αλγόριθμο EM.

3. Αποτελέσματα

3.1. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά

Συνολικά εξετάστηκαν 102 ασθενείς και 176 μάρτυρες, ενώ ολόκληρος ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από γυναίκες. Τα κύρια κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων περιγράφονται στον πίνακα 2. Ο μέσος όρος ηλικίας (\pm τυπική απόκλιση) για τους ασθενείς και τους μάρτυρες ήταν 30.64 (\pm 6.32) και 29.60 (\pm 5.18) αντίστοιχα. Όπως αναμενόταν, στις πάσχουσες, η διάρκεια κύησης και το βάρος γέννησης του νεογνού ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερα, ενώ η αρτηριακή πίεση και οι δίδυμες κυήσεις ήταν χαμηλότερες στις υγιείς γυναίκες. Επιπλέον, σύμφωνα με την επιδημιολογία της προεκλαμψίας, η ομάδα των ασθενών περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό πρωτοτόκων γυναικών.

Πίνακας 2. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς και μάρτυρες

	Ασθενείς (n=102)	Μάρτυρες (n=176)	p-value
Ηλικία (έτη)	30.64 (6.32)	29.60 (5.18)	0.14
Διάρκεια κύησης (εβδομάδες)	35.41 (3.43)	38.58 (2.14)	<0.01
Βάρος γέννησης (g)	2266.5 (839)	3078.0 (572)	<0.01
Πρωτοτόκες, n (%)	74 (72.5)	78 (44.3)	<0.01
ΣΑΠ (mmHg)	161.66 (10.3)	115.84 (10.9)	<0.01
ΔΑΠ (mmHg)	92.70 (8.47)	70.40 (7.54)	<0.01
Κάπνισμα πριν/κατά την κύηση, n (%)	30 (29.4) / 6 (5.9)	62 (35.2) / 16 (9.1)	0.32 / 0.34
Δίδυμες κυήσεις, n (%)	8 (7.8)	3 (1.7)	0.01

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση), εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά. Συνοτομογραφίες: g= Γραμμάρια, ΣΑΠ= Συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ= Διαστολική αρτηριακή πίεση

3.2. Ανάλυση γονότυπων

Η γονοτύπωση ήταν επιτυχής σε ποσοστό 98%, 99% και 99% των ατόμων για τους πολυμορφισμούς T786C, 4a/b και G894T αντίστοιχα. Η κατανομή των γονότυπων παρουσιάζεται στον πίνακα 3, όπου φαίνεται ότι κανένας από τους μελετώμενους πολυμορφισμούς δεν συσχετίστηκε με την προεκλαμψία. Οι γενικευμένοι λόγοι αναλογιών (OR_G) για τους πολυμορφισμούς 4a/b, T786C και G894T, ήταν 0.79 (0.48-1.29), 0.93 (0.61-1.43) και 0.86 (0.56-1.32) αντίστοιχα, ενώ οι τιμές του κριτηρίου p, απέτυχαν εξίσου να αγγίξουν στατιστική σημαντικότητα ($p=0.99$, 0.99 και 0.09 για 4a/b, T786C και G894T αντίστοιχα). Η κατανομή των γονότυπων στην ομάδα ελέγχου βρισκόταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg για όλους τους πολυμορφισμούς, γεγονός που όπως έχουμε αναφέρει είναι ενδεικτικό της απουσίας πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης και γονοτυπικών σφαλμάτων.

Πίνακας 3. Κατανομή γονότυπων και αλληλίων σε ασθενείς και μάρτυρες για τους 3 πολυμορφισμούς του γονιδίου NOS3. Οι συσχετίσεις των πολυμορφισμών με την προεκλαμψία παρουσιάζονται ως p-values και OR_G .

	Ασθενείς, n (%) n=102	Μάρτυρες, n (%) n=176	p-value
Intron 4a/b			
bb	68 (66.7)	109 (61.9)	0.316 ^a
ab	33 (32.4)	60 (34.1)	$OR_G = 0.79 (0.48-1.29)$
aa	1 (0.98)	7 (3.98)	
b alleles	169 (82.84)	278 (78.97)	
a alleles	35 (17.15)	74 (21.02)	
T786C			

CC	14 (13.7)	28 (15.9)	0.868 ^a
TC	51 (50)	84 (47.7)	OR _G = 0.93 (0.61-1.43)
TT	37 (36.3)	62 (35.2)	
C alleles	79 (38.72)	140 (39.77)	
T alleles	125 (61.27)	208 (59.09)	
G894T			
TT	17 (16.7)	24 (13.6)	0.237 ^a
GT	38 (37.3)	84 (47.7)	OR _G = 0.86 (0.56-1.32)
GG	47 (46.1)	68 (38.6)	
T alleles	72 (35.29)	132 (37.5)	
G alleles	132 (64.7)	220 (62.5)	

^a*p-value για τη σύγκριση της κατανομής γονότυπων.*

3.3. Ανάλυση γενετικών μοντέλων

Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συσχέτισης τριών γενετικών μοντέλων με την προεκλαμψία. Συγκεκριμένα, κανένας από τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την προεκλαμψία υπό το επικρατές μοντέλο, το υπολειπόμενο μοντέλο ή το μοντέλο αντίθεσης αλληλίων. Οι συγκρίσεις έγιναν με τους λόγους αναλογιών (ORs) και το ακριβές τεστ του Fisher, με τα ORs για το μοντέλο αντίθεσης αλληλίων να είναι 0.78 (0.50-1.21), 0.94 (0.66-1.34) και 0.91 (0.65-1.30) για τους πολυμορφισμούς 4a/b, T786C και G894T αντίστοιχα. Ακολούθησε ο έλεγχος με την πολλαπλή λογαριθμιστική εξάρτηση, όπου μετά την προσαρμογή για την ηλικία, δεν παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών του *NOS3* και της προεκλαμψίας.

Πίνακας 4. Προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα ORs με τα αντίστοιχα 95% CI για τη συσχέτιση των πολυμορφισμών 4a/b, T786C και G894T με την προεκλαμψία, υπό γενετικά μοντέλα.

Πολυμορφισμός Γενετικά μοντέλα	Μη προσαρμοσμένα		Προσαρμοσμένα
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)
Intron 4a/b			
Μοντέλο αντίθεσης αλληλίων (b vs a)	0.78 (0.50-1.21)	0.27	
Υπολειπόμενο μοντέλο	0.81 (0.49-1.36)	0.43	0.81 (0.48-1.35)
Επικρατές μοντέλο	0.24 (0.03-1.97)	0.18	0.24 (0.03-1.97)
T786C			
Μοντέλο αντίθεσης αλληλίων (C vs T)	0.94 (0.66-1.34)	0.73	
Υπολειπόμενο μοντέλο	0.83 (0.41-1.17)	0.59	0.81 (0.40-1.63)
Επικρατές μοντέλο	0.97 (0.59-1.62)	0.91	0.93 (0.56-1.56)
G894T			
Μοντέλο αντίθεσης αλληλίων (T vs G)	0.91 (0.65-1.30)	0.60	
Υπολειπόμενο μοντέλο	1.27 (0.65-2.49)	0.49	1.25 (0.63-2.46)
Επικρατές μοντέλο	0.74 (0.45-1.21)	0.23	0.72 (0.439-1.19)

3.4. Ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης

Η ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης κατά ζεύγη για τους τρεις πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε με τις μετρήσεις του συντελεστή D' και του συντελεστή συσχέτισης r^2 . Ο υπολογισμός των συντελεστών έγινε ξεχωριστά και για τις δύο ομάδες, των ασθενών και των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα των συγκρίσεων φαίνονται στον πίνακα 5. Οι πολυμορφισμοί 4a/b και T786C βρισκόταν σε

ανισορροπία σύνδεσης τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες ($p=0.02$ και $p<0.01$, αντίστοιχα). Επιπλέον, το ίδιο παρατηρήθηκε και μεταξύ των πολυμορφισμών T786C και G894T ($p<0.01$, και στις δύο ομάδες).

Πίνακας 5. Μετρήσεις ανισορροπίας σύνδεσης [D' , r^2 , p] κατά ζεύγη για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *NOS3* σε ασθενείς και μάρτυρες.

Πολυμορφισμός	Intron 4a/b	G894T
T786C		
Ασθενείς	$D'= 0.66$	$D'= 0.45$
	$r^2= 0.14$	$r^2= 0.17$
	$p= 0.02$	$p< 0.01$
Μάρτυρες	$D'= 0.63$	$D'= 0.38$
	$r^2= 0.15$	$r^2= 0.13$
	$p< 0.01$	$p< 0.01$
Intron 4a/b		
Ασθενείς	-	$D'= 0.59$
		$r^2= 0.04$
		$p= 0.10$
Μάρτυρες	-	$D'= 0.54$
		$r^2= 0.05$
		$p= 0.11$

3.5. Ανάλυση απλότυπων

Η κατανομή των συχνοτήτων των εκτιμώμενων απλότυπων σε ασθενείς και μάρτυρες, για τους τρεις πολυμορφισμούς του *NOS3*, παρουσιάζεται στον πίνακα 6. Προσδιορίστηκαν πέντε κύριοι απλότυποι, οι οποίοι εμφανιζόταν με τη μεγαλύτερη

συχνότητα. Παρόλα αυτά, οι εκτιμώμενες συχνότητες ήταν παρόμοιες μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Επιπρόσθετα, το σφαιρικό τεστ χ^2 για τη συνολική σύγκριση των απλότυπων, δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα κατά τον έλεγχο των δύο ομάδων ($p= 0.71$).

Πίνακας 6. Κατανομή των εκτιμώμενων απλότυπων του γονιδίου NOS3 σε ασθενείς και μάρτυρες.

Απλότυπος	Συχνότητες απλότυπων		
	Ασθενείς	Μάρτυρες	p-value
4a/b - T786C - G894T			
a-C-G*	0.13	0.14	0.59
a-T-G*	0.03	0.04	0.45
b-C-T*	0.22	0.21	0.84
b-T-G*	0.47	0.42	0.28
b-T-T*	0.11	0.13	0.37
Σφαιρικό τεστ συσχέτισης (p-value overall)			0.71

4. Συζήτηση

4.1. Μεθοδολογικά ζητήματα

Όπως είδαμε, οι μελέτες γενετικής συσχέτισης αποτελούν ισχυρά εργαλεία για την ανάδειξη των γονιδίων, αλλά και των συγκεκριμένων αλληλίων που συμβάλλουν σε πολυπαραγοντικά γενετικά νοσήματα. Η απλότητα του προσδιορισμού γενετικών δεικτών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η δυνατότητα χρησιμοποίησης γενετικού υλικού από τον γενικό πληθυσμό και όχι από οικογένειες, οδήγησε στην πραγματοποίηση πολύ μεγάλου αριθμού μελετών αυτού του τύπου τα τελευταία χρόνια (104). Εντούτοις, ο ενθουσιασμός που έχει περιβάλλει αυτές τις μελέτες έχει μετριαστεί από τα εγγενή τους προβλήματα, τα οποία οδηγούν συχνά σε αντιφατικά ή μη συμπερασματικά αποτελέσματα και τυπικά σχετίζονται με λάθη στο σχεδιασμό των μελετών, ανακριβείς υποθέσεις για την υποκείμενη γενετική αρχιτεκτονική της νόσου και εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων (143). Παρακάτω, ακολουθεί ο σχολιασμός ορισμένων κοινών μεθοδολογικών προβλημάτων που συναντώνται στις μελέτες γενετικής συσχέτισης υποψήφιου γονιδίου.

Πληθυσμιακή διαστρωμάτωση (*population stratification*). Η συσχέτιση μίας γενετικής μεταβλητής (πολυμορφισμού ή αλληλίου) με ένα νόσημα μπορεί να είναι πλασματική εξαιτίας αρκετών παραγόντων. Ένας από τους σημαντικότερους είναι το γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών. Εξαιτίας ιστορικών, γεωγραφικών και πολιτισμικών παραγόντων, ο ανθρώπινος πληθυσμός συντίθεται από μικρότερους υποπληθυσμούς, στους οποίους υπάρχουν ποικίλλουσες συχνότητες αλληλίων και διαφορετικές συχνότητες νοσημάτων. Εάν τα μέλη των υποπληθυσμών δε ζευγαρώνουν συχνά μεταξύ τους, τότε ένα νόσημα που τυχαίνει να είναι πιο κοινό σε

έναν υποπληθυσμό θα εμφανίζεται να σχετίζεται (εσφαλμένα) με τα αλληλία που επίσης τυχαίνει να είναι πιο κοινά στον υποπληθυσμό αυτό (104). Με τον όρο πληθυσμιακή διαστρωμάτωση, εννοείται η παρουσία υποομάδων μέσα σε ένα πληθυσμό, οι οποίες έχουν διαφορετικές συχνότητες αλληλίων και αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι η ομάδα των ασθενών δύναται να είναι κατά μέσο όρο στενότερα συνδεδεμένη γενετικά από ότι η ομάδα των μαρτύρων. Αυτό το γεγονός ενοχοποιείται τόσο για αδυναμία αποκάλυψης πραγματικών γενετικών επιδράσεων, όσο και για εμφάνιση εσφαλμένων συσχετίσεων (144). Επιπλέον, το παραπάνω φαινόμενο έχει αρνητική επίδραση στην ισχύ μίας μελέτης γενετικής συσχέτισης και για το λόγο αυτό είναι σημαντική η σωστή διαστρωμάτωση του πληθυσμού κατά το σχεδιασμό της μελέτης. Η διαστρωμάτωση μπορεί να γίνει με επιλογή ομοιογενούς πληθυσμού (π.χ. εθνικότητα, θρήσκευμα, καταγωγή, κτλ.), με τη χρησιμοποίηση ομάδας γονιδιωματικού ελέγχου, ανάλογης με το γενετικό υπόβαθρο των πασχόντων, όπως και με τον έλεγχο και κατόπιν προσαρμογή για γενετικούς δείκτες που δεν συνδέονται με τον υπό διερεύνηση φαινότυπο (genomic control) (144).

Πολλαπλές δοκιμασίες (multiple testing). Το πρόβλημα των πολλαπλών δοκιμασιών εγείρεται σε μία μελέτη γενετικής συσχέτισης όταν ελέγχονται πολλές μηδενικές υποθέσεις στο ίδιο πληθυσμιακό δείγμα, όπως συμβαίνει επί παραδείγματι με τη διερεύνηση πολλαπλών γενετικών δεικτών έναντι διαφορετικών φαινοτύπων (144). Παρόμοια ζητήματα ανακύπτουν με την περαιτέρω ανάλυση μικρότερων υποπληθυσμών μέσα στο ίδιο δείγμα, οι οποίοι ορίζονται βάσει διαφορετικών κλινικών φαινοτύπων ή γονοτυπικών χαρακτηριστικών. Αδυναμία κατάλληλης αντιμετώπισης του παραπάνω φαινομένου προκαλεί αναπόφευκτα είτε ελαττωμένη στατιστική ισχύ για ανίχνευση γενετικών επιδράσεων (λόγω υπέρμετρης διόρθωσης), είτε διόγκωση του στατιστικού σφάλματος τύπου-1 (λόγω ασθενούς διόρθωσης). Στις

μελέτες συσχέτισης, το στατιστικό σφάλμα τύπου-1, που ορίζεται ως η απόρριψη μίας έγκυρης μηδενικής υπόθεσης, εκδηλώνεται ως ψευδώς θετική συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου. Ο συνήθης τρόπος που τίθεται σε εφαρμογή για την αντιμετώπιση του προβλήματος των πολλαπλών δοκιμασιών είναι η διόρθωση Bonferroni (Bonferroni correction). Στην περίπτωση αυτή τίθεται ένα συνολικό επίπεδο σημαντικότητας α (συνήθως 5%) για το σφάλμα τύπου-1, και όλοι οι στατιστικοί έλεγχοι που προτίθεται να κάνει ο ερευνητής προσαρμόζονται ώστε να μην ξεπερνούν συνολικά τη στάθμη σημαντικότητας α . Η παραπάνω διόρθωση ισοδυναμεί περίπου με την διαίρεση του επιπέδου σημαντικότητας με τον αριθμό των δοκιμασιών που διεξάγονται (104). Αν και η διόρθωση Bonferroni αποδεικνύεται χρήσιμη σε αρκετές περιστάσεις, εντούτοις δρα ανασταλτικά στη διενέργεια επιπρόσθετων στατιστικών ελέγχων επί του ίδιου δείγματος, λόγω του φόβου των ερευνητών ότι θα επιδράσει αρνητικά στην ισχύ του συνόλου των αναλύσεων.

Σφάλματα ταξινόμησης (misclassification errors). Ένα ζήτημα που συχνά παραβλέπεται στις μελέτες γενετικής συσχέτισης είναι αυτό των σφαλμάτων στην ταξινόμηση των συμμετεχόντων τόσο κατά φαινότυπο, όσο και κατά γονότυπο. Στην ουσία, ο όρος δηλώνει την κατάσταση εκείνη κατά την οποία ο παρατηρούμενος φαινότυπος ή γονότυπος είναι διαφορετικός από τον πραγματικό φαινότυπο ή γονότυπο αντίστοιχα, ενώ η σημασία των σφαλμάτων αυτών έγκειται στο γεγονός ότι, χωρίς κάποια μέθοδο αντιρρόπησης, η ισχύς ανίχνευσης γενετικών συσχετίσεων μπορεί να μειωθεί σημαντικά (145). Η στατιστική ισχύς μίας μελέτης αντικατοπτρίζει την πιθανότητα της ορθής απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης, όταν αυτή είναι λανθασμένη. Για τις μελέτες συσχέτισης κατ' επέκταση, ως ισχύς θεωρείται η πιθανότητα ορθής ανίχνευσης μίας αληθούς συσχέτισης (143). Παρακάτω γίνεται περαιτέρω ανάλυση των δύο τύπων σφάλματος ταξινόμησης:

- I. Η ακρίβεια στον χαρακτηρισμό του φαινοτύπου των ασθενών και των μαρτύρων είναι ουσιώδης σε κάθε γενετική μελέτη και ειδικά σε μελέτες πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Η αδυναμία στην αυστηρή επιλογή των μαρτύρων έχει το εμφανές μειονέκτημα του εσφαλμένου χαρακτηρισμού ασθενών με ασαφή φαινότυπο, ως μάρτυρες. Επιπλέον, η αυξημένη φαινοτυπική ετερογένεια ενός νοσήματος συνήθως υποδηλώνει την παρουσία πολλαπλών γενετικών και περιβαλλοντικών αιτιολογικών παραγόντων. Στις περιπτώσεις αυτές η συμβολή κάθε γενετικού παράγοντα ξεχωριστά αναμένεται να είναι περιορισμένη, οπότε η στρατολόγηση μίας ομάδας ασθενών με φαινοτυπική ετερογένεια θα απαιτούσε αναλογικά μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος για την ανίχνευση συσχετίσεων (104).
- II. Οι περισσότερες μελέτες συσχέτισης υιοθετούν σιωπηλά την παραδοχή ότι οι γονότυποι είναι ακριβείς. Ωστόσο, ακόμη και καθιερωμένα εργαστήρια που εφαρμόζουν τεχνολογίες ακριβείας, αναφέρουν υπό ιδανικές συνθήκες, σφάλματα γονοτύπωσης σε ποσοστό περίπου 1% (103). Τα σφάλματα αυτά προκαλούν αποκλίσεις από την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg και έχουν αρνητική επίπτωση στην ισχύ μίας μελέτης, αλλά ο μεγαλύτερος κίνδυνος που εγκυμονούν συνίσταται στην ανάδειξη εσφαλμένων συσχετίσεων. Μπορούν δε να οφείλονται στην ποιότητα του εξεταζόμενου δείγματος, στην αποτυχία των αντιδραστηρίων καθώς και σε αλληλεπίδραση μεταξύ DNA μορίων. Η συνηθέστερη παρόλα αυτά αιτία σφαλμάτων είναι ο ανθρώπινος παράγοντας, ενώ η ελαχιστοποίησή τους απαιτεί εκσυγχρονισμό των τεχνολογιών γονοτύπωσης καθώς και ποιοτικό έλεγχο της όλης διαδικασίας (104).
Επιπρόσθετη πηγή σφάλματος κατά τη διαδικασία της γονοτύπωσης αποτελεί η επίγνωση της κλινικής κατάταξης των βιολογικών δειγμάτων, σε ασθενείς

και μάρτυρες, από μέρους του εργαστηριακού προσωπικού. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες δε δημοσιεύουν τα απαραίτητα στοιχεία, έτσι ώστε το μέγεθος του σφάλματος να μη δύναται να εκτιμηθεί.

Επιλογή γενετικών δεικτών. Η ύπαρξη των 30,000 περίπου γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, σε συνδυασμό με την περιορισμένη πιθανότητα ο κάθε φαινότυπος να επηρεάζεται από περισσότερα των μερικών εκατοντάδων, καθιστά ασύμφορη την τυχαία επιλογή γονιδίων για τη διερεύνηση μίας νόσου (103). Παρόλα αυτά, η αναζήτηση των κατάλληλων γονιδίων παραμένει εν πολλοίς υποθετική διαδικασία. Η ατελής κατανόηση του μοριακού υπόβαθρου των περισσότερων πολυπαραγοντικών νόσων, σπάνια υποδεικνύει με ακρίβεια το ποσοστό συμμετοχής του εκάστοτε γονιδίου στην εμφάνισή τους. Συνάμα, η ανίχνευση μίας αληθούς συσχέτισης προϋποθέτει τόσο την αιτιολογική σύνδεση του γονιδιακού προϊόντος (πρωτεΐνης) με τη νόσο, όσο και την παρουσία πολυμορφικών δεικτών στο γονίδιο που να επηρεάζουν τη λειτουργικότητά του (103). Πολύτιμοι αρωγοί στην υπόδειξη γενωμικών περιοχών προς διερεύνηση αποδεικνύονται οι μελέτες γενετικής σύνδεσης, ενώ οι μελέτες έκφρασης παρέχουν επιπλέον πληροφορίες για το γενετικό υπόστρωμα της κάθε νόσου (146). Την επιλογή ενός υποψήφιου γονιδίου, ακολουθεί η αναζήτηση μέσα σε αυτό των πολυμορφισμών προς διερεύνηση. Επειδή επί του παρόντος η μελέτη όλων των πολυμορφισμών ενός γονιδίου έχει υψηλό κόστος, είναι επιθυμητό να επιλεγούν εκείνοι που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα ή την έκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η επίδραση ενός πολυμορφισμού στη δράση του γονιδίου δεν είναι σαφής και τεκμηριώνεται με δυσκολία (146). Παρόλα αυτά, γενετικές παραλλαγές με εμφανείς λειτουργικές συνέπειες είναι πιθανότερο να συμβάλλουν στη

ρύθμιση ενός φαινότυπου, και θα πρέπει να βρίσκονται σε υψηλή προτεραιότητα για μελέτη έναντι των υπολοίπων. Εκτός όμως από τον αντίκτυπο ενός πολυμορφισμού στο μοριακό επίπεδο είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη και η συχνότητά του στον υπό μελέτη πληθυσμό, διότι η στατιστική ισχύς ανίχνευσης μίας σημαντικής συσχέτισης εξαρτάται τόσο από το μέγεθος της συσχέτισης καθαυτής, όσο και από τη συχνότητα του υπεύθυνου αλληλίου (146). Όταν όμως η συχνότητα ενός αλληλίου είναι μικρή, η πιθανή αιτιολογική συνάφειά του με την μελετώμενη νόσο θα συνεπαγόταν και ισχυρή επίδραση επ' αυτής. Στις περιπτώσεις αυτές, οι ισχυρές επιδράσεις σπάνιων αλληλίων διερευνώνται αποτελεσματικότερα στις μελέτες γενετικής σύνδεσης. Αντίθετα, οι μελέτες υποψήφιου γονιδίου, είναι πιθανότερο να αναδείξουν συσχετίσεις με αλληλία που εμφανίζονται με συχνότητα τουλάχιστο 5% (146).

Αλληλεπιδράσεις γονιδίων και γονιδίων-περιβάλλοντος. Οι περισσότερες αναλύσεις πληθυσμιακής συσχέτισης επικεντρώνονται στις επιδράσεις των μεμονωμένων γενετικών παραλλαγών. Ένας πολυμορφισμός περιορισμένης δραστηριότητας δεν είναι απαραίτητα κλινικά ασήμαντος, καθότι μπορεί να επιδεικνύει ισχυρή επίδραση υπό συγκεκριμένες γενετικές ή περιβαλλοντικές συνθήκες (144). Το γεγονός ότι η μεταβίβαση ορισμένων χαρακτηριστικών εξηγείται μόνο με τη συνδυασμένη δράση δύο γενετικών τόπων θεωρείται πλέον αδιαμφισβήτητο, όπως και το ότι η παράλειψη της συνδυασμένης μελέτης γονιδίων και περιβάλλοντος οδηγεί σε εσφαλμένες εκτιμήσεις για την αιτιοπαθογένεια μίας νόσου (147). Τόσο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων (γενετική επίσταση), όσο και μεταξύ γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων, μπορούν να διερευνηθούν με τα υπάρχοντα μοντέλα πολλαπλής λογαριθμιστικής εξάρτησης, εφόσον εφαρμόζονται σε μεγάλο μέγεθος δείγματος. Καθώς όμως οι περισσότερες μελέτες είναι ήδη μειωμένης

στατιστικής ισχύος για την ανίχνευση επιδράσεων για τις οποίες έχουν σχεδιαστεί, συνεπάγεται ότι κρίνονται ακατάλληλες και για τη διερεύνηση αλληλεπιδράσεων. Ένα επιπλέον πρόβλημα αποτελεί η ποσοτικοποίηση των περιβαλλοντικών παραγόντων. Ενώ οι περιβαλλοντικές συνθήκες διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο στην φαινοτυπική ποικιλομορφία από ότι οι γενετικές παραλλαγές, εντούτοις είναι ετερογενείς και πιθανόν παροδικές. Για το λόγο αυτό η μέτρησή τους είναι προς το παρόν δυσχερής και μειωμένης αποτελεσματικότητας (148).

Μέγεθος δείγματος. Η βασική ενδεικτική παράμετρος ποιότητας μίας μελέτης συσχέτισης είναι το μέγεθος δείγματος. Εντούτοις, οι μελέτες υποψήφιου γονιδίου τείνουν να εμφανίζουν μειωμένη στατιστική ισχύ ανίχνευσης ασθενών επιδράσεων, όταν αυτές προέρχονται από κοινές γενετικές παραλλαγές (149). Για παράδειγμα, προκειμένου να ανιχνεύσουμε μία μέτρια γενετική επίδραση ($OR=1.2$) ενός κοινού πολυμορφισμού (συχνότητας 10%) με ισχύ $> 80\%$, θα χρειαζόμαστε ένα μέγεθος δείγματος άνω των 10,000 ατόμων (149). Ως εκ τούτου, καθίσταται σαφές ότι τα απαιτούμενα μεγέθη ξεπερνούν τόσο πολύ τα διαθέσιμα δείγματα ώστε καμία μεμονωμένη αρχή, οργανισμός ή ίδρυμα δε θα μπορούσε να τα συγκεντρώσει. Αξιοσημείωτη βοήθεια στο πρόβλημα αυτό έρχεται να προσφέρει η μετά-ανάλυση. Η μετά-ανάλυση εκτιμά την αθροιστική γενετική επίδραση για εξεταζόμενες συσχέτισεις γονιδίου-νοσήματος και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την επίλυση αντικρουόμενων ευρημάτων καθώς και για τη μείωση της αβεβαιότητας του μεγέθους του εκτιμώμενου γενετικού κινδύνου (104). Οι μετά-αναλύσεις πολλαπλών μελετών συσχέτισης προσφέρουν ξεκάθαρη υποστήριξη στις δυνατότητες ανάλυσης με αυξημένη στατιστική ισχύ. Περαιτέρω δυνατότητες που προσφέρονται με αυτή την προσέγγιση, πέραν της ενισχυμένης στατιστικής ισχύος, συμπεριλαμβάνουν τη

δυνατότητα τοποθέτησης κάθε μελέτης στο πλαίσιο των υπολοίπων συναφών μελετών και τη δυνατότητα διευκρίνησης των λόγων για τους οποίους οι διάφορες μελέτες καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα (104).

Ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κάθε μέθοδος ανάλυσης μίας μελέτης συσχέτισης περιλαμβάνει παγίδες για τον μη εξειδικευμένο ερευνητή. Η άμεση πρόσβαση σε πληθώρα προγραμμάτων ανάλυσης μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένους χειρισμούς εάν δε γίνει ορθή εκτίμηση των υποκείμενων στατιστικών υποθέσεων. Στην περίπτωση αυτή, η ασφαλέστερη εγγύηση μίας ποιοτικής ανάλυσης παρέχεται από τη συμμετοχή ειδικών της βιοστατιστικής μεθοδολογίας, τόσο κατά το σχεδιασμό και την ανάλυση των δεδομένων, όσο και κατά τη συνολική ανασκόπηση της μελέτης (103). Όσον αφορά στο επίπεδο της ερμηνείας των αποτελεσμάτων, αρκετή συζήτηση έχει γίνει περί της ενδεδειγμένης στάθμης σημαντικότητας προκειμένου μία συσχέτιση να θεωρηθεί έγκυρη, με έμφαση να δίνεται στην απαίτηση για αυστηρότερες τιμές κριτηρίου p (p -value) προκειμένου να δημοσιευτεί μία μελέτη. Πέραν του ότι η αύξηση του δείγματος που απαιτείται για μία αυστηρότερη p -value βρίσκεται πάνω από τις δυνατότητες πολλών ερευνητικών κέντρων, μια ανάλογη τακτική θα απέκλειε πολλές καλώς σχεδιασμένες μελέτες, οι οποίες θα ανέφεραν εν πολλοίς αρνητικές συσχετίσεις. Με αυτό τον τρόπο, το υλικό που θα έμενε προς δημοσίευση θα ήταν ακόμα πιο επιρρεπές στο σφάλμα (103). Εξάλλου, η p -value μίας μελέτης δε σχετίζεται με την πειραματική ποιότητα αυτής, και είναι γνωστό ότι μελέτες με κατάλληλο μέγεθος δείγματος, χαμηλό σφάλμα γονοτύπωσης, ακριβείς αρχικές υποθέσεις και πλήρη περιγραφή των πραγματοποιηθέντων αναλύσεων, αποδεικνύονται πολύτιμες για τη διερεύνηση κάθε συσχέτισης.

4.2. Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Στην παρούσα διατριβή έγινε εκτίμηση των πιθανών επιδράσεων τριών κοινών γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *NOS3* και των απλοτύπων τους, στην εμφάνιση της προεκλαμψίας. Οι πολυμορφισμοί 4a/b, T786C και G894T, αποτελούν τους συχνότερα μελετώμενους του γονιδίου *NOS3*, αλλά τόσο η μεμονωμένη ανάλυσή τους, όσο και η ανάλυση των απλοτύπων τους, δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την προεκλαμψία. Τα παραπάνω αποτελέσματα στηρίχθηκαν στη διενέργεια μίας μελέτης γενετικής συσχέτισης, στην οποία όμως συμπεριλήφθηκε μικρός σχετικά αριθμός συμμετεχόντων, οπότε κάθε συμπέρασμα οφείλει να εξάγεται με προσοχή.

Όπως έχουμε δει παραπάνω, ο έλεγχος των απλότυπων είναι δυνατό να υπερκεράσει ορισμένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται στις αναλύσεις μεμονωμένων δεικτών, δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις πολλών πολυμορφισμών σε έναν απλότυπο αναμένεται να αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες λειτουργικότητας του γονιδίου (139). Ιδιαίτερα αν οι δείκτες που κατασκευάζουν έναν απλότυπο αποτελούν και λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις, τότε οι απλότυποι θα έχουν έναν πιο κρίσιμο βιολογικό ρόλο και η όλη προσέγγιση θα εμφανίζει ενισχυμένη στατιστική ισχύ. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση εργασίας, έγινε ο έλεγχος των απλότυπων για τους πολυμορφισμούς 4a/b, T786C και G894T, χωρίς όμως να ανιχνευθούν σημαντικές συσχετίσεις, μολονότι λειτουργικές αναλύσεις έχουν αναδείξει σημαντικό ρόλο για τους T786C και G894T.

Αρκετές δημοσιευμένες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφέρει σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών 4a/b, T786C, G894T και της προεκλαμψίας (150-162), ενώ τα ευρήματά τους έχουν επιβεβαιωθεί από τρεις μετά-

αναλύσεις (114, 163, 164). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα αρνητικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς και άλλων μελετών (165, 166) και μετά-αναλύσεων (167-169), δεν καταδεικνύουν κάποια σημαντική επίδραση των γενετικών παραλλαγών του *NOS3* στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Δεδομένης της δυσχέρειας στην πρόβλεψη των λειτουργικών επιδράσεων των περισσότερων γενετικών παραλλαγών, η επιβεβαίωση των θετικών συσχετίσεων, όπως έχουμε δει, αποδεικνύεται προβληματική (103). Επιπρόσθετα, η πολυπαραγοντική αιτιολογία αρκετών ασθενειών, η οποία περιλαμβάνει σύνθετες γενετικές και περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις, καθιστά ακατάλληλη την εξαγωγή αδιαμφισβήτητων συμπερασμάτων μόνο από τις μελέτες γενετικής συσχέτισης υποψήφιου γονιδίου. Μία ενοποιημένη προσέγγιση, με τη συμμετοχή γονιδιωματικών σαρώσεων (genome scans), μικροσυστοιχιών (microarrays), αλλά και μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (GWAS), θα προσέφερε σημαντική βοήθεια στην αναγνώριση έγκυρων συσχετίσεων (170, 171). Η μοναδική μελέτη ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης που έχει διεξαχθεί σε ασθενείς με προεκλαμψία, επί του παρόντος, αποτελεί ένα ουσιαστικό πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση (111).

4.3. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η μελέτη γενετικής συσχέτισης που διεξήχθη στο πλαίσιο της παρούσης διατριβής, δεν ανέδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γονότυπων και των απλότυπων των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* και της προεκλαμψίας. Εντούτοις, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων οφείλει να είναι προσεκτική λόγω του σχετικά μικρού αριθμού συμμετεχόντων στη μελέτη. Επιπλέον, δεδομένου του ότι η προεκλαμψία είναι σύνθετη νόσος με πολυπαραγοντική αιτιολογία, μία περιορισμένη συμβολή των μελετηθέντων πολυμορφισμών σε

συνδυασμό με άλλους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, δε θα εθεωρείτο αδόκιμη. Στην προσπάθεια για αποκάλυψη του γενετικού υποστρώματος της προεκλαμψίας, η συνεργασία σε ερευνητικό επίπεδο για τη διενέργεια μελετών γενετικής (GAS) και ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (GWAS) με την απαραίτητη στατιστική ισχύ, κρίνεται αναγκαία. Τέλος, ο σχεδιασμός μελετών ικανών να εκτιμήσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων σε συνδυασμό με την αξιοποίηση των πληροφοριών που παρέχουν εκτεταμένες μελέτες του ανθρώπινου γονιδιώματος (genome studies) (172), θα συντελέσουν ώστε η έρευνα στο πεδίο της γενετικής της προεκλαμψίας να γίνεται με μεγαλύτερες αξιώσεις στο μέλλον.

5. Βιβλιογραφία

References

- [1] **Sibai B, Dekker G, Kupferminc M.** Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005 Feb 26-Mar 4;365(9461):785-99. PubMed PMID: 15733721. Epub 2005/03/01. eng.
- [2] Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Jul;183(1):S1-S22. PubMed PMID: 10920346. Epub 2000/08/02. eng.
- [3] **Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R.** Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010 Aug 21;376(9741):631-44. PubMed PMID: 20598363. Epub 2010/07/06. eng.
- [4] **Sibai BM.** Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003 Jul;102(1):181-92. PubMed PMID: 12850627. Epub 2003/07/10. eng.
- [5] **Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, et al.** The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2000 May;40(2):133-8. PubMed PMID: 10925899. Epub 2000/08/05. eng.
- [6] **Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, et al.** The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ*. 2005 Mar 12;330(7491):576-80. PubMed PMID: 15760998. Epub 2005/03/12. eng.
- [7] **Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, et al.** Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol*. 2000 Jan;95(1):24-8. PubMed PMID: 10636496. Epub 2000/01/15. eng.

- [8] **Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, Macpherson C, Hauth J, Lindheimer MD, et al.** Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Jan;186(1):66-71. PubMed PMID: 11810087. Epub 2002/01/26. eng.
- [9] **Al RA, Baykal C, Karacay O, Geyik PO, Altun S, Dolen I.** Random urine protein-creatinine ratio to predict proteinuria in new-onset mild hypertension in late pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2004 Aug;104(2):367-71. PubMed PMID: 15292013. Epub 2004/08/05. eng.
- [10] **Waugh JJ, Clark TJ, Divakaran TG, Khan KS, Kilby MD.** Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2004 Apr;103(4):769-77. PubMed PMID: 15051572. Epub 2004/03/31. eng.
- [11] **Douglas KA, Redman CW.** Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ.* 1994 Nov 26;309(6966):1395-400. PubMed PMID: 7819845. Epub 1994/11/26. eng.
- [12] **Sibai BM.** Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol.* 2004 May;103(5 Pt 1):981-91. PubMed PMID: 15121574. Epub 2004/05/04. eng.
- [13] **Cavkaytar S, Ugurlu EN, Karaer A, Tapisiz OL, Danisman N.** Are clinical symptoms more predictive than laboratory parameters for adverse maternal outcome in HELLP syndrome? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(6):648-51. PubMed PMID: 17520393. Epub 2007/05/24. eng.
- [14] **Haram K, Svendsen E, Abildgaard U.** The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2009;9:8. PubMed PMID: 19245695. Epub 2009/02/28. eng.

- [15] **Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, et al.** Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG*. 2005 Jul;112(7):875-80. PubMed PMID: 15957986. Epub 2005/06/17. eng.
- [16] **Zeeman GG.** Neurologic complications of pre-eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009 Jun;33(3):166-72. PubMed PMID: 19464507. Epub 2009/05/26. eng.
- [17] **Sibai BM.** Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near-term) births. *Semin Perinatol*. 2006 Feb;30(1):16-9. PubMed PMID: 16549208. Epub 2006/03/22. eng.
- [18] **Knight M.** Eclampsia in the United Kingdom 2005. *BJOG*. 2007 Sep;114(9):1072-8. PubMed PMID: 17617191. Epub 2007/07/10. eng.
- [19] **Berks D, Steegers EA, Molas M, Visser W.** Resolution of hypertension and proteinuria after preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2009 Dec;114(6):1307-14. PubMed PMID: 19935034. Epub 2009/11/26. eng.
- [20] **Sibai BM, Stella CL.** Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 May;200(5):481 e1-7. PubMed PMID: 19019323. Epub 2008/11/21. eng.
- [21] **Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF.** WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006 Apr 1;367(9516):1066-74. PubMed PMID: 16581405. Epub 2006/04/04. eng.
- [22] **Duley L.** The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009 Jun;33(3):130-7. PubMed PMID: 19464502. Epub 2009/05/26. eng.
- [23] **Berg CJ, Mackay AP, Qin C, Callaghan WM.** Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstet Gynecol*. 2009 May;113(5):1075-81. PubMed PMID: 19384123. Epub 2009/04/23. eng.

- [24] **Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK.** Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens.* 2008 May;21(5):521-6. PubMed PMID: 18437143. Epub 2008/04/26. eng.
- [25] **Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ.** Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2005 Jul;106(1):156-61. PubMed PMID: 15994632. Epub 2005/07/05. eng.
- [26] **Rao AK, Cheng YW, Caughey AB.** Perinatal complications among different Asian-American subgroups. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 May;194(5):e39-41. PubMed PMID: 16579923. Epub 2006/04/04. eng.
- [27] **Silva LM, Coolman M, Steegers EA, Jaddoe VW, Moll HA, Hofman A, et al.** Low socioeconomic status is a risk factor for preeclampsia: the Generation R Study. *J Hypertens.* 2008 Jun;26(6):1200-8. PubMed PMID: 18475158. Epub 2008/05/14. eng.
- [28] **Dekker G, Sibai B.** Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet.* 2001 Jan 20;357(9251):209-15. PubMed PMID: 11213110. Epub 2001/02/24. eng.
- [29] **Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO.** Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 May;188(5):1241-3. PubMed PMID: 12748491. Epub 2003/05/16. eng.
- [30] **Dekker G, Robillard PY.** The birth interval hypothesis-does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis. *J Reprod Immunol.* 2003 Aug;59(2):245-51. PubMed PMID: 12896826. Epub 2003/08/05. eng.

- [31] **Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, Martz KL, Ewell MG, Morris CD, et al.** Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. *Am J Epidemiol.* 2003 Jun 15;157(12):1108-14. PubMed PMID: 12796047. Epub 2003/06/11. eng.
- [32] **Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, et al.** Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001 Mar 22;344(12):867-72. PubMed PMID: 11259719. Epub 2001/03/22. eng.
- [33] **Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM.** Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ.* 1998 May 2;316(7141):1343-7. PubMed PMID: 9563982. Epub 1998/06/06. eng.
- [34] **Trogstad L, Magnus P, Stoltenberg C.** Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Jun;25(3):329-42. PubMed PMID: 21349772. Epub 2011/02/26. eng.
- [35] **Trogstad LI, Eskild A, Magnus P, Samuelsen SO, Nesheim BI.** Changing paternity and time since last pregnancy; the impact on pre-eclampsia risk. A study of 547 238 women with and without previous pre-eclampsia. *Int J Epidemiol.* 2001 Dec;30(6):1317-22. PubMed PMID: 11821338. Epub 2002/02/01. eng.
- [36] **Mostello D, Kallogjeri D, Tungsiripat R, Leet T.** Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jul;199(1):55 e1-7. PubMed PMID: 18280450. Epub 2008/02/19. eng.
- [37] **Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, et al.** Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women

who develop preeclampsia as nulliparas. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Mar;186(3):422-6. PubMed PMID: 11904601. Epub 2002/03/21. eng.

[38] **Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, et al.** Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Apr;182(4):938-42. PubMed PMID: 10764477. Epub 2000/04/14. eng.

[39] **Ros HS, Cnattingius S, Lipworth L.** Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 1998 Jun 1;147(11):1062-70. PubMed PMID: 9620050. Epub 1998/06/10. eng.

[40] **Prasannan-Nair C, Reynolds SF, Budden G.** Partial molar pregnancy with severe pre-eclampsia at 19 weeks' gestation. *J Obstet Gynaecol.* 2006 Nov;26(8):817. PubMed PMID: 17130046. Epub 2006/11/30. eng.

[41] **Wong LF, Stuart B, Gleeson N.** Triploidy partial mole and proteinuric hypertension. *J Obstet Gynaecol.* 2007 May;27(4):424-5. PubMed PMID: 17654202. Epub 2007/07/27. eng.

[42] **Hernandez-Diaz S, Werler MM, Mitchell AA.** Gestational hypertension in pregnancies supported by infertility treatments: role of infertility, treatments, and multiple gestations. *Fertil Steril.* 2007 Aug;88(2):438-45. PubMed PMID: 17449034. Epub 2007/04/24. eng.

[43] **Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, et al.** The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Hum Reprod.* 1999 Sep;14(9):2268-73. PubMed PMID: 10469693. Epub 1999/09/02. eng.

- [44] **O'Brien TE, Ray JG, Chan WS.** Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology.* 2003 May;14(3):368-74. PubMed PMID: 12859040. Epub 2003/07/16. eng.
- [45] **Cedergren MI.** Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 2004 Feb;103(2):219-24. PubMed PMID: 14754687. Epub 2004/02/03. eng.
- [46] **Wolf M, Sandler L, Munoz K, Hsu K, Ecker JL, Thadhani R.** First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1563-8. PubMed PMID: 11932283. Epub 2002/04/05. eng.
- [47] **Redman CW, Sargent IL.** Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta.* 2003 Apr;24 Suppl A:S21-7. PubMed PMID: 12842410. Epub 2003/07/05. eng.
- [48] **Wolfberg AJ, Lee-Parritz A, Peller AJ, Lieberman ES.** Association of rheumatologic disease with preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2004 Jun;103(6):1190-3. PubMed PMID: 15172851. Epub 2004/06/03. eng.
- [49] **von Dadelszen P, Magee LA.** Could an infectious trigger explain the differential maternal response to the shared placental pathology of preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 Jul;81(7):642-8. PubMed PMID: 12190839. Epub 2002/08/23. eng.
- [50] **Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S.** Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003 Feb;101(2):227-31. PubMed PMID: 12576243. Epub 2003/02/11. eng.

- [51] **Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R.** Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation. *Obstet Gynecol.* 2001 Nov;98(5 Pt 1):757-62. PubMed PMID: 11704165. Epub 2001/11/13. eng.
- [52] **Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V.** How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002 Feb 10;101(1):6-14. PubMed PMID: 11803092. Epub 2002/01/23. eng.
- [53] **Kupferminc MJ.** Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 14;1:111. PubMed PMID: 14617365. Epub 2003/11/18. eng.
- [54] **GOPEC.** Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: a British multicenter candidate-gene study. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):127-31. PubMed PMID: 15889386. Epub 2005/05/13. eng.
- [55] **van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, et al.** High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 May;180(5):1146-50. PubMed PMID: 10329869. Epub 1999/05/18. eng.
- [56] **Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M.** The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006 Sep-Oct;27(9-10):939-58. PubMed PMID: 16490251. Epub 2006/02/24. eng.
- [57] **Pandian Z, Bhattacharya S, Templeton A.** Review of unexplained infertility and obstetric outcome: a 10 year review. *Hum Reprod.* 2001 Dec;16(12):2593-7. PubMed PMID: 11726580. Epub 2001/12/01. eng.
- [58] **Trogstad L, Magnus P, Moffett A, Stoltenberg C.** The effect of recurrent miscarriage and infertility on the risk of pre-eclampsia. *BJOG.* 2009 Jan;116(1):108-13. PubMed PMID: 19087081. Epub 2008/12/18. eng.

- [59] **Ng EH, Chan CC, Tang OS, Yeung WS, Ho PC.** The role of endometrial and subendometrial blood flows measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in the prediction of pregnancy during IVF treatment. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):164-70. PubMed PMID: 16123083. Epub 2005/08/27. eng.
- [60] **Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al.** Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* 2006 Sep;12(9):1065-74. PubMed PMID: 16892062. Epub 2006/08/08. eng.
- [61] **Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hochner-Celnikier D, Cross J, Fisher S, et al.** Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2000 Jan;6(1):88-95. PubMed PMID: 10611266. Epub 1999/12/28. eng.
- [62] **Le Bouteiller P, Pizzato N, Barakonyi A, Solier C.** HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J Reprod Immunol.* 2003 Aug;59(2):219-34. PubMed PMID: 12896824. Epub 2003/08/05. eng.
- [63] **Moffett A, Hiby SE.** How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta.* 2007 Apr;28 Suppl A:S51-6. PubMed PMID: 17292469. Epub 2007/02/13. eng.
- [64] **Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL.** Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Sep;181(3):718-24. PubMed PMID: 10486489. Epub 1999/09/16. eng.
- [65] **Burton GJ, Jauniaux E.** Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004 Sep;11(6):342-52. PubMed PMID: 15350246. Epub 2004/09/08. eng.

- [66] **Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ.** Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000 Dec;157(6):2111-22. PubMed PMID: 11106583. Epub 2000/12/07. eng.
- [67] **Plasencia W, Maiz N, Bonino S, Kaihura C, Nicolaides KH.** Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Oct;30(5):742-9. PubMed PMID: 17899573. Epub 2007/09/28. eng.
- [68] **Pijnenborg R, Brosens, I., Romero R. .** Placental Bed Disorders: Basic Science and its Translation to Obstetrics Cambridge University Press; 2010.
- [69] **Burton GJ.** Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat.* 2009 Jul;215(1):27-35. PubMed PMID: 19175804. Epub 2009/01/30. eng.
- [70] **Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS.** Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta.* 2009 Mar;30 Suppl A:S43-8. PubMed PMID: 19081132. Epub 2008/12/17. eng.
- [71] **Jauniaux E, Poston L, Burton GJ.** Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update.* 2006 Nov-Dec;12(6):747-55. PubMed PMID: 16682385. Epub 2006/05/10. eng.
- [72] **Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA.** A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Jun;200(6):615 e1-6. PubMed PMID: 19136085. Epub 2009/01/13. eng.

- [73] **Haig D.** Altercation of generations: genetic conflicts of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Mar;35(3):226-32. PubMed PMID: 8962651. Epub 1996/03/01. eng.
- [74] **Redman CW, Sacks GP, Sargent IL.** Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Feb;180(2 Pt 1):499-506. PubMed PMID: 9988826. Epub 1999/02/13. eng.
- [75] **Huppertz B.** Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008 Apr;51(4):970-5. PubMed PMID: 18259009. Epub 2008/02/09. eng.
- [76] **Karumanchi S.** Angiogenesis and preeclampsia. *Hypertensive disorders in pregnancy.* Amsterdam: Elsevier; 2009. p. 87-103.
- [77] **Redman CW, Sargent IL.** Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta.* 2009 Mar;30 Suppl A:S38-42. PubMed PMID: 19138798. Epub 2009/01/14. eng.
- [78] **Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P.** In preeclampsia, the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. *Hypertension.* 2005 Feb;45(2):258-63. PubMed PMID: 15630046. Epub 2005/01/05. eng.
- [79] **Irani RA, Xia Y.** The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta.* 2008 Sep;29(9):763-71. PubMed PMID: 18687466. Epub 2008/08/09. eng.
- [80] **Wikstrom AK, Larsson A, Akerud H, Olovsson M.** Increased circulating levels of the antiangiogenic factor endostatin in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Reprod Sci.* 2009 Oct;16(10):995-1000. PubMed PMID: 19564642. Epub 2009/07/01. eng.

- [81] **Roberts JM, Hubel CA.** The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*. 2009 Mar;30 Suppl A:S32-7. PubMed PMID: 19070896. Epub 2008/12/17. eng.
- [82] **Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD.** Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *BJOG*. 2006 May;113(5):580-9. PubMed PMID: 16579806. Epub 2006/04/04. eng.
- [83] **Chesley LC, Annitto JE, Cosgrove RA.** The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1968 Sep;32(3):303-11. PubMed PMID: 5742111. Epub 1968/09/01. eng.
- [84] **Williams PJ, Pipkin FB.** The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Aug;25(4):405-17. PubMed PMID: 21429808. Epub 2011/03/25. eng.
- [85] **Thornton JG, Macdonald AM.** Twin mothers, pregnancy hypertension and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999 Jun;106(6):570-5. PubMed PMID: 10426615. Epub 1999/07/30. eng.
- [86] **Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S.** Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet*. 2000 Apr 10;91(4):256-60. PubMed PMID: 10766979. Epub 2000/04/15. eng.
- [87] **Chappell S, Morgan L.** Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Apr;110(4):443-58. PubMed PMID: 16526948. Epub 2006/03/11. eng.
- [88] **Redman CW, Sargent IL.** Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1592-4. PubMed PMID: 15947178. Epub 2005/06/11. eng.

- [89] **Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Ronning T, Irgens LM, Lie RT.** Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ*. 2005 Oct 15;331(7521):877. PubMed PMID: 16169871. Epub 2005/09/20. eng.
- [90] **Haig D.** Genetic conflicts in human pregnancy. *Q Rev Biol*. 1993 Dec;68(4):495-532. PubMed PMID: 8115596. Epub 1993/12/01. eng.
- [91] **Weissenbach J.** Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Jun;3(3):414-7. PubMed PMID: 8353415. Epub 1993/06/01. eng.
- [92] **Green P, Helms C, Weiffenbach B, Stephens K, Keith T, Bowden D, et al.** Construction of a linkage map of the human genome, and its application to mapping genetic diseases. *Clin Chem*. 1989 Jul;35(7 Suppl):B33-7. PubMed PMID: 2568196. Epub 1989/07/01. eng.
- [93] **Todd JA, Farrall M.** Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*. 1996;5 Spec No:1443-8. PubMed PMID: 8875250. Epub 1996/01/01. eng.
- [94] **Kruglyak L.** What is significant in whole-genome linkage disequilibrium studies? *Am J Hum Genet*. 1997 Oct;61(4):810-2. PubMed PMID: 9382090. Epub 1997/10/23. eng.
- [95] **Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M.** Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2002 Apr;3(4):299-309. PubMed PMID: 11967554. Epub 2002/04/23. eng.
- [96] **Slatkin M.** Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet*. 2008 Jun;9(6):477-85. PubMed PMID: 18427557. Epub 2008/04/23. eng.

- [97] **Arngrimsson R, Siguroardottir S, Frigge ML, Bjarnadottir RI, Jonsson T, Stefansson H, et al.** A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet.* 1999 Sep;8(9):1799-805. PubMed PMID: 10441346. Epub 1999/08/11. eng.
- [98] **Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Haiva-Mallinen L, Sundstrom H, et al.** Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet.* 2003 Jan;72(1):168-77. PubMed PMID: 12474145. Epub 2002/12/11. eng.
- [99] **Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardottir S, et al.** A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur J Hum Genet.* 2001 Oct;9(10):758-64. PubMed PMID: 11781687. Epub 2002/01/10. eng.
- [100] **Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, et al.** A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet.* 2000 Dec;67(6):1581-5. PubMed PMID: 11035632. Epub 2000/10/18. eng.
- [101] **Zintzaras E, Kitsios G, Harrison GA, Laivuori H, Kivinen K, Kere J, et al.** Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum Genet.* 2006 Oct;120(3):360-70. PubMed PMID: 16868762. Epub 2006/07/27. eng.
- [102] **Cordell HJ, Clayton DG.** Genetic association studies. *Lancet.* 2005 Sep 24-30;366(9491):1121-31. PubMed PMID: 16182901. Epub 2005/09/27. eng.
- [103] **Hattersley AT, McCarthy MI.** What makes a good genetic association study? *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1315-23. PubMed PMID: 16214603. Epub 2005/10/11. eng.

- [104] **Zintzaras E, Lau J.** Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol.* 2008 Jul;61(7):634-45. PubMed PMID: 18538260. Epub 2008/06/10. eng.
- [105] **Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W.** Genes and the preeclampsia syndrome. *J Perinat Med.* 2008;36(1):38-58. PubMed PMID: 18184097. Epub 2008/01/11. eng.
- [106] **Nejatizadeh A, Stobdan T, Malhotra N, Pasha MA.** The genetic aspects of pre-eclampsia: achievements and limitations. *Biochem Genet.* 2008 Aug;46(7-8):451-79. PubMed PMID: 18437552. Epub 2008/04/26. eng.
- [107] **McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al.** Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008 May;9(5):356-69. PubMed PMID: 18398418. Epub 2008/04/10. eng.
- [108] **Johnson AD, O'Donnell CJ.** An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet.* 2009;10:6. PubMed PMID: 19161620. Epub 2009/01/24. eng.
- [109] **Hardy J, Singleton A.** Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med.* 2009 Apr 23;360(17):1759-68. PubMed PMID: 19369657. Epub 2009/04/17. eng.
- [110] **Consortium WTCC.** Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 Jun 7;447(7145):661-78. PubMed PMID: 17554300. Epub 2007/06/08. eng.
- [111] **Johnson MP, Brennecke SP, East CE, Goring HH, Kent JW, Jr., Dyer TD, et al.** Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on

2q14, near the inhibin, beta B gene. PLoS One. 2012;7(3):e33666. PubMed PMID: 22432041. Epub 2012/03/21. eng.

[112] **Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA.** Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. Am J Physiol. 1999 Aug;277(2 Pt 2):H848-54. PubMed PMID: 10444514. Epub 1999/08/13. eng.

[113] **Morris NH, Sooranna SR, Learmont JG, Poston L, Ramsey B, Pearson JD, et al.** Nitric oxide synthase activities in placental tissue from normotensive, pre-eclamptic and growth retarded pregnancies. Br J Obstet Gynaecol. 1995 Sep;102(9):711-4. PubMed PMID: 7547761. Epub 1995/09/01. eng.

[114] **Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z.** The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. Gene. 2013 Apr 25;519(1):187-93. PubMed PMID: 23375994. Epub 2013/02/05. eng.

[115] **George EM, Granger JP.** Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. Curr Hypertens Rep. 2011 Aug;13(4):269-75. PubMed PMID: 21465139. Epub 2011/04/06. eng.

[116] **Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, Granger JP.** Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. Hypertension. 1998 May;31(5):1065-9. PubMed PMID: 9576115. Epub 1998/05/12. eng.

[117] **Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB.** The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 1994 Oct;171(4):944-8. PubMed PMID: 7943106. Epub 1994/10/01. eng.

[118] **Bernardi F, Constantino L, Machado R, Petronilho F, Dal-Pizzol F.** Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic

women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008 Dec;34(6):957-63. PubMed PMID: 19012693. Epub 2008/11/18. eng.

[119] **Garcia RG, Celedon J, Sierra-Laguado J, Alarcon MA, Luengas C, Silva F, et al.** Raised C-reactive protein and impaired flow-mediated vasodilation precede the development of preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2007 Jan;20(1):98-103. PubMed PMID: 17198919. Epub 2007/01/03. eng.

[120] **Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaidis KH.** Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop preeclampsia. *Lancet.* 2003 May 3;361(9368):1511-7. PubMed PMID: 12737861. Epub 2003/05/10. eng.

[121] **Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006 Nov 15;164(10):921-35. PubMed PMID: 17018701. Epub 2006/10/05. eng.

[122] **Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA.** Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jul;22(7):361-8. PubMed PMID: 11431031. Epub 2001/06/30. eng.

[123] **Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX.** Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens.* 2005 Mar;19(3):233-40. PubMed PMID: 15565175. Epub 2004/11/27. eng.

- [124] **Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al.** Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 7;245(1):190-3. PubMed PMID: 9535806. Epub 1998/05/16. eng.
- [125] **Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al.** Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jun 8;284(2):426-30. PubMed PMID: 11394896. Epub 2001/06/08. eng.
- [126] **Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, et al.** G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation.* 1999 Jun 22;99(24):3096-8. PubMed PMID: 10377070. Epub 1999/06/22. eng.
- [127] **Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I.** Response to Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Susceptibility to Hypertension: Genotype Versus Haplotype Analysis. *Hypertension.* 2006 Nov 6. PubMed PMID: 17088443. Epub 2006/11/08. Eng.
- [128] **Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, et al.** Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Sep;27(9):2184-90. PubMed PMID: 15333482. Epub 2004/08/31. eng.
- [129] **Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2003 Nov;62(11):1083-7. PubMed PMID: 14583572. Epub 2003/10/30. eng.

- [130] **Reece JB, Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., & Jackson, R.** *Campbell biology*. 9th ed. Harlow: Pearson Education; 2011.
- [131] **Li M, Li C.** Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genet Epidemiol*. 2008 Nov;32(7):589-99. PubMed PMID: 18449919. Epub 2008/05/02. eng.
- [132] **Hardy GH.** Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science*. 1908 Jul 10;28(706):49-50. PubMed PMID: 17779291. Epub 1908/07/10. eng.
- [133] **Zintzaras E.** Impact of Hardy-Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2010 Aug;25(8):553-60. PubMed PMID: 20526652. Epub 2010/06/08. eng.
- [134] **Weir B.** Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland MA: Sinauer Associates; 1996.
- [135] **Rohlf s RV, Weir BS.** Distributions of Hardy-Weinberg equilibrium test statistics. *Genetics*. 2008 Nov;180(3):1609-16. PubMed PMID: 18791257. Epub 2008/09/16. eng.
- [136] **Zintzaras E.** The generalized odds ratio as a measure of genetic risk effect in the analysis and meta-analysis of association studies. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2010;9:Article21. PubMed PMID: 20597847. Epub 2010/07/06. eng.
- [137] **Zondervan KT, Cardon LR.** The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*. 2004 Feb;5(2):89-100. PubMed PMID: 14735120. Epub 2004/01/22. eng.
- [138] **Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al.** Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):233-7. PubMed PMID: 11586306. Epub 2001/10/05. eng.

- [139] **Schaid DJ.** Evaluating associations of haplotypes with traits. *Genet Epidemiol.* 2004 Dec;27(4):348-64. PubMed PMID: 15543638. Epub 2004/11/16. eng.
- [140] **Lewis CM.** Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform.* 2002 Jun;3(2):146-53. PubMed PMID: 12139434. Epub 2002/07/26. eng.
- [141] **Excoffier L, Slatkin M.** Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.* 1995 Sep;12(5):921-7. PubMed PMID: 7476138. Epub 1995/09/01. eng.
- [142] **Shi YY, He L.** SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005 Feb;15(2):97-8. PubMed PMID: 15740637. Epub 2005/03/03. eng.
- [143] **Cardon LR, Bell JL.** Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001 Feb;2(2):91-9. PubMed PMID: 11253062. Epub 2001/03/17. eng.
- [144] **Balding DJ.** A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006 Oct;7(10):781-91. PubMed PMID: 16983374. Epub 2006/09/20. eng.
- [145] **Gordon D, Finch SJ.** Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J Clin Invest.* 2005 Jun;115(6):1408-18. PubMed PMID: 15931375. Epub 2005/06/03. eng.
- [146] **Tabor HK, Risch NJ, Myers RM.** Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet.* 2002 May;3(5):391-7. PubMed PMID: 11988764. Epub 2002/05/04. eng.
- [147] **Hunter DJ.** Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet.* 2005 Apr;6(4):287-98. PubMed PMID: 15803198. Epub 2005/04/02. eng.

- [148] **Altshuler D, Daly MJ, Lander ES.** Genetic mapping in human disease. *Science*. 2008 Nov 7;322(5903):881-8. PubMed PMID: 18988837. Epub 2008/11/08. eng.
- [149] **Zintzaras E, Lau J.** Trends in meta-analysis of genetic association studies. *J Hum Genet*. 2008;53(1):1-9. PubMed PMID: 18071627. Epub 2007/12/12. eng.
- [150] **Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al.** Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension*. 2004 Nov;44(5):702-7. PubMed PMID: 15364897. Epub 2004/09/15. eng.
- [151] **Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB, Gregg AR.** Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Jun;184(7):1345-50; discussion 50-1. PubMed PMID: 11408851. Epub 2001/06/16. eng.
- [152] **Chen LK, Huang CH, Yeh HM, Lee CN, Shyu MK, Hsieh FJ, et al.** Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene may be protective against preeclampsia in a Chinese population. *Reprod Sci*. 2007 Feb;14(2):175-81. PubMed PMID: 17636229. Epub 2007/07/20. eng.
- [153] **Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, et al.** Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal-fetal flow. *J Hypertens*. 2006 Sep;24(9):1823-9. PubMed PMID: 16915032. Epub 2006/08/18. eng.
- [154] **Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, et al.** eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics*. 2008 Oct;9(10):1467-73. PubMed PMID: 18855535. Epub 2008/10/16. eng.

- [155] **Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE.** Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2010 Jul;16(7):506-10. PubMed PMID: 20457799. Epub 2010/05/12. eng.
- [156] **Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz PM.** The -786T/C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 May;138(1):118-9. PubMed PMID: 17382454. Epub 2007/03/27. eng.
- [157] **Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grzeskowiak E, Mrozikiewicz P.** The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Mar;24(3):432-6. PubMed PMID: 20822330. Epub 2010/09/09. eng.
- [158] **Sharma D, Trivedi SS, Bhattacharjee J.** Oxidative stress and eNOS (Glu298Asp) gene polymorphism in preeclampsia in Indian population. *Mol Cell Biochem.* 2011 Mar 23. PubMed PMID: 21424903. Epub 2011/03/23. Eng.
- [159] **Sharma D, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J.** Intergenotypic variation of nitric oxide and inflammatory markers in preeclampsia: A pilot study in a North Indian population. *Hum Immunol.* 2011 Mar 2. PubMed PMID: 21376097. Epub 2011/03/08. Eng.
- [160] **Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR.** An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2001;20(1):107-18. PubMed PMID: 12044319. Epub 2002/06/05. eng.

- [161] **Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, et al.** Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2000 Jul-Aug;7(4):238-41. PubMed PMID: 10964023. Epub 2000/08/30. eng.
- [162] **Aggarwal PK, Jain V, Jha V.** Endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res.* 2010 May;33(5):473-7. PubMed PMID: 20186148. Epub 2010/02/27. eng.
- [163] **Qi HP, Fraser WD, Luo ZC, Julien P, Audibert F, Wei SQ.** Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Preeclampsia. *Am J Perinatol.* Jan 17. PubMed PMID: 23329567. Epub 2013/01/19. Eng.
- [164] **Chen H, Zhao G, Sun M, Wang H, Liu J, Gao W, et al.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and preeclampsia: meta-analysis of 18 case-control studies. *DNA Cell Biol.* 2012 Jun;31(6):1136-45. PubMed PMID: 22054068. Epub 2011/11/08. eng.
- [165] **Hillermann R, Carelse K, Gebhardt GS.** The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet.* 2005;50(8):415-9. PubMed PMID: 16059745. Epub 2005/08/02. eng.
- [166] **Tempfer CB, Jirecek S, Riener EK, Zeisler H, Denschlag D, Hefler L, et al.** Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig.* 2004 May;11(4):227-31. PubMed PMID: 15120696. Epub 2004/05/04. eng.
- [167] **Yu CK, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaidis KH, Hingorani AD.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp)

and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2006;6:7. PubMed PMID: 16542455. Epub 2006/03/18. eng.

[168] **Medica I, Kastrin A, Peterlin B.** Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007 Apr;131(2):115-26. PubMed PMID: 17112651. Epub 2006/11/23. eng.

[169] **Shaik AP, Sultana A, Bammidi VK, Sampathirao K, Jamil K.** A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women. *J Obstet Gynaecol*. Oct;31(7):603-7. PubMed PMID: 21973132. Epub 2011/10/07. eng.

[170] **Kitsios GD, Zintzaras E.** Genome-wide association studies: hypothesis-"free" or "engaged"? *Transl Res*. 2009 Oct;154(4):161-4. PubMed PMID: 19766959. Epub 2009/09/22. eng.

[171] **Kitsios GD, Zintzaras E.** Genomic convergence of genome-wide investigations for complex traits. *Ann Hum Genet*. 2009 Sep;73(Pt 5):514-9. PubMed PMID: 19604225. Epub 2009/07/17. eng.

[172] **Kaiser J.** DNA sequencing. A plan to capture human diversity in 1000 genomes. *Science*. 2008 Jan 25;319(5862):395. PubMed PMID: 18218868. Epub 2008/01/26. eng.