



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Humanin- Ένα αμινοπεπτίδιο προστατευτικό έναντι του οξειδωτικού στρες. Μπορεί να υπάρξουν εφαρμογές της στην υπέρτασική νόσο της κύησης;**

Παναγιώτης Ν. Νικολακόπουλος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Κων/νος Νταφόπουλος, Αν. Καθηγητής, Επιβλέπων
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής
- Παναγιώτης Λιάκος, Επίκουρος Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις κλινικές εφαρμογές μοριακής ιατρικής στην Μαιευτική- Γυναικολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2014



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN**  
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS  
**Humanin- a cytoprotective peptide against oxidative stress. Is it possible to  
play a role in hypertensive disorders of pregnancy?**

**By**  
Panagiotis N. Nikolakopoulos

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in clinical applications of molecular medicine in Obstetrics- Gynecology

Larisa, October, 2014

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....  | 3  |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....   | 4  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 5  |
| ABSTRACT .....  | 6  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 7  |
| ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....  | 9  |
| 1. ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ .....   | 10 |
| 1.1. Η μιτοχονδριακή λειτουργία και βιολογία.....                                   | 10 |
| 1.2. Η έννοια της ανάδρομης σηματοδότησης: από το μιτοχόνδριο προς τον πυρήνα ..... | 11 |
| 2. HUMANIN .....  | 14 |
| 2.1. Η ανακάλυψη της humanin .....  | 14 |
| 2.2. Ο μηχανισμός δράσης της humanin .....  | 17 |
| 2.3. Οι δράσεις της humanin .....   | 22 |
| 2.4. Humanin και οξειδωτικό στρες .....   | 25 |
| 3. ΥΠΕΡΤΑΣΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΥΗΣΗΣ .....  | 28 |
| 3.1. Προεκλαμψία.....   | 29 |
| 3.2. Η αιτιολογία της προεκλαμψίας και η πλακουντιακή ισχαιμία/ υποξία .....        | 30 |
| 3.2.1. Η φυσιολογία της κύησης.....   | 31 |
| 3.2.2. Παθογένεση.....  | 32 |
| 3.2.3. Ο ρόλος του πλακούντα.....   | 32 |
| 3.2.4. Η ανώμαλη πλακουντοποίηση .....  | 32 |
| 3.2.5. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες.....   | 34 |
| 3.2.6. Φλεγμονώδης διεργασία.....   | 37 |
| 3.2.7. Γενετικοί παράγοντες.....  | 38 |
| 3.2.8. Ανοσολογικοί παράγοντες .....  | 38 |
| 3.3. Κλινική εικόνα.....  | 40 |
| 3.4. Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της προεκλαμψίας .....                 | 41 |
| 3.5. Αντιμετώπιση .....   | 42 |
| ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....   | 43 |
| 1. ΥΛΙΚΟ .....  | 44 |
| 1.1. Τόπος διεξαγωγής μελέτης.....  | 44 |
| 1.2. Κριτήρια επιλογής του προς μελέτη πληθυσμού .....                              | 44 |
| 1.3. Κριτήρια αποκλεισμού.....  | 45 |
| 1.4. Ομάδες γυναικών .....  | 45 |
| 2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....   | 46 |
| 2.1. Τύπος μελέτης.....   | 46 |
| 2.2. Υπολογισμός μεγέθους δείγματος .....   | 46 |
| 2.3. Παράμετροι που αξιολογήθηκαν .....   | 46 |
| 2.4. Λήψη δείγματος αίματος .....   | 47 |
| 2.3. Προσδιορισμός αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων.....                     | 47 |
| 2.4. Προσδιορισμός της humanin .....  | 47 |
| 2.5. Στατιστική ανάλυση.....  | 48 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....  | 49 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....  | 63 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 67 |

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η humanin αποτελεί το πρώτο περιγραφόμενο πεπτίδιο που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια και έχει νευροπροστατευτική δράση. Αποτελεί ένα 24- αμινοπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό 16SRNA. Αρχικά απομονώθηκε από τον ινιακό λοβό ασθενών με νόσο Alzheimer. Παρόλο που ο πρώτος ρόλος που αποδόθηκε στη humanin ήταν η προστασία των νευρικών κυττάρων από την απόπτωση, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει τη humanin ως έναν παράγοντα επιβίωσης ευρέος φάσματος. Μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι η humanin δρα κυτταροπροστατευτικά σε μια ποικιλία ιστών πέρα από το νευρικό σύστημα.

Η προστατευτική της δράση επεκτάθηκε ραγδαίως από τη νόσο Alzheimer σε άλλα μοντέλα ασθενειών, διευρύνοντας το ρόλο καθώς και τις δράσεις της. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες από τις νόσους που έχει μελετηθεί η humanin, το οξειδωτικό στρες αποτελεί τον κοινό παρονομαστή, θέτοντας το ερώτημα στους ερευνητές αν η humanin αποτελεί έναν γενικότερο κυτταροπροστατευτικό παράγοντα κατά του οξειδωτικού στρες. Συνδυάζοντας τα μέχρι τώρα δεδομένα, η συσχέτιση της humanin με τα γυναικολογικά- μαιευτικά νοσήματα και ιδιαίτερα με την υπερτασική νόσο της κύησης, λόγω της αιτιολογικής της σχέση με την καρδιαγγειακή νόσο, θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής μελέτης.

Η μελέτη αυτή έχει ως σκοπό την εκτίμηση των επιπέδων της humanin στον ορό εγκύων γυναικών με προεκλαμψία, συγκρίνοντας τις γυναίκες αυτές με έγκυες με φυσιολογικές κύσεις. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς τα επίπεδα της humanin στην εγκυμοσύνη και στην υπερτασική νόσο της κύησης. Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας αποτελεί την πρώτη μελέτη που γίνεται σε αυτό το θέμα. Η επιβεβαίωση της συμμετοχής της humanin στην παθογένεση της προεκλαμψίας, ασκώντας προστατευτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονώδους αντίδρασης σε επίπεδο αγγείων, θα ανοίξει νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση και κατανόηση της νόσου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η humanin αποτελεί ένα 24- αμινοπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό 16SRNA. Αρχικά απομονώθηκε από τον ινιακό λοβό ασθενών με νόσο Alzheimer. Παρόλο που ο πρώτος ρόλος που αποδόθηκε στη humanin ήταν η προστασία των νευρικών κυττάρων από την απόπτωση, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει τη humanin ως έναν παράγοντα επιβίωσης ευρέος φάσματος. Μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι η humanin δρα κυτταροπροστατευτικά σε μια ποικιλία ιστών πέρα από το νευρικό σύστημα. Οι μελέτες αυτές διευρύνουν το επίπεδο δράσης της humanin και δημιουργούν προοπτικές για καινοτόμες έρευνες.

**Σκοπός:** Η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης της humanin στον ορό και της προεκλαμψίας.

**Τύπος μελέτης:** Μελέτη ασθενών- μαρτύρων δεδομένης χρονικής στιγμής.

**Ασθενείς:** Σαράντα γυναίκες σύνολο. Είκοσι γυναίκες με φυσιολογική κύηση και είκοσι με προεκλαμψία.

**Αποτελέσματα:** Η συγκέντρωση της humanin στον ορό βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη στις προεκλαμπτικές γυναίκες (μέσος όρος= 757,49pg/ml, τυπική απόκλιση= 84,20) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (μέσος όρος= 625,64pg/ml, τυπική απόκλιση= 83,03) ( $p < 0,001$ ). Η μονοπαραγοντική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε αποκάλυψε ισχυρή γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της humanin με τη συστολική ( $r = 0,500$  και  $p = 0,001$ ), διαστολική ( $r = 0,528$  και  $p < 0,001$ ) και μέση αρτηριακή πίεση ( $r = 0,535$  και  $p < 0,001$ ), καθώς και με τα επίπεδα του ουρικού οξέος ( $r = 0,554$  και  $p < 0,001$ ). Τέλος, η ROC ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα της humanin του ορού είναι χρήσιμα για την διάκριση μεταξύ των προεκλαμπτικών ή μη γυναικών, με περιοχή κάτωθεν της καμπύλης- AUC 0,860 (95% διάστημα εμπιστοσύνης CI: 0,749-0,971;  $p < 0,001$ ).

**Συμπεράσματα:** Η συγκέντρωση της humanin στον ορό φαίνεται να είναι αυξημένη στις προεκλαμπτικές γυναίκες σε σχέση με τις φυσιολογικές. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης της humanin, καθώς και για τη διερεύνηση του πιθανού διαγνωστικού και θεραπευτικού της ρόλου στα νοσήματα που συναντώνται στη Μαιευτική.

**Λέξεις κλειδιά:** humanin, οξειδωτικό στρες, υπερτασική νόσος της κύησης, προεκλαμψία, ενδοθήλιο

## ABSTRACT

Humanin is a 24-amino acid peptide encoded by mitochondrial 16SRNA that firstly isolated from the occipital lobe of patients with Alzheimer's disease. Although it was identified as an anti-neuronal death factor, extensive literature indicates humanin as a wide spectrum survival factor. To date, humanin has been shown to play a role in preventing cell death among various tissues outside of the nervous system. These studies have broadened the scope of humanin activity and opened up a new field of research.

**Objective:** To investigate the potential association between humanin serum concentration and preeclampsia.

**Design:** Case- control, cross sectional study.

**Patients:** A total of forty pregnant women. Twenty with uncomplicated pregnancies and twenty with preeclampsia.

**Results:** Serum humanin was significantly increased in preclamptic women (mean= 757,49pg/ml, std. deviation= 84,20) as opposed to their matched controls (mean= 625,64pg/ml, std. deviation= 83,03) ( $p < 0,001$ ). Univariate analysis revealed a strong linear correlation of humanin levels with systolic ( $r = 0,500$  και  $p = 0,001$ ), diastolic ( $r = 0,528$  και  $p < 0,001$ ) and mean arterial blood pressure ( $r = 0,535$  και  $p < 0,001$ ), as well as with uric acid serum concentrations ( $r = 0,554$  και  $p < 0,001$ ). ROC analysis illustrated that serum humanin concentration is helpful in discriminating between preclamptic or nonpreclamptic women with an area under the curve of 0,860 (95% confidence interval CI: 0,749- 0,971;  $p < 0,001$ ).

**Conclusions:** Humanin serum level seems to be increased in preeclampsia, compared with uncomplicated pregnancies. Further studies are needed to clarify the mechanisms underlying these findings and explore the diagnostic and therapeutic implications of humanin in Obstetrics.

**Keywords:** humanin, oxidative stress, hypertensive disorders of pregnancy, preeclampsia, endothelium

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν οργανίδια που εξυπηρετούν το κύτταρο στην παραγωγή ενέργειας και στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Αυτό το επιτυγχάνουν απαντώντας σε μια σειρά από σύνθετα σήματα που προέρχονται από το κύτταρο. Όντας όμως κυτταρικές οντότητες με ζωτικό ρόλο, τα μιτοχόνδρια επικοινωνούν με το κύτταρο και με την αποστολή σημάτων προς αυτό, συμμετέχοντας ενεργά, με αυτόν τον τρόπο, στον καθορισμό των κύριων λειτουργιών του κυττάρου. Τα σήματα αυτά αναφέρονται συνολικά ως σήματα ανάδρομης σηματοδότησης. Κωδικοποιούνται στο πυρηνικό γονιδίωμα ή αποτελούν δευτερογενή προϊόντα του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Η humanin αποτελεί το πρώτο μικροπεπτίδιο, ενός υποτιθέμενου συνόλου πεπτιδίων που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια (MDPs- mitochondrial derived peptides), το οποίο εμφανίζει ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση έναντι διαφόρων μοντέλων στρες και νόσων. Η μελέτη της humanin, καθώς και των άλλων πεπτιδίων που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια με δράση ανάδρομης σηματοδότησης, θα βοηθήσει στην ταυτοποίηση των γονιδίων και των πεπτιδίων με δυνητικά θεραπευτικές και διαγνωστικές δυνατότητες στην αντιμετώπιση μιας σειράς ανθρώπινων ασθενειών (1).

Μια τέτοια κλινική οντότητα θα μπορούσε να είναι η υπερτασική νόσος της κύησης. Η προεκλαμψία (PE- preeclampsia), συγκεκριμένα, αποτελεί την κύρια αιτία μητρικής θνησιμότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από την πρωτοεμφανιζόμενη υπέρταση και πρωτεϊνουρία στην κύηση. Η παθολογική πλακουντοποίηση είναι κυρίως υπεύθυνη για την ασθένεια. Αν η PE παραμείνει χωρίς θεραπεία, εξελίσσεται σε μια πιο σοβαρή κατάσταση γνωστή ως εκλαμψία. Η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η πρωτεϊνουρία, η παχυσαρκία, το οικογενειακό ιστορικό, η ατοκία, οι πολύδυμες κύσεις και η θρομβωτική αγγειακή νόσος συμβάλλουν ως παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση της νόσου. Το οφειλόμενο στην PE μεταβολικό στρες προκαλεί αγγειακή βλάβη, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη, στο μέλλον, καρδιαγγειακής (CVD- cardiovascular disease) και χρόνιας νεφρικής νόσου (CKD- chronic kidney disease). Ο κίνδυνος αυτός φαίνεται να αυξάνεται ιδιαίτερα σε γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων επεισοδίων PE και εκλαμψίας. Τα αυξημένα επίπεδα sFlt- 1 (soluble fms- like tyrosine kinase-1) στον ορό, καθώς και τα μειωμένα επίπεδα του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (PIGF- placental growth factor) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF- vascular endothelial growth factor), χαρακτηρίζουν τη σοβαρή μορφή της PE. Τα κλινικά ευρήματα της σοβαρής PE συνοδεύονται από την παρουσία συστηματικής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μικροαγγειοπάθειας, στο ήπαρ (αιμόλυση, αυξημένες δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας και χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων,

δηλαδή το σύνδρομο HELLP) και στους νεφρούς (λευκωματουρία). Η έγκαιρη διάγνωση της PE είναι ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους στη Μαιευτική (2).



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

## 1.1. Η μιτοχονδριακή λειτουργία και βιολογία

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων προέρχεται από τα α-πρωτεοβακτήρια που ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα-ξενιστές. Η ενσωμάτωση του μιτοχονδρίου (πρωτο- μιτοχόνδριο) άλλαξε την πορεία της εξέλιξης των ευκαρυωτικών κυττάρων, μέσω μιας μνημειώδους μεταβολικής αναβάθμισης που χρησιμοποιεί το οξυγόνο για την μαζική παραγωγή ενέργειας (3). Λόγω της προκαρυωτικής προέλευσής τους, τα μιτοχόνδρια είναι επίσης μοναδικά, μεταξύ των άλλων ενδοκυττάρων οργανιδίων, επειδή περιέχουν το δικό τους γονιδίωμα. Αυτό το μικρό γονιδίωμα πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα της σταδιακής απώλειας ή της μεταφοράς της μεγάλης πλειοψηφίας των αρχικών βακτηριακών γονιδίων στον πυρήνα, αφήνοντας μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους που είναι απαραίτητες για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτή η συνιστώσα του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει αρχίσει να διερευνάται για τον δυνητικό της ρόλο σε καταστάσεις όπως η γήρανση, ο καρκίνος, ο διαβήτης, η κώφωση και η νευροεκφύλιση (1,4).

Το μιτοχόνδριο είναι υπεύθυνο για πολλές κρίσιμες κυτταρικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ενέργειας, της ρύθμισης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), της παραγωγής πρόδρομων βιοσυνθετικών ουσιών, της σύνθεσης της αίμης, της παραγωγής Fe-S, της ομοιόστασης των ιόντων και της παραγωγής αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS- reactive oxygen species) (5). Επιφορτισμένα με τέτοιες κρίσιμες αρμοδιότητες, συμμετέχουν ενεργά στον καθορισμό σημαντικών κυτταρικών διεργασιών. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το πώς τα μιτοχόνδρια διαβιβάζουν πληροφορίες στο κύτταρο-ξενιστή (1).

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται γενικά το εργοστάσιο ενέργειας του κυττάρου, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής παραγωγής του ATP εμφανίζεται εκεί. Μέσα στα μιτοχόνδρια λαμβάνει χώρα ο κύκλος του Krebs, δημιουργώντας μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ATP. Εκτός από τον ρόλο τους στην παραγωγή ενέργειας και στον μεταβολισμό, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, στο οξειδωτικό στρες και στη σηματοδότηση μέσω του ασβεστίου (6).

Ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση έχει απαριθμηθεί σε αρκετές περιπτώσεις (7,8). Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι που πυροδοτείται από την κυτταρική βλάβη (8). Επιπλέον, πολλές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται στον πυρήνα, ενεργοποιούν άμεσα την

απόπτωση όταν απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια μέσα στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Εκτός από την απόπτωση, τα μιτοχόνδρια πιστεύεται ότι αποτελούν την μεγαλύτερη γεννήτρια παραγωγής ελεύθερων ριζών στο κύτταρο (9). Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν την κύρια πηγή οξειδωτικού στρες εντός του κυττάρου και οι ρίζες αυτές μπορούν να οξειδώσουν και να προκαλέσουν βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Επιπρόσθετα, το αυξημένο οξειδωτικό στρες που προκαλούν έχει συσχετιστεί με έναν σημαντικό αριθμό διαφορετικών ασθενειών, παρόλο που έχει αναφερθεί και μια ευεργετική επίδραση του παροδικού οξειδωτικού στρες (6,10,11).

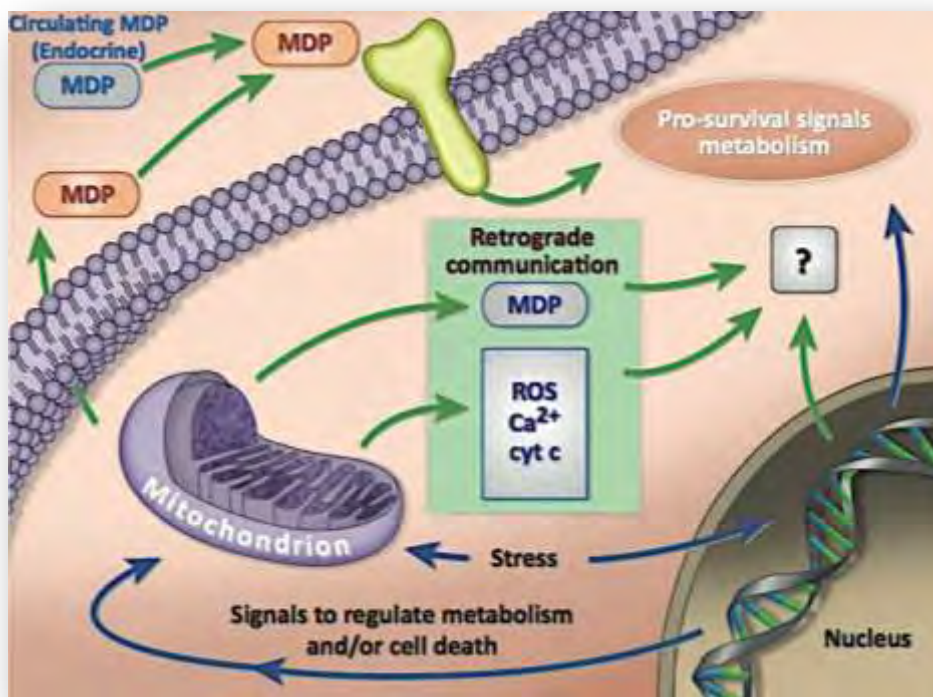
Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν επίσης ένα πολύπλοκο σύστημα που επιτρέπει την μεταφορά του  $\text{Ca}^{2+}$  μέσα και έξω από την εσωτερική τους μεμβράνη, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταροπλασματική σηματοδότηση μέσω του  $\text{Ca}^{2+}$ , στην παραγωγή ATP και στον μεταβολισμό των ορμονών. Η απορρύθμιση της μιτοχονδριακής ομοιοστασίας του  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο και να διαταράξει τη λειτουργία των ενδομιτοχονδριακών ενζύμων. Η μιτοχονδριακή πρόσληψη και αποδέσμευση του  $\text{Ca}^{2+}$  διαφέρει από τα άλλα οργανίδια στο ότι η πρόσληψη του  $\text{Ca}^{2+}$  δεν είναι ATP- εξαρτώμενη, ενώ η απελευθέρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  χρησιμοποιεί διαύλους και εναλλάκτες  $\text{Na}^+$  ή  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (6,12).

## **1.2. Η έννοια της ανάδρομης σηματοδότησης: από το μιτοχόνδριο προς τον πυρήνα**

Τα μιτοχόνδρια, παραδοσιακά, θεωρούνται ως οργανίδια τελικής λειτουργίας, τα οποία λαμβάνουν κυτταρικά σήματα και σε απάντηση αυτών ρυθμίζουν την παραγωγή ενέργειας και την απόπτωση. Παρόλα αυτά, μια συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών και των πυρηνικών γονιδίων είναι κρίσιμη για την κυτταρική ομοιόσταση, η οποία απαιτεί συνεχή και ενεργή ανταλλαγή πληροφοριών. Η επικοινωνία που ξεκινά από το μιτοχόνδριο αναφέρεται μαζικά ως ανάδρομη σηματοδότηση. Σηματοδοτεί και ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες υπό φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες, όπως το στρες (13). Αποτελεί μια βιολογική διαδικασία που είναι καλά διατηρημένη από τους απλούς μύκητες μέχρι τον άνθρωπο ( εικόνα 1) (1).

Μέχρι σήμερα, έχει ερευνηθεί ένας σχετικά περιορισμένος αριθμός ανάδρομων σηματοδοτικών μορίων και μονοπατιών. Μερικά από τα μόρια αυτά είναι τα κυτόχρωμα c, ROS,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , νιτρικό οξείδιο (NO) και μονοξειδίου του άνθρακα (CO) (14–16) (εικόνα 1). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη στο *C. elegans* περιγράφονται σήματα που εξάγονται από τα μιτοχόνδρια ως απάντηση στην πρωτεοτοξική προσβολή (17). Εντούτοις, τα σηματοδοτικά αυτά μόρια δεν αποτελούν πεπτίδια που κωδικοποιούνται μέσα στα μιτοχόνδρια,

αλλά αντ' αυτού πρόκειται για θραύσματα κατεστραμμένων πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας που παράγονται με πρωτεόλυση. Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται στο πυρηνικό γονιδίωμα και εισάγονται αργότερα στα μιτοχόνδρια. Κατά κάποιον τρόπο είναι συγκρίσιμα των ανάδρομων σημάτων του κυτοχρώματος c στο ότι είναι πρωτεϊνικά προϊόντα που κωδικοποιούνται στον πυρήνα και απελευθερώνονται πίσω στο κύτταρο από τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA- mitochondrial DNA) μπορεί από μόνο του να λειτουργήσει ως ένα σήμα. Μια πρόσφατη μελέτη καταδεικνύει ότι η αναστολή της αυτοφαγίας προκαλεί δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και στη συνέχεια το mtDNA τους εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της αυξημένης διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MPT- membrane permeability transition), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του caspase-1 inflammasome (1,18).



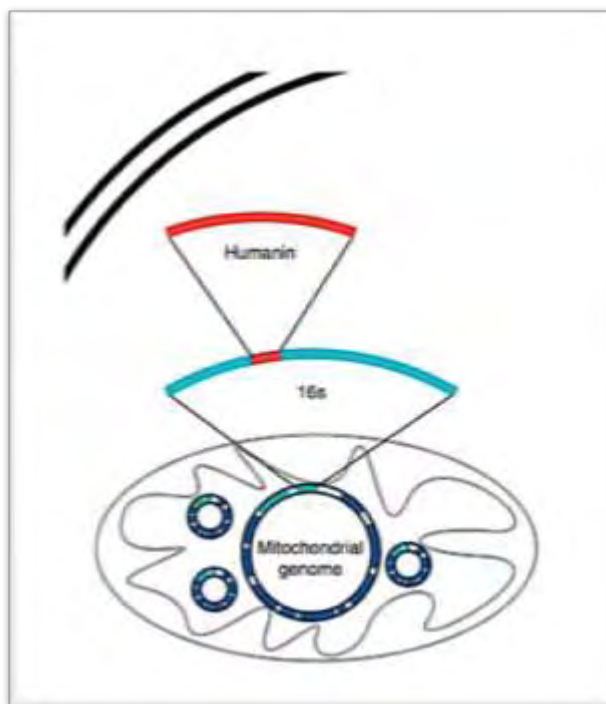
**Εικόνα 1.** Τα μιτοχονδριακής προέλευσης πεπτίδια (MDPs) αποτελούν μόρια ανάδρομης σηματοδότησης. Το μιτοχόνδριο επικοινωνεί με το κύτταρο μέσα από μια διαδικασία γνωστή ως ανάδρομη σηματοδότηση. Τα παραδοσιακά περιγραφόμενα μέσα επικοινωνίας από τα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν το Ca<sup>2+</sup>, το κυτόχρωμα c (cyt c) και τις αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα MDPs πρόσφατα αναγνωρίστηκαν ως ανάδρομα σηματοδοτικά μόρια, τα οποία είναι μοναδικά στο ότι κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Τα MDPs, όπως η humanin, πιστεύεται ότι δρουν ως ενδοκρινικοί καθώς και ως ενδοκυττάριοι παράγοντες με πολλούς βιολογικούς ρόλους στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και του μεταβολισμού (1). (Ανατύπωση από: Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides. Trends Endocrinol Metab. 2013)

Η επικοινωνία από το κύτταρο στα μιτοχόνδρια είναι καλά εδραιωμένη, αλλά το πώς τα μιτοχόνδρια σηματοδοτούν το κύτταρο είναι σχετικά λιγότερο κατανοητό. Εκτός από την χημική σηματοδότηση μέσω του  $Ca^{2+}$  και των ROS, τα μιτοχόνδρια επικοινωνούν με το κύτταρο μέσω της ανάδρομης σηματοδότησης (RTG- retrograde signaling). Σε ζωικά κύτταρα, πολλά από τα γονίδια του RTG μονοπατιού δεν υπάρχουν, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μιτοχόνδρια των ζώων έχουν μια εναλλακτική μέθοδο για τη σηματοδότηση του κυττάρου. Δύο πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι η UPR μιτοχονδριακή απάντηση (UPR- unfolded protein response) μπορεί να αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο σηματοδότησης των κυττάρων από τα μιτοχόνδρια. Η πρώτη εργασία χρησιμοποιεί το *Caenorhabditis elegans* για να αποδείξει ότι η ιστοειδική μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οδηγεί σε μια αυξανόμενη ενδοκρινική απόκριση και ότι η αύξηση αυτή εξαρτάται από την μιτοχονδριακή UPR απάντηση (19). Η δεύτερη έδειξε ότι τα μιτοχόνδρια που υποβάλλονται σε επαγόμενο από την θερμοκρασία στρες, απελευθερώνουν πεπτίδια από αποδομημένες πρωτεΐνες που προκαλούν την UPR μιτοχονδριακή απάντηση (17). Η humanin, αποτελεί ένα άλλο πεπτίδιο που ενδεχομένως να λειτουργεί ως ένα μιτοχονδριακό σήμα που δρα με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο (6).

## 2. HUMANIN

### 2.1. Η ανακάλυψη της humanin

Η humanin (MTRNR2) ανακαλύφθηκε το 2001 από τον καθηγητή Nishimoto και την ομάδα του. Αποτελεί το πρώτο πεπτίδιο που βρέθηκε να προέρχεται από το μιτοχondριακό γονιδίωμα μετά από την πλήρη αλληλούχισή του το 1981 (6). Ο όρος humanin επινοήθηκε από τον ίδιο, με σκοπό να υποδηλώσει τη δυνατότητα αυτού του μορίου να προσφέρει πιο ανθρώπινες συνθήκες ζωής σε ασθενείς με νόσο Alzheimer (AD- Alzheimer's Disease) (1). Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έψαχναν κλώνους γονιδίων επιβίωσης σε μια βάση δεδομένων συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η βάση αυτή δεδομένων δημιουργήθηκε από τμήματα εγκεφάλου (ινιακό λοβό) ασθενών με νόσο Alzheimer που έμειναν ανεπηρέαστα από το στρες της νόσου. Ο κυτταρικός θάνατος των νευρώνων αυτών προκαλείται από μία μεταλλαγμένη μορφή της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP- amyloid precursor protein), μετάλλαξη που συνδέεται με την πρόωμη έναρξη της οικογενούς AD (FAD- Familial Alzheimer's Disease). Αναζητώντας, λοιπόν, κλώνους γονιδίων με ικανότητα να προστατεύουν τους νευρώνες από τον κυτταρικό θάνατο, προσδιορίστηκαν κλώνοι των οποίων η αλληλουχία ήταν πανομοιότυπη με ένα τμήμα μιτοχondριακού 16S rRNA. Περαιτέρω μελέτη των κλώνων αυτών αποκάλυψε την αλληλουχία που παράγει ένα πεπτίδιο 24 αμινοξέων, το οποίο στη συνέχεια ονομάστηκε humanin (20,21). Το γονίδιο, επομένως, της humanin είναι ένα ORF (open reading frame) που περιλαμβάνεται στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Το μιτοχondριακό γονιδίωμα είναι εξαιρετικά μικρό και συμπαγές (16569 νουκλεοτίδια στον άνθρωπο), χωρίς γνωστά ιντρόνια και με πολύ λίγα non-coding νουκλεοτίδια, μεταξύ γειτονικών γονιδίων. Παραδοσιακά, έχει γίνει γνωστό ότι κωδικοποιεί μόνο 2 rRNAs, 13 mRNAs και 22 tRNAs. Πρόκειται δηλαδή για ένα γονίδιο μέσα σε ένα άλλο γονίδιο, στο γονιδίωμα ενός οργανιδίου μέσα σε ένα κύτταρο, όπως οι ρώσικες κούκλες (εικόνα 2) (6). Μέχρι σήμερα δεν είναι σαφές κατά πόσο η humanin μεταφράζεται στο μιτοχόνδριο ή στο κυτταρόπλασμα. Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούν έναν γενετικό κώδικα ελαφρώς διαφορετικό από αυτόν που χρησιμοποιείται στη μετάφραση που γίνεται στο κυτταρόπλασμα, παράγοντας ένα ξεχωριστό πεπτίδιο από την ίδια ακολουθία (1). Για το λόγο αυτό, το ακριβές μέγεθος της humanin δεν είναι ακόμα γνωστό. Η μετάφραση στα μιτοχόνδρια παράγει ένα 21- αμινοπεπτίδιο, ενώ στο κυτταρόπλασμα παράγει ένα 24- αμινοπεπτίδιο (6). Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι η humanin είναι βιολογικά αποτελεσματική χρησιμοποιώντας, είτε τους μιτοχondριακούς, είτε τους κυτταροπλασματικούς κώδικες, με αποτέλεσμα η περιοχή μετάφρασης να παραμένει ακόμα απροσδιόριστη (22).



**Εικόνα 2. Το ORF της humanin.** Η humanin κωδικοποιείται από ένα ORF εντός του γονιδίου για την 16S υπομονάδα του ριβοσώματος εντός του μιτοχondριακού γονιδιώματος (6). (Ανατύπωση από: Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. 2013)

Ακολούθως, οι πρώτοι ερευνητές έδειξαν ότι η humanin μπορούσε να προστατεύσει έναντι και άλλων γονιδίων που προκαλούν την οικογενή AD, αλλά δεν μπορούσε να προστατεύσει έναντι της νόσου του Huntington ή της πλευρικής μυατροφικής σκλήρυνσης (21,23). Αυτό υποδηλώνει ότι η humanin παρέχει ειδική προστασία στα μοντέλα AD και δεν προστατεύει τα κύτταρα από όλα τα αποπτωτικά γεγονότα (6).

Η humanin (HN/MTRNR2) έχει επίσης κλωνοποιηθεί ως συνοδός της BAX που θα μπορούσε να καταστείλει την απόπτωση που προκαλείται από τη σταυροσπορίνη, την στέρηση ορού, ή την υπεριώδη ακτινοβολία (22). Η humanin συνδέεται ειδικά με τις BAX, tBID και BimEL (BCL2L11), αλλά όχι με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2, όπως οι BCL2 και BCL-B (BCL2L10) (24). Επιπλέον, το αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα της humanin είναι ειδικό για την BAX-εξαρτώμενη απόπτωση, καθώς η απόπτωση από ένα BAX-ανεξάρτητο ερέθισμα, όπως η χρήση του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- tumor necrosis factor), δεν καταστέλλεται (6).

Η humanin αλληλεπιδρά επίσης με την IGFBP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3), όπου μπορεί να εμποδίσει την IGFBP3-επαγόμενη απόπτωση σε νευρογλοιακά κύτταρα, αλλά όχι σε κύτταρα νευρώνων ή πρωτογενείς νευρώνες (25). Μολονότι η humanin μπορεί να

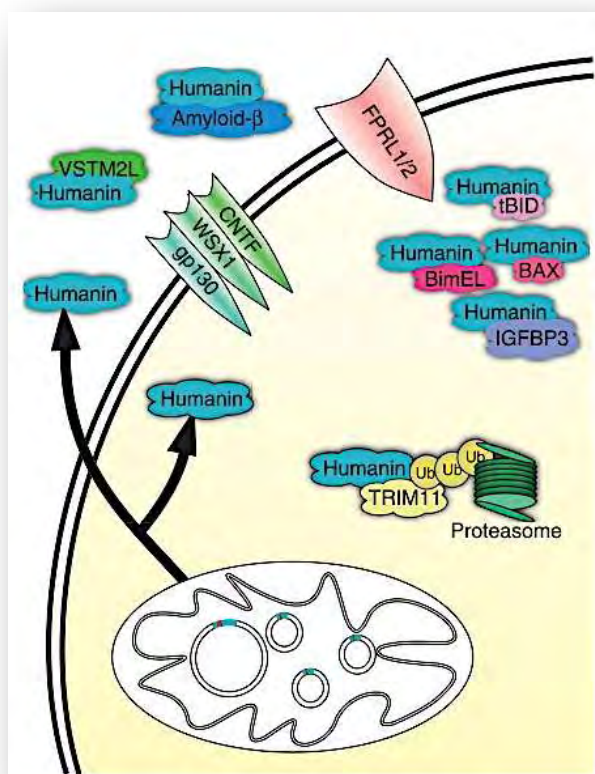
μπλοκάρει τα αποπτωτικά αποτελέσματα της IGFBP3 σε νευρογλοιακά κύτταρα, παραδόξως, οι IGFBP3 και humanin έχουν θετική, συνεργική επίδραση στην προστασία των νευρώνων από την απόπτωση που οφείλεται στο β-αμυλοειδές (6,25).



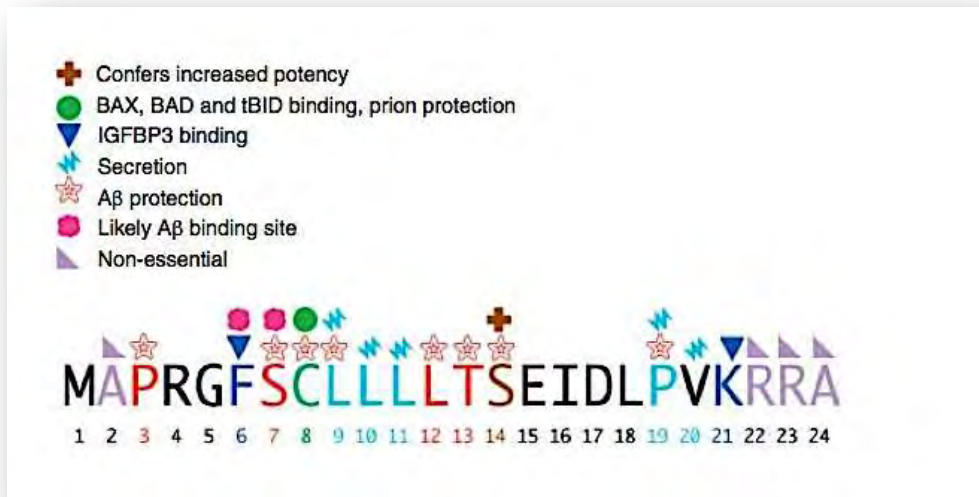
## 2.2. Ο μηχανισμός δράσης της humanin

Ο μηχανισμός δράσης της humanin έχει ερευνηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών. Η humanin μπορεί να βρίσκεται ελεύθερη στην κυκλοφορία (πλάσμα), καθώς και συνδεδεμένη στις κυτταρικές μεμβράνες (26). Η προστατευτική της δράση επάγεται αλληλεπιδρώντας με τους ειδικούς υποδοχείς- στόχους της. Έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τρεις τύπους υποδοχέων. Η κυτταροπλασματική humanin συνδέεται με την Bax πρωτεΐνη, ουδετεροποιώντας το επαγόμενο από αυτήν προ-αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι. Η εκκρινόμενη humanin συνδέεται με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα FPRL1 (formyl-peptide receptor-like-1). Τέλος, η νευροπροστατευτική της δράση στη νόσο Alzheimer επάγεται μέσω ενός διαμεμβρανικού υποδοχέα, που ονομάζεται ετεροτριμερής υποδοχέας της humanin (htHTR- hetero trimeric Humanin receptor) (εικόνα 3) (27).

Ενδοκυττάρια, η αντι-αποπτωτική δράση της humanin επάγεται με την αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες του αποπτωτικού μονοπατιού (εικόνα 3, 4). Συνδεδεμένη με την Bax πρωτεΐνη, αποτρέπει τη μετακίνησή της από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού θανάτου μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών. Επομένως, το σύμπλοκο humanin-Bax συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα και η αλληλεπίδραση αυτή προστατεύει το κύτταρο από την απόπτωση (22). Η humanin συνδέεται ακόμα με τις tBid και BimEL (μια ισομορφή της Bim) προαποπτωτικές πρωτεΐνες, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των Bax και Bak πρωτεϊνών και καταργώντας την αγωνιστική δράση της BimEL στα προαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας (24,28). Οι μελέτες αυτές διευρύνουν το πεδίο δράσης της humanin, προτείνοντας ένα σημαντικό ενδοκυττάρια ρόλο, εκτός από την εξωκυττάρια δράση της (1).



**Εικόνα 3. Ο μηχανισμός δράσης της humanin.** Η humanin παρουσιάζει τόσο ενδοκυττάριους όσο και εξωκυττάριους μηχανισμούς δράσης. Πολλές από τις δυναμικές επιδράσεις της διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα FPRL καθώς και από τον τριμερή υποδοχέα WSX1/CNTF/grp130. Ενδοκυττάρια, αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες ενεργώντας ως ένα σήμα προ-επιβίωσης (6). (Ανατύπωση από: Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. 2013)

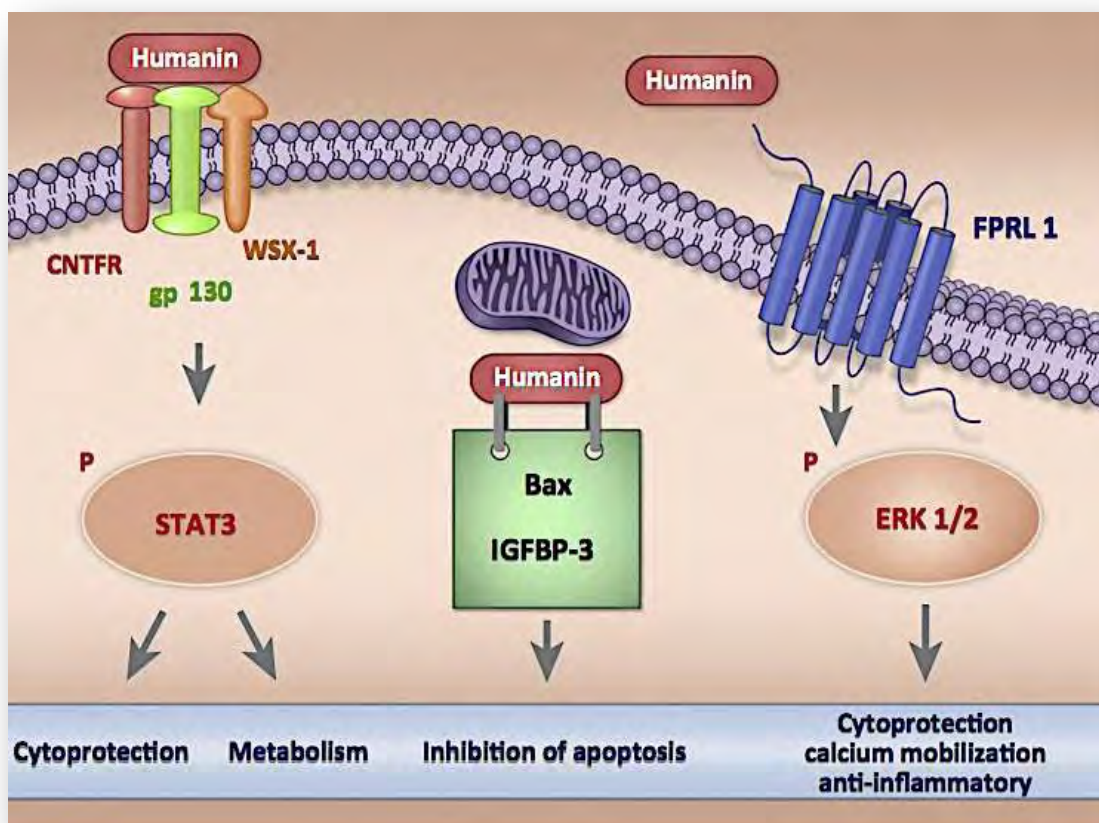


**Εικόνα 4. Η λειτουργική σημασία των αμινοξέων της humanin.** Τα σημαντικότερα αμινοξέα σημειώνονται αντίστοιχα με τη λειτουργία τους (6). (Ανατύπωση από: Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. 2013)

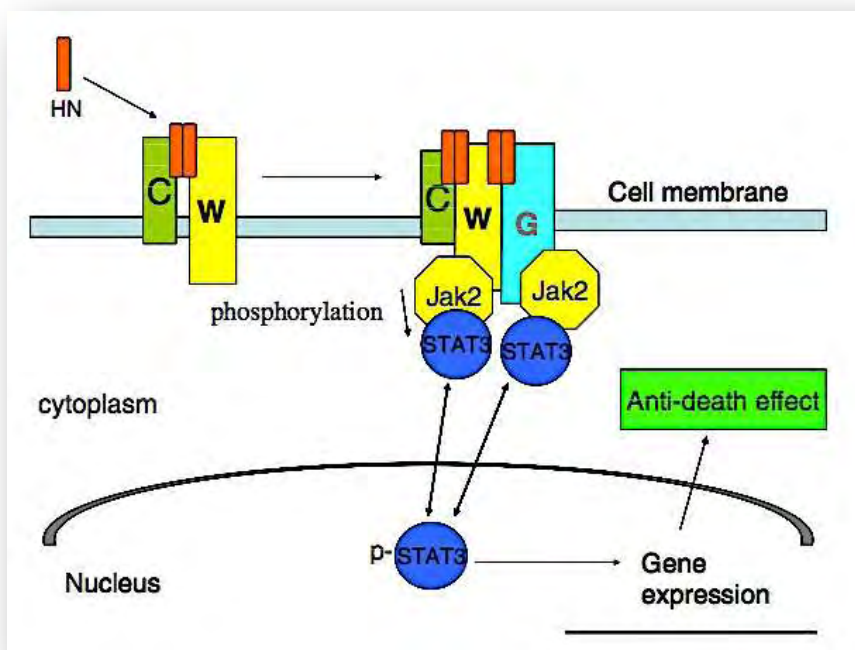
Εξωκυττάρια, η δράση της humanin επάγεται από δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Ο πρώτος υποδοχέας της humanin που περιγράφηκε, είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη, ο FPRL1 (formyl-peptide receptor-like-1), ο οποίος έχει συνδεθεί με την νόσο Alzheimer (εικόνα 5). Παρατηρήθηκε ότι, τόσο η μορφή του πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς με τα 42 αμινοξέα ( $Ab_{42}$ ), όσο και η humanin, είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τον FPRL1, προκαλώντας επιστράτευση των μονοπύρηνων. Από τους δύο συνδέτες, μόνο το  $Ab_{42}$  είναι κυτταροτοξικό και μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης. Η κυτταροτοξικότητα αυτή μπορεί να αναστραφεί από τη humanin η οποία, ανταγωνιζόμενη το  $Ab_{42}$  στη σύνδεση με τον υποδοχέα FPRL1, επιτυγχάνει τη νευροπροστατευτική της δράση. Επιπλέον, η humanin δρα ως ένας αγωνιστής του FPRL1 υποδοχέα, επάγοντας την κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$  και την ταχεία ενεργοποίηση του ERK1/2 σηματοδοτικού μονοπατιού, ενός μονοπατιού το οποίο επάγεται από αυτού του είδους τους υποδοχείς και θα μπορούσε να συμβάλει στον κυτταροπροστατευτικό ρόλο της humanin (29).

Ο δεύτερος υποδοχέας της humanin που περιγράφηκε, είναι ο htHTR που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Ο υποδοχέας αυτός ανακαλύφθηκε μετά από τη διαπίστωση των ερευνητών ότι η humanin ασκεί νευροπροστατευτική δράση, ανεξάρτητα από τον FPRL1 υποδοχέα, προκαλώντας την ενεργοποίηση του STAT3 μονοπατιού. Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι ο υποδοχέας της humanin θα μπορούσε να ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων κυτοκίνης (30). Πρόκειται για ένα τριμερές σύμπλοκο

που αποτελείται από την CNTFR (ciliary neurotrophic factor receptor) υπομονάδα, από έναν υποδοχέα κυτοκίνης τον WSX-1 και από μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη την gp130 (CNTFR/WSX-1/gp130). Η gp130 αποτελεί μια κοινή υπομονάδα των υποδοχέων της IL-6, που είναι υπεύθυνη για την επαγωγή των σηματοδοτικών μονοπατιών JAK/ STAT και ERK1/2. Η CNTF είναι μία γνωστή κυτοκίνη της οικογένειας της IL-6. Όλες οι παραπάνω υπομονάδες εκφράζονται στους νευρώνες. Η humanin, επίσης, φαίνεται να προωθεί τον ετερο-ολιγομερισμό των CNTFR, WSX-1 και gp130 (εικόνα 6) (31,32).



**Εικόνα 5. Οι κυτταρικές δράσεις της humanin.** Η humanin έχει αποδειχθεί ότι έχει τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια δράση. Εντός του κυττάρου, η humanin αλληλεπιδρά με προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως τις Bax και IGFBP-3, εμποδίζοντας έτσι την απόπτωση. Η εξωκυττάρια humanin ρυθμίζει επίσης σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως την επιβίωση, τον μεταβολισμό και την φλεγμονή, μέσω δύο τύπων υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Τον τριμερή υποδοχέα CNTFR/WSX-1/gp130, ο οποίος αναμεταδίδει σήματα μέσω του STAT3 σηματοδοτικού μονοπατιού και τον formyl-peptide receptor-like-1 (FPRL1), ο οποίος αναμεταδίδει σήματα μέσω του ERK 1/2 σηματοδοτικού καταρράκτη (1). (Ανατύπωση από: Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides. Trends Endocrinol Metab. 2013)



**Εικόνα 6. Η δομή του υποδοχέα της humanin και το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της humanin.**

Ο υποδοχέας της humanin αποτελείται από τρεις σχετιζόμενες με τον υποδοχέα της IL-6 υπομονάδες, τις CNTFr, WSX-1 και gp130. Η humanin δεσμεύεται αρχικά στις CNTFr και WSX-1 υπομονάδες και στη συνέχεια προκαλεί τον ετερο-ολιγομερισμό των CNTFr, WSX-1 και gp130. Ο επαγόμενος ετεροδιμερισμός από την humanin των ενδοκυτταρικών περιοχών των WSX-1 και gp130 επάγει τα σήματα της humanin κυρίως μέσω των JAK2 και STAT3. Οι STAT1 επίσης φωσφορυλιώνονται μετά από θεραπεία με humanin (33). (Ανατύπωση από: Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin. *Mol Neurobiol.* 2010;41(1):22–8.)

Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των διαφορετικών δράσεων που έχει η humanin θεωρείται πιθανό, και οι δύο τύποι των υποδοχέων που περιγράφηκαν παραπάνω, να είναι σημαντικοί στη διαμεσολάβηση των ποικίλων δράσεών της. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες και πιο εξειδικευμένες μελέτες προκειμένου να διασαφηνιστούν οι ρόλοι των μονοπατιών που επάγουν (1).

Επιπρόσθετα, η δράση και η έκφραση της humanin επηρεάζεται και από τη σύνδεσή της με άλλες πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα η IGFBP-3, η TRIM11 και η VSTM2L (27). Η IGFBP-3 (insulin-like growth factor-binding protein-3) αλληλεπιδρά με τη humanin, άλλοτε με ανταγωνιστική και άλλοτε με συναγωνιστική δράση (25). Η TRIM11 (tripartite motif-containing protein 11) συμμετέχει στην ενδοκυττάρια ρύθμιση των επιπέδων της humanin, οδηγώντας την σε αποδόμηση μέσω του συστήματος της ουβικουϊτίνης (34). Τέλος, η VSTM2L (V-set and transmembrane domain containing 2 like) πρωτεΐνη ανταγωνίζεται την επαγόμενη από τη humanin προστασία των νευρώνων έναντι της απόπτωσης (35).

### 2.3. Οι δράσεις της humanin

Όπως προαναφέρθηκε, η humanin ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια της έρευνας για την ανεύρεση παραγόντων επιβίωσης, σε περιοχές εγκεφάλου ασθενών με νόσο Alzheimer που δεν έχουν επηρεαστεί από τη νόσο. Για το λόγο αυτό, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι την πιο καλά μελετημένη πτυχή της βιολογίας της humanin αποτελεί η ευεργετική της δράση στην προστασία από το στρες που σχετίζεται με τη AD (6). Αρχικά, οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες (21,23). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η humanin προστατεύει τα νευρικά κύτταρα, όχι μόνο από τη νευροτοξικότητα που προκαλείται από το β αμυλοειδές (Aβ)<sub>1-43</sub>, αλλά από όλα τα, μέχρι τώρα γνωστά, μεταλλαγμένα γονίδια που προκαλούν την οικογενή μορφή της AD (APP, presenilin 1 και presenilin 2) (21,23). Στη συνέχεια, ακολουθήσαν in vivo μελέτες με χρήση παραγώγων της humanin σε ζωικά μοντέλα της AD. Με τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε βελτίωση της απώλειας μνήμης στα ζωικά μοντέλα, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα ευρήματα (36–38). Η προστατευτική δράση της humanin αποδείχθηκε αργότερα ότι οφείλεται σε μείωση της φλεγμονώδους απάντησης και της απόπτωσης (39), καθώς και σε βελτίωση της λειτουργικότητας των συνάψεων, παράγοντες που επηρεάζονται από το β αμυλοειδές και στους οποίους οφείλονται τα συμπτώματα της νόσου (40). Οι πιο πρόσφατες μελέτες εξέτασαν τη θεραπευτική χρήση της humanin και των παραγώγων της σε διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα της νόσου, παρατηρώντας μείωση της συσσώρευσης του β αμυλοειδούς, καθώς και βελτίωση της μνήμης (38,41). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, διαφαίνεται ο θεραπευτικός και προφυλακτικός ρόλος της humanin στη αντιμετώπιση της AD. Παρά το γεγονός ότι η νόσος Alzheimer αποτελεί τη νούμερο ένα αιτία άνοιας στους ενήλικες, υπάρχουν και πολλές άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Huntington. Λαμβάνοντας υπόψη την αντι-αποπτωτική δράση της humanin, πολλά εργαστήρια εξέτασαν τη χρήση της για την πρόληψη των νευροεκφυλιστικών νόσων, με αντικρουόμενα αποτελέσματα (21,42). Συνεπώς, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να εξακριβωθεί ο ρόλος της humanin σε αυτές τις νόσους (6).

Πέρα όμως από τη δράση της humanin στο νευρικό σύστημα, ο κυτταροπροστατευτικός της ρόλος αποδείχθηκε ότι επεκτείνεται και σε άλλους ιστούς. Η humanin βρέθηκε να εκφράζεται στα κύτταρα Leydig και να προάγει την επιβίωσή τους, αποτελώντας έναν αντιαποπτωτικό παράγοντα με παρουσία στους όρχεις ποντικών (43).

Η humanin εκφράζεται και στους σκελετικούς μυς. Μελέτες σε ασθενείς με σύνδρομο MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) (44) και σε ασθενείς με χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO- chronic progressive

external ophthalmoplegia) (45), έδειξαν ότι τα επίπεδα της humanin είναι σημαντικά αυξημένα στους σκελετικούς μύες των ασθενών αυτών. Πρόκειται για δύο, μιτοχονδριακής αιτιολογίας, νόσους που χαρακτηρίζονται από ελαττωματική σύνθεση ATP, λόγω μιτοχονδριακής διαταραχής. Η humanin μπορεί και αποκαθιστά τα επίπεδα του ATP σε λεμφοκύτταρα, μυϊκά και νευρικά κύτταρα, προστατεύοντάς τα από τον κυτταρικό θάνατο- απόπτωση λόγω της ενεργειακής κρίσης (46). Είναι πιθανό, το στρες που οφείλεται σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις να επάγει τα αυξημένα επίπεδα της humanin (1).

Επιπρόσθετα, όπως παρατηρήθηκε σε *in vitro* πειράματα, η humanin εκφράζεται και στα νησίδια του Langerhans, ασκώντας προστατευτικό ρόλο έναντι της επαγόμενης από τις κυτοκίνες απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος. Βελτίωσε, επίσης, την ανοχή γλυκόζης και καθυστέρησε την εκδήλωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (T1DM- type 1 diabetes mellitus) σε *in vivo* μελέτες, καταστέλλοντας σημαντικά τη φλεγμονή και τη λεμφοκυτταρική διήθηση εντός των παγκρεατικών νησιδίων του Langerhans. Θα μπορούσε, επομένως, η humanin να θεωρηθεί ένας νέος θεραπευτικός στόχος για μία χρόνια αυτοάνοση νόσο, τον T1DM (47).

Η humanin, όμως, φαίνεται να έχει και μεταβολική δράση. Λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση της αντίστασης της ινσουλίνης με τη νόσο Alzheimer (48), μελετήθηκε, όπως ήταν φυσικό, η δράση της humanin στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η χορήγηση humanin και των παραγώγων της βελτίωσε σημαντικά την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μείωσε την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ ζωικών μοντέλων. Οι δράσεις αυτές οφείλονται, εν μέρει, στην ενεργοποίηση του STAT3 μονοπατιού στον υποθάλαμο, υποδηλώνοντας μία κεντρική δράση της humanin στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Το αποτέλεσμα αυτό, πιθανό να επάγεται από τον CNTFR/WSX-1/grp130 υποδοχέα της humanin (49).

Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η humanin αντιπροσωπεύει ένα μιτοχονδριακό σηματοδοτικό μόριο που συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Η διαδικασία της γήρανσης επηρεάζεται από τα ενδοκρινολογικά μονοπάτια της αυξητικής ορμόνης και του IGF-1 (insulin like growth factor 1). Η μιτοχονδριακή λειτουργία συνδέεται επίσης με την γήρανση. Τα επίπεδα της ελεύθερης humanin μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας σε πειραματόζωα και ανθρώπους. Η GH και ο IGF αποτελούν ισχυρούς αρνητικούς ρυθμιστές των επιπέδων της humanin, ενώ τα επίπεδα της humanin σχετίζονται με τη διάρκεια ζωής στα πειραματόζωα (50).

Στα καρκινικά κύτταρα η απόπτωση αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό που επηρεάζει το αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας και την ανάπτυξη αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Λαμβάνοντας υπόψη την αντιαποπτωτική δράση της humanin, μελετήθηκε ο δυνητικός της ρόλος στην αντίσταση στην χημειοθεραπεία στον καρκίνο του στομάχου. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, η υπερέκφραση της humanin, που παρατηρείται στα

γαστρικά κύτταρα, αποτελεί έναν από τους λόγους της αντίστασης στη χημειοθεραπεία και ανοίγει νέες προοπτικές στη βιολογία του γαστρικού καρκίνου (51). Επιπρόσθετα, αποδίδεται στην humanin ο ρόλος του προστατευτικού παράγοντα έναντι των ανεπιθύμητων ενεργειών της χημειοθεραπείας. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η αποτυχία της σωματικής ανάπτυξης, που προκαλείται στα ποντίκια από την βορτεξομίμη, βελτιώνεται σημαντικά με την ταυτόχρονη χορήγηση humanin, χωρίς να επηρεάζεται η αντικαρκινική της δράση. Παρά το γεγονός ότι δεν έχει εγκριθεί η χρήση της σε παιδιά, η βορτεξομίμη είναι πολλά υποσχόμενη στην αντιμετώπιση της παιδικής λευχαιμίας καθώς και άλλων καρκίνων της παιδικής ηλικίας, αλλά με σοβαρή παρενέργεια την επίδραση στην δυναμική ανάπτυξης των παιδιών (52).

Τέλος, αναδεικνύεται ο ρόλος της humanin στο καρδιαγγειακό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Εξασθενεί το στρες που προκαλείται από την ισχαιμία και στη συνέχεια από την επαναιμάτωση των ιστών, στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Σε in vivo μελέτες, αποδείχθηκε η ικανότητα της humanin να μειώνει το μέγεθος της εγκεφαλικής βλάβης, μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας σε πειραματόζωα (53), καθώς και να ασκεί καρδιοπροστατευτικό ρόλο σε ζωικά μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας, μετά από απόφραξη της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας (26).



## 2.4. Humanin και οξειδωτικό στρες

Εκτενής βιβλιογραφία συνδέει την παθογένεση της AD με τις βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Έχει δειχθεί ότι η οξείδωση σημαντικών βιομορίων συμβαίνει νωρίς στην έναρξη της AD και προηγείται των κλινικών της συμπτωμάτων (54). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί σε ένα πλήθος ασθενειών. Η επιτυχία της humanin στη θεραπεία του στρες που προκαλείται από το Αβ αμυλοειδές, οδήγησε αρκετούς ερευνητές στη μελέτη της ικανότητας της humanin να προστατεύει και από το οξειδωτικό στρες γενικότερα (6).

Πράγματι, η χορήγηση humanin σε καλλιέργειες αμφιβληστροειδούς, έδειξε ότι μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα αυτά από τον κυτταρικό θάνατο που οφείλεται στις δραστικές μορφές οξυγόνου ( ROS- Reactive Oxygen Species), συγκεκριμένα στο υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και κατά συνέπεια στο οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, η ίδια μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία με  $H_2O_2$  μειώνει τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης Rattin (ομόλογη πρωτεΐνη της humanin στα ποντίκια). Η παρατήρηση αυτή προτείνει τη humanin ως έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τις αμφιβληστροειδοπάθειες που συνδέονται με τον κυτταρικό θάνατο (55).

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο και στην αθηροσκλήρυνση, μελετήθηκε η ικανότητα της humanin να προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες (υψηλά επίπεδα ROS) και την απόπτωση, καταστάσεις που σχετίζονται με την αθηρογένεση (56). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία πιστεύεται ότι αποτελεί τον προάγγελο της αθηρωματικής βλάβης στο αγγειακό σύστημα, συμβάλλοντας στην αύξηση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας και νοσηρότητας (57,58). Αυτή ορίζεται ως μία παθολογική αγγειοκινητική απάντηση στο φυσιολογικό ή φαρμακολογικό στρες και έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές οντότητες που σχετίζονται με το καρδιαγγειακό, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος και τα εγκεφαλικά επεισόδια (59,60). Κλασικά, οι αθηρωματικές πλάκες είναι πλούσιες σε λιπίδια και Ox-LDL, φλεγμονώδη κύτταρα, όπως μονοκύτταρα/ μακροφάγα, καθώς και νεκρωτικούς πυρήνες. Όλα μαζί είναι υπεύθυνα για την έναρξη και την διατήρηση ενός φαύλου κύκλου αυξημένης παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), φλεγμονής και απόπτωσης (61).

Σε *in vitro* μελέτη που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι η humanin εκφράζεται στο στρώμα των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος των ανθρώπινων αρτηριών και φλεβών και ότι τα προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση humanin εξασθένησε τον ox-LDL επαγόμενο σχηματισμό ROS και την απόπτωση κατά 50% (62). Η οξειδωμένη μορφή της LDL (ox-LDL) παράγεται από τις αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), ενώ ταυτόχρονα ενισχύει (μετά την παραγωγή της) το οξειδωτικό στρες, δημιουργώντας

έναν φαύλο κύκλο με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής πλάκας (63). Επιπλέον, τα επίπεδα της humanin βρέθηκαν να μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας, έναν παράγοντα που συνήθως συνδέεται με αύξηση του οξειδωτικού στρες και με μειωμένη ενδοθηλιακή κυτταρική λειτουργία. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, υποστηρίζεται ένας δυνητικός ρόλος της humanin στο μηχανισμό αντι-οξειδωτικής άμυνας στην καρδιαγγειακή νόσο και κατά συνέπεια ανοίγονται νέες προοπτικές στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης (62).

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω δεδομένων ακολούθησε in vivo μελέτη. Οι ερευνητές χορήγησαν σε πειραματόζωα, που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, ένα ανάλογο της humanin (HNGF6A). Με την παραπάνω μελέτη παρουσιάστηκε η ικανότητα της HNGF6A να μειώνει το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας, να εμποδίζει την ανάπτυξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ενώ διατηρεί την έκφραση της συνθετάσης του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου NO (eNOS) στην αορτή. Συνεπώς, η χορήγηση της HNGF6A οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της καρδιαγγειακής λειτουργίας σε ζωικά μοντέλα, ασκώντας προστατευτική δράση στην ενδοθηλιακή λειτουργία και στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (64). Η ίδια μελέτη προτείνει ότι οι μηχανισμοί που ευθύνονται εν μέρει για την προστατευτική δράση της humanin στην αθηροσκλήρωση, είναι η δράση της έναντι του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης καθώς και η διατήρηση της eNOS (64).

Με βάση τα δεδομένα αυτά, το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη μελέτη της humanin σε σχέση με την αθηροσκλήρωση στον άνθρωπο. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν ανθρώπινα δείγματα καρωτιδικών αθηρωματικών πλακών. Διαπιστώθηκε έτσι για πρώτη φορά η παρουσία της humanin σε καρωτιδικές αθηροσκληρωτικές πλάκες. Βρέθηκε ότι η έκφρασή της είναι μεγαλύτερη, περίπου διπλάσια, σε ασθενείς με συμπτωματική νόσο (ιστορικό ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου) σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός της απόπτωσης σε αυτές τις συμπτωματικές πλάκες είναι μεγαλύτερος (65). Η ευεργετική επίδραση της αναστολής της απόπτωσης στην αθηροσκλήρωση είναι αμφιλεγόμενη. Η απόπτωση μπορεί να βοηθήσει στην καταστολή της εξέλιξης των πρώιμων πλακών, μέσω της απόπτωσης των μακροφάγων στα αρχικά στάδια της αθηρωματικής νόσου. Αντίθετα, σε προχωρημένα στάδια της νόσου, η απόπτωση των μακροφάγων ευθύνεται για την ανάπτυξη του νεκρωτικού πυρήνα, ενός σημαντικού παράγοντα που συμβάλλει στην αστάθεια των αθηρωματικών πλακών (66). Με δεδομένο αυτές τις παρατηρήσεις, η humanin αποτελεί ένα ενδογενώς εκφραζόμενο πεπτίδιο στην αρτηριοσκληρωτική πλάκα, που φαίνεται να έχει κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες με έναν ξεχωριστό ρόλο στην καταστολή της απόπτωσης (65).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η έκφραση της humanin στο ενδοθήλιο και στις αθηρωματικές πλάκες, και η ικανότητά της να ανακουφίζει τα καταστροφικά αποτελέσματα της

ROS-επαγόμενης ενδοθηλιακής βλάβης, είναι καλά τεκμηριωμένη. Διαφαίνεται, επομένως, μια θετική δομική και λειτουργική επίδραση της humanin στο αγγειακό σύστημα. Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που αποτελεί προάγγελο της αθηροσκλήρυνσης (59). Συνεπώς, μεταβολές των επιπέδων της humanin στον άνθρωπο, θα έπρεπε να σχετίζονται με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Πράγματι, σε ασθενείς με παρουσία βλάβης των στεφανιαίων αγγείων, τα επίπεδα της humanin ήταν χαμηλότερα από εκείνων με φυσιολογικό ενδοθήλιο. Άρα, τα κυκλοφορούντα επίπεδα humanin συνδέονται με βελτίωση της μικροαγγειοπάθειας. Αυτό το εύρημα που συνδέει έναν αντι-αποπτωτικό παράγοντα με τη διατήρηση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, θα μπορούσε, ενδεχομένως, να κρύβει έναν νέο μηχανισμό που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας (61). Με την παραπάνω μελέτη περιγράφηκε και μία άμεση συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των λευκοκυττάρων και της ενδοθηλιακής λειτουργίας στα στεφανιαία αγγεία, καθώς και μια ταυτόχρονη θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της humanin, του BMI και του αριθμού των κυκλοφορούντων μονοκύτταρων και λεμφοκυττάρων. Αυτή η αντανακλαστική αύξηση θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μια προστατευτική απάντηση σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου για αθηροσκλήρωση. Συμπερασματικά, υπάρχει μια δυνητικά διαγνωστική ή και θεραπευτική σχέση μεταξύ των χαμηλών ενδογενών κυκλοφορούντων επιπέδων της humanin και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στον άνθρωπο. Δεν είναι απίθανο, η humanin να χρησιμεύει στη σταθεροποίηση του ενδοθηλίου, αναιρώντας τις ανεπιθύμητες συνέπειες της αγγειακής φλεγμονής (61).

Συνδυάζοντας τα στοιχεία που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες, συμπεραίνεται ότι τα αυξημένα επίπεδα της humanin, που βρέθηκαν σε αθηρωματικές πλάκες, αποτελούν προστατευτική απάντηση στο στρες και ότι η humanin θα μπορούσε να προστατεύει έναντι του οξειδωτικού στρες (6).

### 3. ΥΠΕΡΤΑΣΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΥΗΣΗΣ

Η υπέρταση είναι μια κοινή ιατρική διαταραχή που επηρεάζει το 20-30% των ενηλίκων στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι υπερτασικές διαταραχές της κύησης κατατάσσονται ανάμεσα στις κύριες αιτίες μητρικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Περίπου το 15% των μητρικών θανάτων οφείλονται στην υπέρταση, καθιστώντας την δεύτερη κύρια αιτία μητρικής θνησιμότητας στις Η.Π.Α.. Η σοβαρή υπέρταση αυξάνει τον κίνδυνο της μητέρας για καρδιακή προσβολή, καρδιακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια και νεφρική ανεπάρκεια. Το έμβρυο και το νεογνό, επίσης, βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών, όπως η κακή οξυγόνωση του πλακούντα, η καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου, ο πρόωρος τοκετός, η αποκόλληση πλακούντα, ο ενδομήτριος και ο νεογνικός θάνατος. Η υπέρταση ορίζεται ως η παρατεταμένη αρτηριακή πίεση που είναι υψηλότερη από 140/90 mmHg. Στις μη έγκυες γυναίκες, η ιδιοπαθής υπέρταση αντιπροσωπεύει το 90% των περιπτώσεων (67).

Οι υπερτασικές διαταραχές στην εγκυμοσύνη περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών οντοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της προεκλαμψίας-εκλαμψίας, της προεκλαμψίας που εμφανίζεται σε έδαφος χρόνιας υπέρτασης και της υπέρτασης της κύησης. Εκτιμάται ότι το 10% των κυήσεων παγκοσμίως επηρεάζονται από υπέρταση, ενώ περίπου το ήμισυ όλων των υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης οφείλονται σε προεκλαμψία (68). Η υπέρταση της κύησης χαρακτηρίζεται από αυξημένη αρτηριακή πίεση που διαγνώστηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε ασθενείς χωρίς ενδείξεις πρωτεϊνουρίας (67). Σε αντίθεση με τις άλλες υπερτασικές διαταραχές της κύησης, η προεκλαμψία είναι μια πολυσυστηματική νόσος και εμφανίζεται στο 2-8% του συνόλου των κυήσεων, ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί ένα σύνδρομο που ορίζεται από την αιφνίδια εμφάνιση υπέρτασης στο δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης και συνοδεύεται, συνήθως, από πρωτεϊνουρία (69). Η αντιμετώπιση της προεκλαμψίας διαφέρει από εκείνη των άλλων μορφών υπέρτασης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, η ήπια έως μέτριας βαρύτητας χρόνια υπέρταση έχει μικρή επίδραση στην έκβαση της εγκυμοσύνης, ενώ η σοβαρή υπέρταση αυξάνει τον κίνδυνο για τη μητέρα και το έμβρυο. Ο υψηλότερος κίνδυνος συνδέεται με την προεκλαμψία ή εκλαμψία. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να γίνει διάκριση της προεκλαμψίας από άλλες μορφές υπέρτασης που μπορεί να επιπλέξουν την εγκυμοσύνη (67).

### 3.1. Προεκλαμψία

Η προεκλαμψία εμφανίζεται στο 2-8% του συνόλου των κυήσεων, με αυξημένη συχνότητα μεταξύ των νέων, άτοκων γυναικών. Οι κόρες των γυναικών με σοβαρή προεκλαμψία παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο (67). Η προεκλαμψία αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες μητρικής και νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Συνδέεται με την αποκόλληση του πλακούντα, τον πρόωρο τοκετό, την καθυστέρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και τον ενδομήτριο θάνατο. Οι περισσότερες από τις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις φαίνεται να υποχωρούν μετά τον τοκετό (70). Για την ανάπτυξη του συνδρόμου ενοχοποιούνται πολλοί παράγοντες, όπως η γενετική προδιάθεση, η ηλικία, η παχυσαρκία, η προϋπάρχουσα χρόνια υπέρταση, η χρόνια νεφρική νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και η θρομβοφιλία (71). Λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου, τα αίτια και η παθογένεια δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, με αποτέλεσμα την αποτυχία ανάπτυξης ειδικών στρατηγικών πληθυσμιακού ελέγχου, πρόληψης και θεραπείας (71). Παρόλα αυτά, η κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας, καθώς και ο τρόπος αντιμετώπισής της, έχουν βελτιωθεί σημαντικά (69).

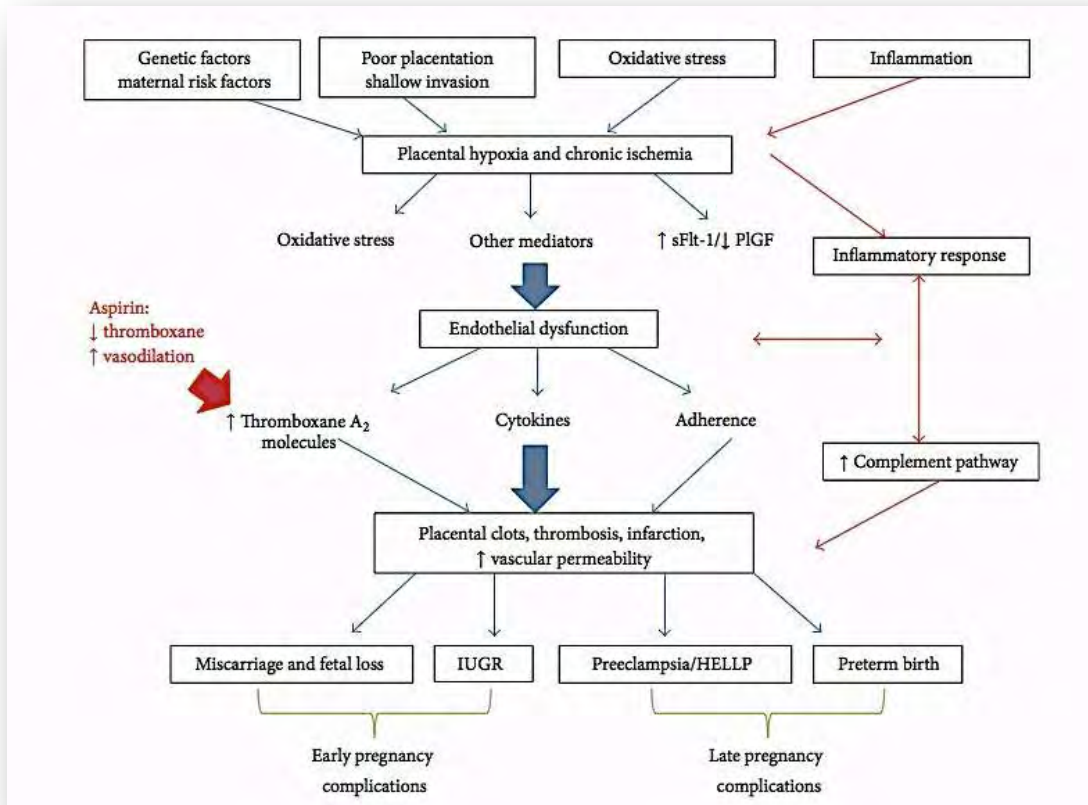
Η προεκλαμψία (PE) αποτελεί την συχνότερη νεφρική επιπλοκή που συναντάται στην κύηση και χαρακτηρίζεται από υπέρταση, πρωτεϊνουρία και οίδημα (72–76). Εμφανίζεται συνήθως στο τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, κατά τη διάρκεια της πρώτης εγκυμοσύνης ή σε δίδυμες κυήσεις. Η PE, όταν μένει χωρίς θεραπεία, οδεύει προς μία πιο σοβαρή κατάσταση, γνωστή ως εκλαμψία και εξακολουθεί να είναι μία από τις κύριες αιτίες της μητρικής και νεογνικής θνησιμότητας, ενώ μετά τον τοκετό συνήθως βελτιώνεται (77). Είναι γνωστό ότι οφείλεται στην διαταραγμένη αγγειακή ανάπτυξη του πλακούντα, η οποία απελευθερώνει ευρέως αντι-αγγειογόνους παράγοντες μέσα στην μητρική κυκλοφορία και προκαλεί μια συστηματική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μικροαγγειοπάθεια. Η υποαιμάτωση και οι ισχαιμικές συνθήκες χαρακτηρίζουν τον παθολογικό πλακούντα (78,79). Σε επίπεδο νεφρών οι ενδοθηλιακές αυτές βλάβες οδηγούν σε σπειραματική ενδοθηλίωση, στην οποία τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος διογκώνονται, με αποτέλεσμα να χάνεται ο ενδοθηλιακός φραγμός, και σε πρωτεϊνουρία (2,72,80).

Από το 2009, η μόνη επιτυχής θεραπεία για την προεκλαμψία είναι ο τοκετός, ενώ δεν έχουν αναγνωριστεί οριστικές προληπτικές στρατηγικές. Ωστόσο, πολλές από τις πρόσφατες παρατηρήσεις που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου, παρέχουν ερεθίσματα για την ανάπτυξη των νέων θεραπειών (81). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η εκλαμψία αποτελεί επιπλοκή της PE, που δεν αντιμετωπίζεται, και η οποία ορίζεται από την παρουσία επιληπτικών

κρίσεων (73). Κλινικά ευρήματα της σοβαρής PE αποτελούν η παρουσία συστηματικής δυσλειτουργίας του ενδοθελίου και η μικροαγγειοπάθεια στο ήπαρ (αιμόλυση, αυξημένες ηπατικές δοκιμασίες και χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων, δηλαδή το σύνδρομο HELLP) και στα νεφρά (πρωτεϊνουρία) (2,82).

### **3.2. Η αιτιολογία της προεκλαμψίας και η πλακουντιακή ισχαιμία/ υποξία**

Παρόλο που έχουν γίνει πολλές υποθέσεις σχετικά με την παθογένεση της προεκλαμψίας, τα αίτια του συνδρόμου δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί. Φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενδογενών παραγόντων, που παράγονται από τον πλακούντα, και της ικανότητας του μητρικού οργανισμού να προσαρμόζεται στις αλλαγές που συμβαίνουν στην εγκυμοσύνη (83). Πρόκειται για μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μητροπλακουντιακή και μητρική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (69). Χαρακτηρίζεται, επιπλέον, από υπέρταση και αυξημένη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση, που πιθανώς ξεκινά από την εκτεταμένη ενδοθηλιακή βλάβη. Οι ασθενείς με προεκλαμψία παρουσιάζουν, επίσης, αυξημένο οξειδωτικό στρες, αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού και εμφανή στοιχεία δυσλιπιδαιμίας (84). Οι διαταραχές επομένως εμφανίζονται σε δύο επίπεδα. Στο επίπεδο του πλακούντα αναπτύσσεται παθολογική μητροπλακουντιακή κυκλοφορία και κατά συνέπεια πλακουντιακή δυσλειτουργία, λόγω του οξειδωτικού στρες, ενώ στο επίπεδο της συστηματικής κυκλοφορίας της μητέρας επέρχεται εκτεταμένη ενδοθηλιακή βλάβη, λόγω της προκαλούμενης έντονης φλεγμονώδους απάντησης (83). Η ανεπάρκεια, επομένως, του πλακούντα συνδέεται αιτιολογικά με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, ενώ το οξειδωτικό στρες συνοδεύει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται σε γυναίκες με προεκλαμψία και με άλλες υπερτασικές διαταραχές (85). Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και στην απόπτωση, αρκετές μελέτες αναδεικνύουν τον ρόλο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στην παθογένεση της προεκλαμψίας (69,86,87). Συνολικά, η έναρξη της προεκλαμψίας εμπεριέχει την ανώμαλη τροφοβλαστική διείδυση, την φλεγμονή, την απορρύθμιση των αγγειογενετικών παραγόντων και την ισχαιμία. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μεταξύ των άλλων οδηγεί σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, σε αύξηση των επιπέδων θρομβοξάνης και στην ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού (εικόνα 7) (88).



**Εικόνα 7.** Ο μηχανισμός της προεκλαμψίας (88). (Ανατύπωση από: Schramm AM, Clowse MEB. Aspirin for prevention of preeclampsia in lupus pregnancy. Autoimmune Dis. 2014)

### 3.2.1. Η φυσιολογία της κύησης

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη συνδέεται με μειωμένη μητρική ευαισθησία στα ενδογενή αγγειοσυσπαστικά. Στα πρώτο μισό της εγκυμοσύνης, η επίδραση αυτή οδηγεί στην αύξηση του μητρικού ενδοαγγειακού χώρου και στην μείωση της αρτηριακής πίεσης, με τις ελάχιστες τιμές να παρατηρούνται στο μέσο της κύησης. Η συνεχιζόμενη επέκταση του ενδοαγγειακού όγκου οδηγεί σε μια σταδιακή αύξηση της πίεσης του αίματος σε επίπεδα προ-εγκυμοσύνης. Οι γυναίκες που προορίζονται να αναπτύξουν προεκλαμψία δεν εμφανίζουν την φυσιολογική αντίσταση στα ενδογενή αγγειοσυσπαστικά. Ως αποτέλεσμα, η αύξηση του ενδοαγγειακού χώρου δεν λαμβάνει χώρα, και η αναμενόμενη πτώση της αρτηριακής πίεσης του αίματος κατά την διάρκεια του πρώτου ήμισυ της εγκυμοσύνης απουσιάζει ή είναι εξασθενημένη. Παρά τα φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα ΑΠ του αίματος, ο ενδοαγγειακή όγκος μειώνεται (67).

### **3.2.2. Παθογένεση**

Η πρώτη δεκαετία αυτής της χιλιετίας γνώρισε μεγάλη πρόοδο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας. Ιστορικά είναι γνωστή ως η "νόσος των θεωριών". Το μυστήριο σχετικά με την παθογένεση της προεκλαμψίας έχει αρχίσει να αποκαλύπτεται με μια βασική ανακάλυψη σχετικά με τις αλλαγές στους πλακουντιακούς αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες. Αυτοί οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο sFlt1 και η διαλυτή ενδογλίνη, προκαλούν συστημική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, με αποτέλεσμα την υπέρταση, την πρωτεϊνουρία και τις άλλες συστηματικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας (89,90). Η μοριακή βάση της πλακουντικής απορρύθμισης αυτών των παθογόνων παραγόντων παραμένει άγνωστη, ενώ ο ρόλος των αγγειογενετικών πρωτεϊνών στα πρώτα στάδια της αγγειακής ανάπτυξης του πλακούντα και της τροφοβλάστικής διεϊσόδου μόλις αρχίζει να διερευνάται. Η υποξία είναι πιθανό να αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή. Επιπλέον, ο άξονας ρενίνης-αλδοστερόνης-αγγειοτενσίνης II, το εκτεταμένο οξειδωτικό στρες, τα προϊόντα αποδόμησης της συγκυτιοτροφοβλάστης, η ανεπαρκής ανοσολογική προσαρμογή και η γενετική προδιάθεση, μπορεί επίσης να έχουν ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας, μέσω της παρατηρούμενης ανώμαλης πλακουντοποίησης.

### **3.2.3. Ο ρόλος του πλακούντα**

Ο πλακούντας είναι κεντρικής σημασίας για την προεκλαμψία. Η προεκλαμψία εμφανίζεται μόνο σε παρουσία πλακούντα και σχεδόν πάντα υποχωρεί μετά τον τοκετό του. Η σοβαρή προεκλαμψία σχετίζεται με παθολογοανατομικές ενδείξεις υποαιμάτωσης και υποξίας του πλακούντα. Τα ευρήματα περιλαμβάνουν την οξεία αθηρωμάτωση, τις βλάβες διάχυτης αγγειακής απόφραξης (εναπόθεση ινώδους, πάχυνση του έσω χιτώνα, νέκρωση, αθηροσκλήρωση) και τις ενδοθηλιακές βλάβες (91). Τα πλακουντικά έμφρακτα, που πιθανόν να οφείλονται σε απόφραξη των σπειροειδών αρτηριών, αποτελούν επίσης συνήθη ευρήματα. Τα παθολογικά Doppler των μητριάων αρτηριών, που σχετίζονται με μειωμένη αιμάτωση του πλακούντα, έχουν επίσης παρατηρηθεί πριν από την κλινική εκδήλωση της προεκλαμψίας (92). Η σοβαρότητα της παθολογοανατομικής εικόνας του πλακούντα φαίνεται να συσχετίζεται με την σοβαρότητα της κλινικής νόσου, παρόλο που αυτά τα ευρήματα δεν ισχύουν πάντα καθολικά (81,91).

### **3.2.4. Η ανώμαλη πλακουντοποίηση**

Λόγω της αναγκαιότητας της ύπαρξης του πλακούντα στην προεκλαμψία, υπήρξε εξονυχιστικός έλεγχος για το πώς οι ανωμαλίες στην αγγειακή αναδιαμόρφωση σε επίπεδο πλακούντα, οι

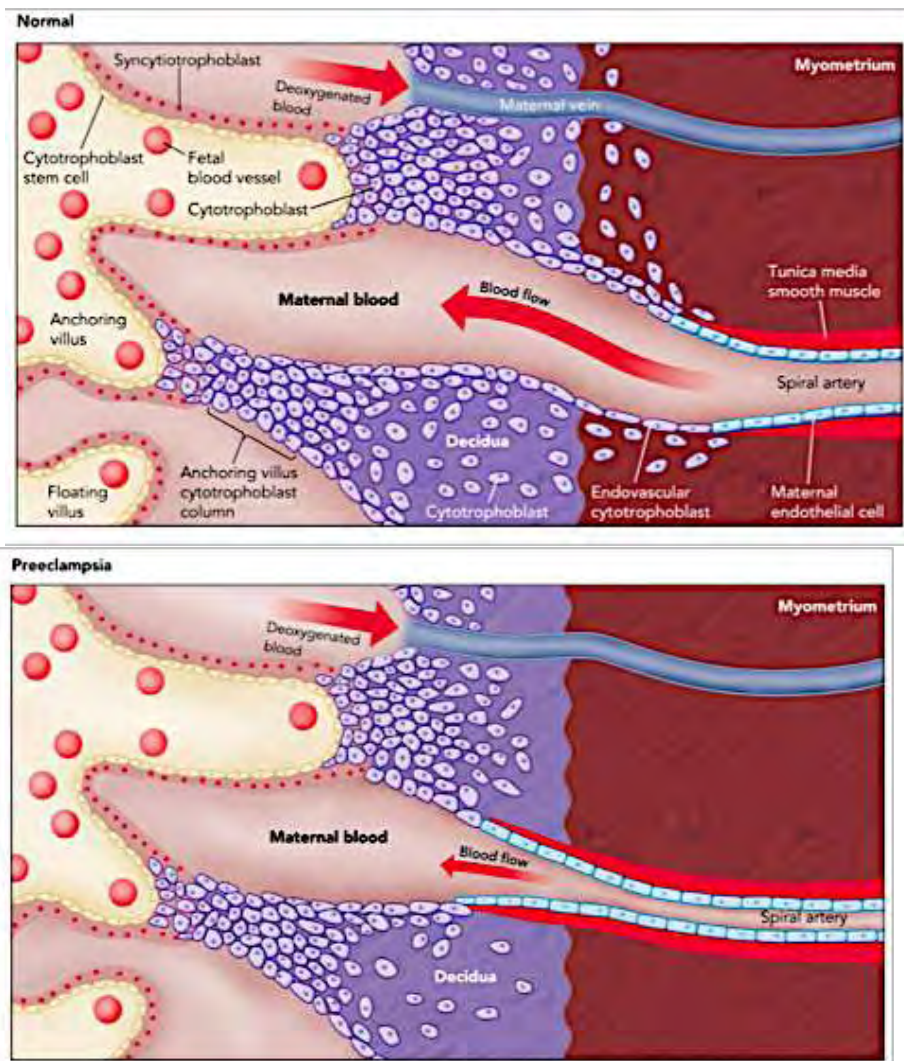


οποίες συμβαίνουν νωρίς, μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου (81).

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του πλακούντα, κυτταροτροφοβλάστες εμβρυϊκής προέλευσης διεισδύουν στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας, στον φθαρτό και στο μυομήτριο. Αυτές οι διεισδυτικές κυτταροτροφοβλάστες αντικαθιστούν το ενδοθηλιακό στρώμα των σπειροειδών μητρικών αρτηριών, μετατρέποντάς τες από μικρά, υψηλής αντίστασης αγγεία σε αγγεία αυξημένης χωρητικότητας και παροχής (εικόνα 8), ικανά να εξασφαλίζουν επαρκή αιμάτωση στον πλακούντα, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί η ανάπτυξη του εμβρύου. Στην προεκλαμψία η μετατροπή αυτή δεν είναι πλήρης. Η κυτταροτροφοβλαστική διείσδυση των σπειροειδών αρτηριών περιορίζεται στον επιφανειακό φθαρτό, με αποτέλεσμα τα τμήματά τους στο μυομήτριο να παραμένουν στενά (εικόνα 9) (93). Ο Fisher και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι στην φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα οι κυτταροτροφοβλάστες προσλαμβάνουν έναν ενδοθηλιακό φαινότυπο, μια διαδικασία που ονομάζεται ψευδοαγγειογένεση (pseudovasculogenesis) (94), ή αγγειακός μιμητισμός. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μειώνεται η έκφραση των μορίων προσκόλλησης, χαρακτηριστικό της καταγωγής τους από τα επιθηλιακά κύτταρα και υιοθετείται ένας φαινότυπος προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην προεκλαμψία, η κυτταροτροφοβλάστη δεν υφίσταται αυτή την αλλαγή των μορίων κυτταρικής επιφάνειας και ως εκ τούτου δεν είναι σε θέση να εισβάλει επαρκώς στις σπειροειδείς αρτηρίες του μυομητρίου (81,95).



**Εικόνα 8.** Στον φυσιολογικό πλακούντα 3<sup>ου</sup> τριμήνου η τροφοβλάστη διεισδύει στον φθαρτό μέχρι τα τοιχώματα των σπειροειδών αρτηριών, με σκοπό να αντικαταστήσει το ενδοθήλιο και τον μυϊκό χιτώνα. Η αναδιαμόρφωση αυτή δημιουργεί διευρυμένα αγγεία χαμηλής αντίστασης. Στην προεκλαμψία, αντίθετα, η διείσδυση αυτή είναι ανεπαρκής και ατελής (96). (Ανατύπωση από: Cunningham, Leveno, Bloom, Hauth, Rouse S. Williams Obstetrics. 23rd ed. Mc Graw Hill. 2010)



**Εικόνα 9. Ανώμαλη πλακουντοποίηση στην προεκλαμψία.** Στην φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα, οι κυτταροτροφοβλάστες εμβρυϊκής προέλευσης διεισδύουν στις μητριάιες σπειροειδείς αρτηρίες, μετασχηματίζοντάς τες από αγγεία μικρού διαμετρήματος και υψηλής αντίστασης σε αγγεία υψηλού διαμετρήματος και χαμηλής αντίστασης, ικανά να παρέχουν επαρκή αιμάτωση στον πλακούντα για να διατηρηθεί η ανάπτυξη του εμβρύου. Κατά τη διαδικασία της αγγειακής διείσδυσης, οι κυτταροτροφοβλάστες διαφοροποιούνται από έναν επιθηλιακό φαινότυπο σε έναν ενδοθηλιακό φαινότυπο, μια διαδικασία που αναφέρεται ως "pseudovasculogenesis" ή "αγγειακός μιμητισμός" (επάνω). Στην προεκλαμψία, οι κυτταροτροφοβλάστες αποτυγχάνουν να υιοθετήσουν έναν διεισδυτικό ενδοθηλιακό φαινότυπο. Αντ' αυτού, η διείσδυση των σπειροειδών αρτηριών είναι ρηχή, με αποτέλεσμα να παραμένουν αγγεία μικρού διαμετρήματος και υψηλής αντίστασης (κάτω) (81). (Ανατύπωση από: Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiol.* 2009;24:147–58)

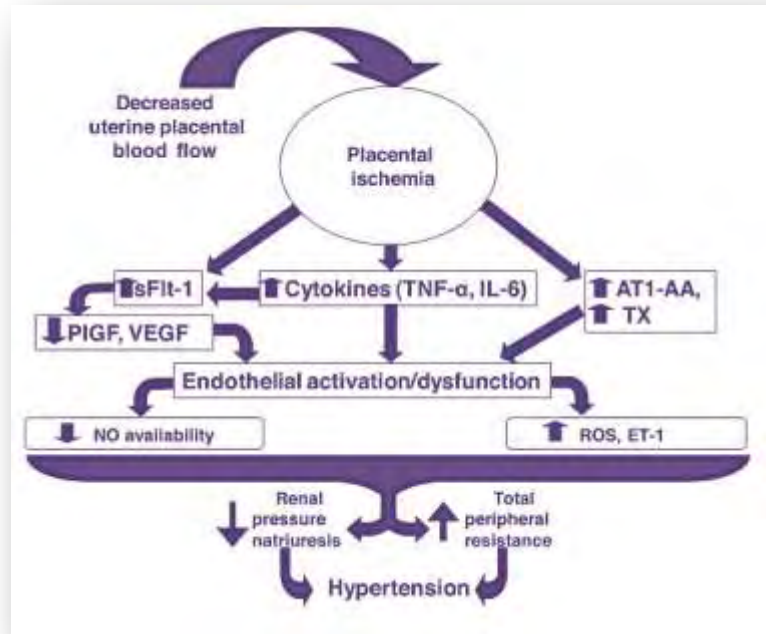
### 3.2.5. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες

Παρά το γεγονός ότι η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεν έχει καθοριστεί πλήρως, η πλακουντιακή ισχαιμία/ υποξία θεωρείται ευρέως ως ένας βασικός παράγοντας (78,97). Η ανεπαρκής τροφοβλαστική διείσδυση που οδηγεί σε ατελή αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας, θεωρείται ότι είναι μια από τις κύριες αιτίες ισχαιμίας του πλακούντα

(97). Έτσι, η κακή αιμάτωση και κατά συνέπεια ο υποξικός πλακούντας, πιστεύεται ότι συνθέτει και απελευθερώνει αυξημένες ποσότητες αγγειοδραστικών παραγόντων, όπως soluble fms- like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), κυτοκίνες και ενδεχομένως αυτοαντισώματα έναντι του τύπου 1 υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (ANG II) (AT1-AA) (89,97–100). Στην εικόνα 10 απεικονίζεται ένα μοντέλο με το οποίο τα μόρια αυτά, καθώς και άλλα, πιστεύεται ότι επάγουν μια εκτεταμένη ενεργοποίηση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων του νεφρού της μητέρας, καθώς και άλλων οργάνων που τελικά οδηγεί σε υπέρταση (101).

Πιστεύεται ότι οι αγγειογόνοι αυτοί παράγοντες είναι σημαντικοί στην ρύθμιση της αγγειακής ανάπτυξης του πλακούντα (90). Οι Flt1 (VEGFR - 1), VEGFR - 2, Tie - 1 και Tie - 2 είναι ουσιώδεις για την φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη του πλακούντα. Μεταβολές σε αυτά τα μονοπάτια, στις αρχές της κύησης, μπορεί να συμβάλουν στην ανεπαρκή διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης, όπως παρατηρείται στους πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία. Ποντίκια με μεταλλάξεις των παραπάνω γονιδίων παρουσιάζουν ελαττωματική αγγειογένεση στον πλακούντα και πρόωμη εμβρυϊκή θνησιμότητα. Η διηθητική κυτταροτροφοβλάστη εκφράζει τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (PlGF) και τον VEGFR - 1 (Flt- 1). Η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών μεταβάλλεται στην προεκλαμψία (81,102).

Ο sFlt -1 είναι ίσως το πιο σημαντικό μόριο, ικανό να διαδραματίσει καίριο ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Αρκετές μελέτες (103,104) υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο ισχαιμικός πλακούντας συμβάλλει στην δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων του μητρικού αγγειακού συστήματος, μεταβάλλοντας την ισορροπία μεταξύ των κυκλοφορούντων επιπέδων των αγγειογενετικών/ αντιαγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF- vascular endothelial growth factor), ο πλακουντικός αυξητικός παράγοντας (PlGF- placental growth factor) και ο sFlt - 1. Αν και πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η συγκέντρωση του sFlt - 1 στον ορό μπορεί να προμηνύει την κλινική έναρξη των συμπτωμάτων της προεκλαμψίας (103,105–107), διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η υποξία και η κακή αιμάτωση του πλακούντα μπορούν να προκαλέσουν την ανισορροπία μεταξύ των αυξητικών παραγόντων (108,109). Παρόλα αυτά, παραμένει ασαφές εάν η μειωμένη αιμάτωση του πλακούντα προκαλεί την εμφάνιση των συμπτωμάτων της προεκλαμψίας, όπως η υπέρταση, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η αυξημένη sFlt- 1 ή αν η ανεπαρκής ανάπτυξη του πλακούντα εμφανίζεται αρχικά και ακολουθείται από μια παθολογική αύξηση της έκφρασης και έκκρισης του sFlt - 1 (101,104).



**Εικόνα 10.** Απεικόνιση των μονοπατιών με τα οποία η ελαττωμένη πίεση διαπότισης της μήτρας (RUPP- reduced uterine perfusion pressure) και η πλακουντιακή ισχαιμία μπορεί να οδηγήσουν σε ενδοθηλιακή και καρδιαγγειακή δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η πλακουντιακή ισχαιμία οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση sFlt-1, TNF-α και IL-6, AT1-AA και θρομβοξάνης (TX). Οι αυξήσεις που παρατηρούνται σε αυτούς τους παράγοντες οδηγούν σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου από την μείωση της βιοδιαθεσιμότητας νιτρικού οξειδίου (NO) και την αύξηση των ROS και της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε διαταραγμένη νεφρική λειτουργία, αυξημένες ολικές περιφερικές αντιστάσεις (TPR- total peripheral resistance) και τελικά στην υπέρταση. PIGF- placental growth factor, πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (101). (Ανατύπωση από: Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedek M, Murphy SR, Granger JP, et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2008;294(2):H541–50)

Ο sFlt1 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την κυτταροτροφοβλαστική διείσδυση *in vitro* (102) και ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα του sFlt1 παραμένουν σχετικά χαμηλά στην αρχή της κύησης, ενώ αρχίζουν να αυξάνουν κατά το τρίτο τρίμηνο. Αυτό μπορεί να αντανακλά μια φυσιολογική αντι-αγγειογόνο τάση στο πλακουντικό περιβάλλον προς το τέλος της εγκυμοσύνης, που αντιστοιχεί στην ολοκλήρωση της φάσης αγγειογένεσης κατά την ανάπτυξη του πλακούντα. Μεταβολές σε αυτά τα αγγειογενετικά μονοπάτια στις αρχές της κύησης θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανεπαρκή διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στην προεκλαμψία, πυροδοτώντας έτσι έναν κύκλο συνεχούς διαταραχής της αγγειογόνου ισορροπίας. Ωστόσο, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει καμία οριστική απόδειξη για αυτήν την υπόθεση. Στο τρίτο τρίμηνο, η περίσσεια του πλακουντικού sFlt1 συσσωρεύεται στη μητρική κυκλοφορία, με συνέπειες στα τελικά όργανα- στόχους και αντανακλά τον βαθμό ισχαιμίας του πλακούντα.

Παρόμοια με τον sFlt1, τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ενδογλίνης, και το συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο της ενδογλίνης, διεγείρουν την ανάπτυξη και την μετανάστευση της τροφοβλάστης (110). Η ενδογλίνη (CD105) είναι ένας υποδοχέας του TGF-beta, που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ο TGF-beta 1 και/ ή ο TGF-beta 3 αναστέλλουν τη μετανάστευση και διείσδυση της τροφοβλάστης. Επομένως, είναι πιθανό η ενδογλίνη να μπορεί να επάγει αυτό το αποτέλεσμα (110). Ως εκ τούτου, η διαλυτή ενδογλίνη που παράγεται από τον πλακούντα μπορεί να αποτελεί έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό για τον περιορισμό των επιπτώσεων της συνδεδεμένης με την μεμβράνη ή της επιφανειακής ενδογλίνης. Στην προεκλαμψία, η υπερβολική παραγωγή επιφανειακής ενδογλίνης οδηγεί σε αυξημένη Seng στη μητρική κυκλοφορία. Η Seng μαζί με την sFlt1 πιθανόν να είναι υπεύθυνες για τη μητρική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τις κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας (81).

### **3.2.6. Φλεγμονώδης διεργασία**

Η συστηματική φλεγμονή στην μητέρα, επίσης, εμπλέκεται με την παθογένεση της προεκλαμψίας. Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων προ- φλεγμονωδών μεσολαβητών IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  και MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στις εγκυμοσύνες με προεκλαμψία, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κηύσεις. Στους προεκλαμπτικούς πλακούντες παρατηρείται λευκοκυτταρική διήθηση, συνοδευόμενη από την μη ελεγχόμενη αυξημένη ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος συνδέει την φλεγμονή με την ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού. Η ελαττωμένη αιμάτωση του πλακούντα οδηγεί σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και της πήξης, οδηγώντας σε μια ανισορροπία των αγγειοδραστικών προσταγλανιδών. Η αναλογία μεταξύ των προσταγλανιδών/ θρομβοξάνης και προστακυκλίνης ρυθμίζει την αγγειακή αιματική ροή με την θρομβοξάνη A<sub>2</sub> να δρα ως αγγειοσυσπαστικό και ως ενεργοποιητής της συσώρευσης των αιμοπεταλίων, ενώ η προστακυκλίνη να εμφανίζει αντίθετη δράση. Η αύξηση των επιπέδων της θρομβοξάνης και η μείωση των επιπέδων της προστακυκλίνης σχετίζονται με τα έμφρακτα και την θρομβωτική αγγειοπάθεια, καταστάσεις που χαρακτηρίζουν τον προεκλαμπτικό πλακούντα (88).

Η συστηματική φλεγμονή οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο, μέσω της αθηροσκλήρυνσης και των αλλαγών που παρατηρούνται στα αγγεία. Αλλαγές που προκαλούνται από την μεταβολή στα αγγειακά μόρια προσκόλλησης, στην αυξημένη διαβατότητα των αγγείων, στην απώλεια των αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων και στην μειωμένη παραγωγή αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, καθώς και στην έκφραση της θρομβομοντουλίνης. Η θρομβομοντουλίνη περιορίζει την συσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση του

συμπληρώματος. Η παρουσία όμως προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών μειώνει τα επίπεδα της θρομβομοντουλίνης ενώ αυξάνει τα επίπεδα των παραγόντων που ενεργοποιούν την πήξη (88).

### **3.2.7. Γενετικοί παράγοντες**

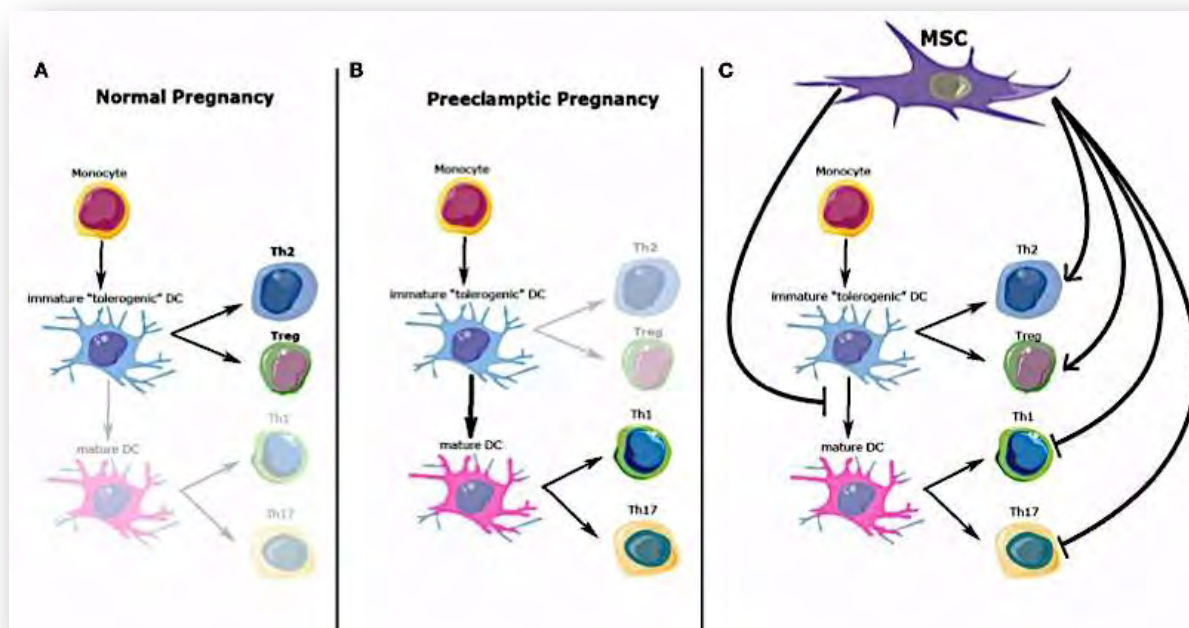
Η γενετική προδιάθεση της προεκλαμψίας είναι γνωστή από παλιά. Η εμφάνιση της προεκλαμψίας είναι αυξημένη σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Για το λόγο αυτό υπάρχει εκτεταμένη έρευνα σχετικά με την συνεισφορά των γονιδίων στην παθογένεση της νόσου. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση διαπιστώθηκε η ύπαρξη μεγαλύτερου κινδύνου ανάπτυξης σοβαρής προεκλαμψίας σε γυναίκες που παρουσιάζουν τον rs6025 πολυμορφισμό του γονιδίου του παράγοντα V (F5), την μετάλλαξη G20210A του γονιδίου του πηκτικού παράγοντα II (thrombin) (F2), τον πολυμορφισμό rs1137100 του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης (leptin receptor gene LEPR) και τις μεταλλάξεις στην ομάδα των θρομβοφιλικών γονιδίων. Σημειώνεται ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα- ανάλυση (111).

### **3.2.8. Ανοσολογικοί παράγοντες**

Πολλές θεωρίες έχουν προταθεί για την εξήγηση της ανώμαλης τροφοβλαστικής διείσδυσης που παρατηρείται στην αρχή της εγκυμοσύνης και σχετίζεται με την προεκλαμψία. Πολλές από αυτές υποστηρίζουν ότι οφείλεται σε μια τροποποιημένη απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας ή σε μια ελαττωματική ανάπτυξη ανοσολογικής ανοχής στο κατά ήμισυ ξένο έμβρυο. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες ενισχύουν την άποψη της συμμετοχής του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας. Στην προεκλαμψία παρατηρείται μια αυξημένη ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων. Τα μονοκύτταρα αυτά συνθέτουν μεγάλες ποσότητες προφλεγμονωδών κυττοκινών, όπως IL-1b, IL-6 και IL-8. Επιπλέον, τα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T- λεμφοκύτταρα μαζί με τα NK (natural killer cells) και τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells- DCs) φαίνεται να αντιδρούν διαφορετικά στην προεκλαμψία συγκριτικά με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας, αποτελεί η ανισορροπία μεταξύ των Th1 και Th2 λεμφοκυττάρων. Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία των Th2, τα οποία ενισχύουν την ανοσοανοχή προκειμένου να μην απορριφθεί το έμβρυο. Από την άλλη πλευρά, οι εγκυμοσύνες με προεκλαμψία χαρακτηρίζονται από μια προφλεγμονώδη κατάσταση με την επικράτηση των Th1 λεμφοκυττάρων. Παρόλα αυτά η Th1/Th2 ανισορροπία από μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως τις μεταβολές που παρατηρούνται στην προεκλαμψία. Για το λόγο αυτό νέες μελέτες περιγράφουν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στην

προεκλαμψία, εισάγοντας τα Treg και Th17 λεμφοκύτταρα. Η θετική ρύθμιση της Th17 ανοσίας σχετίζεται με την ενεργοποίηση της Th1 απάντησης στην προεκλαμψία. Τα περιφερικά Treg πρέπει να συναντήσουν αντιγόνα που παρουσιάζονται σε αυτά από τα 'tolerogenic' DCs, προκειμένου να φτάσουν σε λειτουργική ωριμότητα και να εκφράσουν τα κατασταλτικά τους αποτελέσματα. Τα tolerogenic DCs χαρακτηρίζονται από τον ανώριμο και ημι-ώριμο φαινότυπο και μόνο αυτά έχουν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά που επάγουν την ανοσοκατασταλτική λειτουργία των Treg κυττάρων. Ένας σημαντικός κυτταρικός τύπος που επάγει και συντηρεί τον φαινότυπο αυτό των DCs, είναι τα MSC (mesenchymal stem cells). Τα MSC κύτταρα μπορούν να τροποποιούν την συμπεριφορά και την έκκριση των κυττοκινών, όλων των κυττάρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως και εμπλέκονται στην ανάπτυξη της έμβρυο-μητρικής ανοχής. Με την παρατήρηση αυτή προτείνεται ένας πιθανός ρόλος των MSC στη ρύθμιση της τροφοβλαστικής διείσδυσης και κατά συνέπεια στην ανώμαλη πλακουντιοποίηση που παρατηρείται στην προεκλαμψία (εικόνα 11) (112).



**Εικόνα 11.** Ο πιθανός ανοσοτροποποιητικός ρόλος των MSC στα ανοσοποιητικά κύτταρα που εμπλέκονται στην προεκλαμψία και στις φυσιολογικές κύσεις. (A) Η φυσιολογική εγκυμοσύνη αποτελεί μια ανοσιακή κατάσταση τύπου Th2, όπου τα Th2 CD4<sup>+</sup> και Treg κύτταρα κυριαρχούν. (B) Αντίθετα η προεκλαμψία θεωρείται ως μια προφλεγμονώδης κατάσταση με τα Th1/ Th17 κύτταρα να κυριαρχούν. (C) Πιθανές δράσεις των MSC στο ανοσοποιητικό σύστημα σε φυσιολογικές και προεκλαμπτικές κύσεις. Τα MSC αναστέλλουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων διατηρώντας τον tolerogenic φαινότυπο των DCs. Τα MSC αναστέλλουν τη λειτουργία και ανάπτυξη των Th1/Th17, ενώ προωθούν τη διαφοροποίηση των Treg και Th2 και την έκκριση των κυττοκινών. Όλες αυτές οι μεταβολές ευνοούν τον Th2/Treg φαινότυπο. DCs (dendritic cells), Th2 (T-helper 2), Th1 (T-helper 1), Th17 (T-helper 17), Treg (T-regulators cells) (112). (Ανατύπωση από : Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Khoury M, Illanes SE. Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol.* 2014;5:244)

### 3.3. Κλινική εικόνα

Η διάγνωση της προεκλαμψίας βασίζεται σε δύο κριτήρια. Την αυξημένη αρτηριακή πίεση της μητέρας (συστολική  $\geq 140$  mm Hg ή διαστολική  $\geq 90$  mm Hg σε δύο μετρήσεις με διαφορά έξι ωρών) και την πρωτεϊνουρία ( $\geq 300$  mg σε δείγμα ούρων 24ώρου). Εκτός από τα κλασικά ευρήματα της υπέρτασης και της πρωτεϊνουρίας, οι γυναίκες με προεκλαμψία μπορεί να παραπονούνται για διαταραχές της όρασης και πόνο στο επιγάστριο ή στο δεξιό άνω τεταρτημόριο. Κατά την κλινική εξέταση παρατηρείται συχνά κλόνος με έντονο το αντανακλαστικό της επιγονατίδας και σπασμό. Στα εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνονται τα



αυξημένα επίπεδα αιματοκρίτη, γαλακτικής αφυδρογονάσης, τρανσαμινασών και ουρικού οξέος, καθώς και η θρομβοπενία. Τα αυξημένα επίπεδα προϊόντων αποδόμησης του ινώδους, η υποϊνωδογοναιμία και η παράταση του χρόνου προθρομβίνης και του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης, παρατηρούνται μόνο σε περιπτώσεις που η προεκλαμψία επιπλέκεται από αποκόλληση πλακούντα ή πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων και κατά συνέπεια διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (DIC) (67).

Η προεκλαμψία ταξινομείται σε ήπια ή σοβαρή, με βάση το βαθμό της υπέρτασης και της πρωτεϊνουρίας, καθώς και την παρουσία άλλων ευρημάτων. Το σύνδρομο HELLP αποτελεί μια παραλλαγή της προεκλαμψίας, που χαρακτηρίζεται από αιμόλυση, αυξημένα ηπατικά ένζυμα, και χαμηλά αιμοπετάλια. Εμφανίζεται στο 10% των περιπτώσεων σοβαρής προεκλαμψίας και στο 50% των περιπτώσεων της εκλαμψίας. Ο πόνος στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, η ναυτία, ο έμετος, η αδιαθεσία αποτελούν κοινά συμπτώματα. Η υπέρταση και η πρωτεϊνουρία έχουν ποικίλη εμφάνιση. Το χαρακτηριστικό της διαταραχής αυτής είναι η μικροαγγειακή αιμόλυση που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της γαλακτικής αφυδρογονάσης και σε κατακερματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό επίχρισμα. Τα αυξημένα επίπεδα των τρανσαμινασών και η θρομβοπενία είναι παρόντα, ενώ η DIC μπορεί να είναι εμφανής. Η αντιμετώπιση είναι παρόμοια με εκείνη της σοβαρής προεκλαμψίας (67).

### **3.4. Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της προεκλαμψίας**

Η PE αποτελεί μια διαταραχή της εγκυμοσύνης που επηρεάζει διάφορα όργανα. Η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η πρωτεϊνουρία, η παχυσαρκία, το οικογενειακό ιστορικό, η ατοκία, η πολύδυμη κύηση, η χρήση αντισυλληπτικών, η ηλικία των γυναικών (> 40 ετών) και η θρομβωτική αγγειακή νόσος συμβάλλουν ως παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση της PE (113). Η πρωτοεμφανιζόμενη υπέρταση (συστολική  $\geq 140$  mmHg) παρουσιάζεται μετά από την 20η εβδομάδα κύησης σε ασυμπτωματικές γυναίκες. Διάφορα άλλα συμπτώματα, όπως οίδημα, νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική ανεπάρκεια και σύνδρομο HELLP, επιδεινώνουν επίσης την κλινική εικόνα (114). Ανάλογα με την πρόωρη ή καθυστερημένη εμφάνιση της νόσου, μπορεί να συνοδεύεται από ήπια ή πιο σοβαρά συμπτώματα. Η διαταραγμένη ηπατική λειτουργία, η θρομβοπενία και το σύνδρομο HELLP μπορούν να εξελιχθούν σε εκλαμψία (2,115,116).

Οι άτοκες γυναίκες (που συλλαμβάνουν με τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής) και οι γυναίκες που ήδη πάσχουν από αυτοάνοσες ασθένειες μπορεί να παρουσιάσουν διαταραγμένο μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα στην έναρξη της κύησης (117,118). Αντίθετα, οι γυναίκες με μεταβολική, νεφρική ή αγγειακή νόσο βρίσκονται σε ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο για επιβάρυνση με PE. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν επίσης να συμβάλουν στην

εμφάνιση της νόσου, π.χ. σε εκείνες τις γυναίκες που ζουν σε μεγάλο υψόμετρο και αντιμετωπίζουν υποξικές συνθήκες (2,119).

Σε μία μελέτη, ο Cunningham και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν 37 έγκυες γυναίκες και ανέφεραν ότι εμφανίστηκε προεκλαμψία με μέτρια ή σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια σε ποσοστό 58 % και 64 % των γυναικών αντίστοιχα. Αντίθετα, ο Fink και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μια αναλογία 7.3 για PE σε 169 γυναίκες με νεφρική νόσο. Η ιστοπαθολογική εικόνα της νεφρικής ανεπάρκειας διέφερε, αλλά η διαβητική νεφροπάθεια είναι γνωστό ότι αποτελεί την πιο κοινή αιτία της χρόνιας νεφρικής νόσου (CKD- chronic kidney disease) στην εγκυμοσύνη (2,120).

### **3.5. Αντιμετώπιση**

Την αντιμετώπιση της προεκλαμψίας, με λίγες εξαιρέσεις, αποτελεί ο άμεσος τοκετός. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση μπορεί να μην είναι πάντα προς το συμφέρον του εμβρύου. Για παράδειγμα, σε περίπτωση ακραίας προωρότητας, το έμβρυο μπορεί να επωφεληθεί από μια περίοδο συντηρητικής αντιμετώπισης και αναμονής, κατά τη διάρκεια της οποίας χορηγούνται κορτικοστεροειδή προκειμένου να επιταχυνθεί η ωρίμανση του εμβρύου. Η απόφαση για άμεσο τοκετό έναντι της συντηρητικής αντιμετώπισης βασίζεται σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της σοβαρότητας της νόσου, της ωριμότητας του εμβρύου και της κατάστασης της μητέρας και του εμβρύου (67).

Στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκλαμπτικοί σπασμοί είναι αυτο-περιοριζόμενοι, διάρκειας 1-2 λεπτών. Η πρώτη προτεραιότητα είναι να εξασφαλιστεί ο αεραγωγός για την πρόληψη τραυματισμών και την αναρρόφηση του γαστρικού περιεχομένου. Η διαζεπάμη ή λοραζεπάμη πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο εάν οι επιληπτικές κρίσεις επιμένουν. Ο τοκετός του εμβρύου ενδείκνυται μόλις σταθεροποιηθεί η ασθενής (67).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΥΛΙΚΟ

## 1.1. Τόπος διεξαγωγής μελέτης

Η διεξαγωγή της μελέτης έγινε στην Α΄ Μαιευτική- Γυναικολογική Κλινική του Α.Π.Θ., στο Γενικό Νοσοκομείο Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης. Οι γυναίκες που μελετήθηκαν, προσήλθαν στο εξωτερικό ιατρείο παρακολούθησης της κύησης και στο τμήμα επειγόντων περιστατικών της κλινικής σε ημέρες εφημερίας. Πρόκειται για έγκυες στις οποίες διαγνώστηκε ή είχε ήδη διαγνωστεί προεκλαμψία και για έγκυες με φυσιολογική κύηση.

## 1.2. Κριτήρια επιλογής του προς μελέτη πληθυσμού

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν έγκυες γυναίκες που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής Α.Π.Θ., κατά το χρονικό διάστημα Ιούλιος 2013- Ιούνιος 2014 και στις οποίες είχε διαγνωστεί η προεκλαμψία ή είχαν φυσιολογικές κυήσεις. Οι γυναίκες είναι Ελληνίδες με τον ίδιο τύπο και τρόπο ζωής (life style). Η διάγνωση της προεκλαμψίας βασίστηκε στα συμπτώματα, τον κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο.

Τα κριτήρια εισόδου για τις γυναίκες με προεκλαμψία αποτελούν τα διαγνωστικά κριτήρια, όπως ορίστηκαν από το National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy (Am J Obstet Gynecol, 2000):

| <u>Διαγνωστικά κριτήρια</u> | <u>Ήπια προεκλαμψία</u>                                     | <u>Σοβαρή προεκλαμψία</u>   |
|-----------------------------|---|---|
| <b>Α.Π.</b>                 | $\geq 140/90$ mmHg μετά την 20 <sup>η</sup> εβδομάδα κύησης | $\geq 160/110$ mmHg   |
| <b>Πρωτεϊνουρία</b>         | $\geq 300$ mg/24h ή $\geq 1+$ σε stick ούρων                | $\geq 2,0$ g/24h ή $\geq 2+$ σε stick ούρων                                       |
| <b>Κρεατινίνη ορού</b>      |   | $> 1,2$ mg/dl   |
| <b>Αιμοπετάλια</b>          |   | $< 100.000/mm^3$  |
| <b>SGOT, SGPT</b>           |   | αυξημένες τιμές   |
| <b>Άλλα συμπτώματα</b>      |   | Επίμονη κεφαλαλγία<br>Άλλη εγκεφαλική ή οπτική διαταραχή<br>Επίμονη επιγαστραλγία |

### **1.3. Κριτήρια αποκλεισμού**

Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν η ύπαρξη ιστορικού χρόνιας αρτηριακής υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, νεφρικής νόσου, καθώς και τα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα γενικευμένης φλεγμονής ή ρήξης εμβρυϊκών υμένων.

### **1.4. Ομάδες γυναικών**

Ομάδα I (γυναίκες με φυσιολογική κύηση): n=20

Ομάδα II (γυναίκες με προεκλαμψία): n=20

## **2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Τύπος μελέτης**

Πρόκειται για μια μελέτη ασθενών- μαρτύρων (case control) δεδομένης χρονικής στιγμής (cross sectional).

### **2.2. Υπολογισμός μεγέθους δείγματος**

Επειδή δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με το μέγεθος της πιθανής συσχέτισης της humanin με την προεκλαμψία, δεν κατέστη δυνατός ο υπολογισμός μεγέθους δείγματος. Η παραπάνω εργασία αποτελεί πιλοτική μελέτη. Για το λόγο αυτό προκαθορίστηκε ότι θα συγκεντρωθεί ένα δείγμα 20 προεκλαμπτικών γυναικών και ίσος αριθμός μη εκλαμπτικών.

### **2.3. Παράμετροι που αξιολογήθηκαν**

#### *α. Βασικά χαρακτηριστικά*

- Ηλικία κατά την εισαγωγή στη μελέτη
- Δείκτης μάζας σώματος (BMI) πριν την εγκυμοσύνη
- Αριθμός κυήσεων
- Αριθμός ζώντων τέκνων

#### *β. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά κατά την εισαγωγή στη μελέτη*

- Ηλικία κύησης
- BMI
- Αρτηριακή πίεση

#### *γ. Αιματολογική και βιοχημική ανάλυση κατά την εισαγωγή στη μελέτη*

- Ουρία, κρεατινίνη, τρανσαμινάσες, ουρικό οξύ, αιμοπετάλια
- Humanin

#### *δ. Χαρακτηριστικά του τοκετού*

- Εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό
- Βάρος νεογνού

## 2.4. Λήψη δείγματος αίματος

Κάθε έγκυος γυναίκα που εντάχθηκε στην μελέτη υποβλήθηκε σε αιμοληψία και πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, αφού πρώτα είχε γίνει καταγραφή του γυναικολογικού, μαιευτικού, ατομικού και οικογενειακού ιστορικού της και είχε εξεταστεί κλινικά και υπερηχογραφικά. Λαμβάνονταν 20 ml αίματος από τη μεσοβασιλική φλέβα. Οι μετρήσεις των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων έγιναν άμεσα στα εργαστήρια του νοσοκομείου. Τα 10 ml του ολικού αίματος φυγοκεντρώνταν για 10 λεπτά. Ο ορός για τον προσδιορισμό των επιπέδων της humanin διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι να γίνει η μέτρηση στο τέλος του πειραματικού μέρους.

## 2.3. Προσδιορισμός αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων

Ο βιοχημικός έλεγχος έγινε με τις κλασικές και καθιερωμένες μεθόδους.

## 2.4. Προσδιορισμός της humanin

Ο προσδιορισμός της humanin πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του τμήματος Βιολογικής Χημείας του Α.Π.Θ. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της humanin ήταν η ποσοτική ELISA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Human putative Humanin peptide (MT-RNR2) ELISA Kit της εταιρίας Cusabio. Κατά την συγκεκριμένη μέθοδο, αντίσωμα ειδικό για την MT-RNR2 βρίσκεται προσροφημένο σε μια μικροπλάκα. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα (100μl) εγχύονται εντός των βοθρίων και η υπάρχουσα σε αυτά MT-RNR2 δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα μετά από επώαση δύο ωρών στους 37°C. Στην συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια που δεν έχει δεσμευτεί στη στερεά φάση. Ακολουθεί η προσθήκη σε κάθε θέση 100μl ενός αντισώματος συζευγμένου με βιοτίνη, ειδικό για την MT-RNR2 και επωάζεται για μία ώρα. Μετά από την πλύση των βοθρίων, προστίθονται 100μl avidin conjugated Horseradish Peroxidase (HRP). Επώαση για άλλη μία ώρα στους 37°C. Το καθηλωμένο ανοσοσύμπλοκο ξεπλένεται για να αφαιρεθεί η περίσσεια που δεν έχει δεσμευτεί. Τέλος προστίθονται 90μl ενός διαλύματος υποστρώματος και το χρώμα που αναπτύσσεται, μετά από τριάντα λεπτά, είναι ανάλογο της ποσότητας της MT-RNR2 που δεσμεύτηκε στο αρχικό στάδιο. Η ένταση του χρώματος μετρείται με φωτομετρία στα 450 nm. Σημειώνεται ότι οι βαθμονομητές και τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν.

### **Όριο ανίχνευσης**

28 pg/ml-1800 pg/ml.

### **Ευαισθησία**

Τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα επίπεδα της ανθρώπινης MT-RNR2 είναι τυπικά μικρότερα από 7 pg/ml (LLD- Lower Limit of Detection).

### **Ειδικότητα**

Αυτή η δοκιμασία έχει υψηλή ευαισθησία και εξαιρετική ειδικότητα για την ανίχνευση της ανθρώπινης MT-RNR2. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση.

### **Ακρίβεια**

Intra-assay: Τρία δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ελέγχθηκαν είκοσι φορές σε μία πλάκα και ο συντελεστής απόκλισης (CV%) βρέθηκε μικρότερος από 8%.

Inter-assay: Τρία δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ελέγχθηκαν σε είκοσι προσδιορισμούς και ο συντελεστής απόκλισης (CV%) βρέθηκε <10%.

## **2.5. Στατιστική ανάλυση**

Αρχικά έγινε έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk test, αλλά και με οπτικό έλεγχο των θέσεων κατανομής των γραφικών παραστάσεων. Αν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή, η περιγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με τον υπολογισμό της μέσης τιμής και της σταθερής απόκλισης. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με τη δοκιμασία t-test. Στην αντίθετη περίπτωση της μη κανονικής κατανομής, η περιγραφή των αποτελεσμάτων έγινε με υπολογισμό της διαμέσου και του εύρους τιμών. Για την σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U test. Στις κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη με τη χρήση του Chi-square test.

Η ανάλυση ROC (receiver operating characteristics) πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της διακριτής διαφοράς στις τιμές της humanin, μεταξύ των γυναικών με προεκλαμψία και αυτών με φυσιολογική κύηση. Τέλος, με χρήση του συντελεστή Pearson's r ελέγχθηκε η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της humanin και άλλων μεταβλητών. Οι δοκιμασίες που περιγράφονται αποτελούν τις κλασικές προσεγγίσεις για την περιγραφή, σύγκριση και συσχέτιση παραμετρικών και μη παραμετρικών μεταβλητών. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS (Statistical Program for the Social Science).



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Στους πίνακες 1 και 2 φαίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά (ηλικία, ύψος, βάρος πριν την εγκυμοσύνη, BMI, αριθμός κυήσεων και αριθμός ζώντων τέκνων) όλων των γυναικών στις ομάδες I και II.

**Πίνακας 1.** Βασικά χαρακτηριστικά των γυναικών της ομάδας I (ομάδα ελέγχου).

| α/α | Ηλικία (έτη) | Ύψος (cm) | Βάρος πριν την εγκυμοσύνη (Kg) | BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) | Αριθμός κυήσεων | Αριθμός ζώντων τέκνων |
|-----|--------------|-----------|--------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1   | 30           | 168       | 57                             | 20,20                    | 2               | 1                     |
| 2   | 27           | 160       | 112                            | 43,75                    | 1               | 0                     |
| 3   | 35           | 170       | 60                             | 20,76                    | 3               | 1                     |
| 4   | 25           | 162       | 58                             | 22,10                    | 2               | 1                     |
| 5   | 38           | 154       | 45                             | 18,97                    | 3               | 2                     |
| 6   | 21           | 170       | 49                             | 16,96                    | 3               | 2                     |
| 7   | 32           | 167       | 76                             | 27,25                    | 3               | 2                     |
| 8   | 40           | 164       | 82                             | 30,49                    | 3               | 1                     |
| 9   | 22           | 155       | 45                             | 18,73                    | 2               | 1                     |
| 10  | 37           | 163       | 60                             | 22,58                    | 4               | 2                     |
| 11  | 25           | 167       | 69                             | 24,74                    | 3               | 2                     |
| 12  | 35           | 160       | 62                             | 24,22                    | 2               | 1                     |
| 13  | 36           | 163       | 74                             | 27,85                    | 2               | 0                     |
| 14  | 31           | 167       | 78                             | 27,97                    | 2               | 1                     |
| 15  | 21           | 165       | 55                             | 20,20                    | 2               | 1                     |
| 16  | 29           | 162       | 52                             | 19,81                    | 2               | 1                     |
| 17  | 34           | 168       | 61                             | 21,61                    | 2               | 0                     |
| 18  | 25           | 171       | 83                             | 28,38                    | 4               | 2                     |
| 19  | 21           | 168       | 60                             | 21,26                    | 1               | 0                     |
| 20  | 34           | 165       | 60                             | 22,04                    | 4               | 3                     |

**Πίνακας 2.** Βασικά χαρακτηριστικά των γυναικών της ομάδας II (γυναίκες με προεκλαμψία).

| <b>a/a</b> | <b>Ηλικία<br/>(έτη)</b> | <b>Ύψος (cm)</b> | <b>Βάρος πριν<br/>την<br/>εγκυμοσύνη<br/>(Kg)</b> | <b>BMI<br/>(Kg/m<sup>2</sup>)</b> | <b>Αριθμός<br/>κνήσεων</b> | <b>Αριθμός<br/>ζώντων<br/>τέκνων</b> |
|------------|-------------------------|------------------|---|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <b>1</b>   | 26                      | 165              | 82  | 30,12                             | 3                          | 2                                    |
| <b>2</b>   | 22                      | 160              | 66  | 25,78                             | 1                          | 0                                    |
| <b>3</b>   | 36                      | 165              | 62  | 22,77                             | 1                          | 0                                    |
| <b>4</b>   | 25                      | 165              | 60  | 22,04                             | 1                          | 0                                    |
| <b>5</b>   | 27                      | 165              | 57  | 20,94                             | 1                          | 0                                    |
| <b>6</b>   | 36                      | 170              | 100   | 34,60                             | 4                          | 1                                    |
| <b>7</b>   | 30                      | 164              | 68  | 25,28                             | 2                          | 0                                    |
| <b>8</b>   | 26                      | 167              | 58  | 20,80                             | 1                          | 0                                    |
| <b>9</b>   | 27                      | 165              | 55  | 20,20                             | 1                          | 0                                    |
| <b>10</b>  | 26                      | 168              | 71  | 25,16                             | 1                          | 0                                    |
| <b>11</b>  | 36                      | 165              | 58  | 21,30                             | 1                          | 0                                    |
| <b>12</b>  | 21                      | 165              | 96  | 35,26                             | 1                          | 0                                    |
| <b>13</b>  | 31                      | 163              | 64  | 24,09                             | 3                          | 2                                    |
| <b>14</b>  | 29                      | 156              | 60  | 24,65                             | 3                          | 1                                    |
| <b>15</b>  | 28                      | 160              | 50  | 19,53                             | 4                          | 1                                    |
| <b>16</b>  | 27                      | 165              | 60  | 22,04                             | 1                          | 0                                    |
| <b>17</b>  | 28                      | 160              | 47  | 18,36                             | 1                          | 0                                    |
| <b>18</b>  | 21                      | 169              | 89  | 31,16                             | 2                          | 0                                    |
| <b>19</b>  | 25                      | 160              | 50  | 19,53                             | 1                          | 0                                    |
| <b>20</b>  | 26                      | 163              | 72  | 27,10                             | 1                          | 0                                    |

Στους πίνακες 3 και 4 φαίνονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (ηλικία κύησης σε ημέρες, ηλικία κύησης σε εβδομάδες, βάρος, BMI και συστολική, διαστολική, μέση πίεση) όλων των γυναικών στις ομάδες I και II κατά την εισαγωγή στη μελέτη.

**Πίνακας 3.** Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των γυναικών της ομάδας I (ομάδα ελέγχου) κατά την εισαγωγή στην μελέτη.

| α/α | Ηλικία κύησης (ημέρες) | Ηλικία κύησης (εβδομάδες) | Βάρος (Kg) | BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) | Συστολική ΑΠ (mmHg) | Διαστολική ΑΠ (mmHg) | Μέση ΑΠ (mmHg) |
|-----|------------------------|---------------------------|------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------|
| 1   | 273                    | 39                        | 65         | 23,03                    | 100                 | 60                   | 73             |
| 2   | 242                    | 34+4                      | 117        | 45,70                    | 135                 | 80                   | 98             |
| 3   | 267                    | 38+1                      | 79         | 27,34                    | 112                 | 67                   | 82             |
| 4   | 228                    | 32+4                      | 74         | 28,20                    | 110                 | 60                   | 77             |
| 5   | 222                    | 31+5                      | 54         | 22,77                    | 105                 | 80                   | 88             |
| 6   | 191                    | 27+2                      | 56         | 19,38                    | 97                  | 60                   | 72             |
| 7   | 194                    | 27+5                      | 88         | 31,55                    | 120                 | 80                   | 93             |
| 8   | 238                    | 34                        | 84         | 31,23                    | 110                 | 80                   | 90             |
| 9   | 256                    | 36+4                      | 54         | 22,48                    | 110                 | 70                   | 83             |
| 10  | 268                    | 38+2                      | 74         | 27,85                    | 124                 | 75                   | 91             |
| 11  | 261                    | 37+2                      | 91         | 32,63                    | 120                 | 75                   | 90             |
| 12  | 190                    | 27+1                      | 74         | 28,91                    | 120                 | 60                   | 80             |
| 13  | 240                    | 34+2                      | 87         | 32,74                    | 120                 | 65                   | 83             |
| 14  | 261                    | 37+2                      | 99         | 35,50                    | 113                 | 64                   | 80             |
| 15  | 243                    | 34+5                      | 60         | 22,04                    | 115                 | 70                   | 85             |
| 16  | 185                    | 26+3                      | 61         | 23,24                    | 90                  | 60                   | 70             |
| 17  | 218                    | 31+1                      | 74         | 26,22                    | 110                 | 70                   | 83             |
| 18  | 268                    | 38+2                      | 95         | 32,49                    | 117                 | 54                   | 75             |
| 19  | 204                    | 29+1                      | 72         | 25,51                    | 116                 | 68                   | 84             |
| 20  | 220                    | 31+3                      | 74         | 27,18                    | 90                  | 50                   | 63             |

**Πίνακας 4.** Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των γυναικών της ομάδας II (γυναίκες με προεκλαμψία) κατά την εισαγωγή στην μελέτη.

| <b>a/a</b> | <b>Ηλικία κύησης (ημέρες)</b> | <b>Ηλικία κύησης (εβδομάδες)</b> | <b>Βάρος (Kg)</b> | <b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b> | <b>Συστολική ΑΠ (mmHg)</b> | <b>Διαστολική ΑΠ (mmHg)</b> | <b>Μέση ΑΠ (mmHg)</b> |
|------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b>1</b>   | 214                           | 30+4                             | 89                | 32,69                         | 168                        | 100                         | 123                   |
| <b>2</b>   | 242                           | 34+4                             | 80                | 31,25                         | 160                        | 100                         | 120                   |
| <b>3</b>   | 273                           | 39                               | 86                | 31,59                         | 150                        | 110                         | 123                   |
| <b>4</b>   | 293                           | 40+13                            | 99                | 36,36                         | 150                        | 90                          | 110                   |
| <b>5</b>   | 241                           | 34+3                             | 70                | 25,71                         | 180                        | 108                         | 132                   |
| <b>6</b>   | 223                           | 31+6                             | 105               | 36,33                         | 160                        | 110                         | 127                   |
| <b>7</b>   | 236                           | 33+5                             | 79                | 29,37                         | 160                        | 90                          | 113                   |
| <b>8</b>   | 264                           | 37+5                             | 68                | 24,38                         | 140                        | 100                         | 113                   |
| <b>9</b>   | 202                           | 28+6                             | 75                | 27,55                         | 140                        | 100                         | 113                   |
| <b>10</b>  | 181                           | 25+6                             | 90                | 31,89                         | 200                        | 120                         | 147                   |
| <b>11</b>  | 233                           | 33+2                             | 78                | 28,65                         | 190                        | 100                         | 130                   |
| <b>12</b>  | 241                           | 34+3                             | 106               | 38,93                         | 165                        | 100                         | 122                   |
| <b>13</b>  | 226                           | 32+2                             | 80                | 30,11                         | 180                        | 110                         | 133                   |
| <b>14</b>  | 257                           | 36+5                             | 70                | 28,76                         | 160                        | 100                         | 120                   |
| <b>15</b>  | 241                           | 34+3                             | 75                | 29,30                         | 180                        | 110                         | 133                   |
| <b>16</b>  | 248                           | 35+3                             | 80                | 29,38                         | 160                        | 100                         | 120                   |
| <b>17</b>  | 283                           | 40+3                             | 50                | 19,53                         | 140                        | 110                         | 120                   |
| <b>18</b>  | 211                           | 30+1                             | 93                | 32,56                         | 170                        | 110                         | 130                   |
| <b>19</b>  | 276                           | 39+3                             | 65                | 25,39                         | 200                        | 90                          | 127                   |
| <b>20</b>  | 261                           | 37+2                             | 96                | 36,13                         | 150                        | 100                         | 117                   |

Στους πίνακες 5 και 6 φαίνονται οι αιματολογικές- βιοχημικές παράμετροι (κρεατινίνη, ουρία, τρανσαμινάσες, ουρικό οξύ, αιμοπετάλια) όλων των γυναικών στις ομάδες I και II κατά την εισαγωγή στη μελέτη.

**Πίνακας 5.** Αιματολογικές- βιοχημικές παράμετροι των γυναικών της ομάδας I (ομάδα ελέγχου).

| <i>α/α</i> | <b>Κρεατινίνη<br/>(mg/dl)</b> | <b>Ουρία<br/>(mg/dl)</b> | <b>SGOT<br/>(IU/L)</b> | <b>SGPT<br/>(IU/L)</b> | <b>Ουρικό<br/>οξύ<br/>(mg/dl)</b> | <b>Αιμοπετάλια<br/>(x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> |
|------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|
| <b>1</b>   | 0,52                          | 17                       | 15                     | 9                      | 3,6                               | 236   |
| <b>2</b>   | 0,68                          | 19                       | 12                     | 7                      | 5,4                               | 255   |
| <b>3</b>   | 0,62                          | 20                       | 28                     | 29                     | 2,8                               | 263   |
| <b>4</b>   | 0,40                          | 15                       | 17                     | 9                      | 4,0                               | 311   |
| <b>5</b>   | 0,45                          | 11                       | 20                     | 18                     | 2,8                               | 333   |
| <b>6</b>   | 0,64                          | 20                       | 22                     | 22                     | 2,4                               | 266   |
| <b>7</b>   | 0,49                          | 14                       | 13                     | 8                      | 2,9                               | 208   |
| <b>8</b>   | 0,62                          | 18                       | 22                     | 41                     | 2,6                               | 335   |
| <b>9</b>   | 0,52                          | 18                       | 16                     | 9                      | 3,2                               | 250   |
| <b>10</b>  | 0,61                          | 19                       | 23                     | 24                     | 4,1                               | 256   |
| <b>11</b>  | 0,61                          | 20                       | 28                     | 13                     | 4,0                               | 189   |
| <b>12</b>  | 0,86                          | 14                       | 20                     | 20                     | 3,6                               | 217   |
| <b>13</b>  | 0,84                          | 21                       | 25                     | 13                     | 4,9                               | 193   |
| <b>14</b>  | 0,78                          | 12                       | 17                     | 18                     | 2,7                               | 140   |
| <b>15</b>  | 0,94                          | 17                       | 19                     | 21                     | 4,2                               | 206   |
| <b>16</b>  | 0,50                          | 11                       | 14                     | 26                     | 3,4                               | 241   |
| <b>17</b>  | 0,58                          | 21                       | 11                     | 13                     | 3,0                               | 252   |
| <b>18</b>  | 0,55                          | 6                        | 13                     | 7                      | 5,5                               | 277   |
| <b>19</b>  | 0,65                          | 21                       | 27                     | 22                     | 3,7                               | 192   |
| <b>20</b>  | 0,80                          | 19                       | 16                     | 26                     | 3,4                               | 198   |

**Πίνακας 6.** Αιματολογικές- βιοχημικές παράμετροι των γυναικών της ομάδας II (γυναίκες με προεκλαμψία).

| <b>α/α</b> | <b>Κρεατινίνη<br/>(mg/dl)</b> | <b>Ουρία<br/>(mg/dl)</b> | <b>SGOT<br/>(IU/L)</b> | <b>SGPT<br/>(IU/L)</b> | <b>Ουρικό<br/>οξύ<br/>(mg/dl)</b> | <b>Αιμοπετάλια<br/>(x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> |
|------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|
| <b>1</b>   | 0,59                          | 13                       | 22                     | 16                     | 3,4                               | 328   |
| <b>2</b>   | 0,64                          | 18                       | 72                     | 53                     | 6,4                               | 89  |
| <b>3</b>   | 0,81                          | 36                       | 31                     | 16                     | 6,4                               | 209   |
| <b>4</b>   | 0,67                          | 24                       | 11                     | 6                      | 5,0                               | 212   |
| <b>5</b>   | 0,84                          | 38                       | 22                     | 21                     | 5,6                               | 247   |
| <b>6</b>   | 0,59                          | 5                        | 11                     | 7                      | 4,4                               | 257   |
| <b>7</b>   | 0,72                          | 36                       | 11                     | 9                      | 4,4                               | 361   |
| <b>8</b>   | 0,80                          | 56                       | 37                     | 62                     | 5,6                               | 319   |
| <b>9</b>   | 0,72                          | 47                       | 15                     | 10                     | 6,1                               | 290   |
| <b>10</b>  | 0,93                          | 44                       | 66                     | 61                     | 7,9                               | 185   |
| <b>11</b>  | 0,83                          | 40                       | 22                     | 22                     | 7,4                               | 196   |
| <b>12</b>  | 0,80                          | 18                       | 14                     | 8                      | 7,3                               | 345   |
| <b>13</b>  | 0,55                          | 17                       | 20                     | 9                      | 5,2                               | 208   |
| <b>14</b>  | 0,84                          | 23                       | 29                     | 18                     | 6,4                               | 146   |
| <b>15</b>  | 0,98                          | 31                       | 19                     | 10                     | 6,2                               | 336   |
| <b>16</b>  | 0,89                          | 46                       | 37                     | 18                     | 5,1                               | 130   |
| <b>17</b>  | 0,58                          | 21                       | 21                     | 8                      | 7,5                               | 205   |
| <b>18</b>  | 0,82                          | 30                       | 12                     | 11                     | 4,5                               | 178   |
| <b>19</b>  | 0,92                          | 48                       | 26                     | 11                     | 6,1                               | 209   |
| <b>20</b>  | 0,63                          | 20                       | 26                     | 22                     | 7,1                               | 277   |

Στους πίνακες 7 και 8 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του τοκετού (ηλικία κύησης κατά τον τοκετό σε ημέρες, ηλικία κύησης κατά τον τοκετό σε εβδομάδες, βάρος νεογνού) όλων των γυναικών στις ομάδες I και II.

**Πίνακας 7.** Χαρακτηριστικά του τοκετού των γυναικών της ομάδας I (ομάδα ελέγχου) κατά την εισαγωγή στην μελέτη.

| <b>α/α</b> | <b>Ηλικία τοκετού (ημέρες)</b> | <b>Ηλικία κύησης (εβδομάδες)</b> | <b>Βάρος Νεογνού (gr)</b> |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| <b>1</b>   | 273                            | 39                               | 3050                      |
| <b>2</b>   | 273                            | 39                               | 3620                      |
| <b>3</b>   | 268                            | 38+2                             | 3100                      |
| <b>4</b>   | 269                            | 38+3                             | 3020                      |
| <b>5</b>   | 273                            | 39                               | 2850                      |
| <b>6</b>   | 274                            | 39+1                             | 2950                      |
| <b>7</b>   | 278                            | 39+5                             | 3550                      |
| <b>8</b>   | 268                            | 38+2                             | 3440                      |
| <b>9</b>   | 280                            | 40                               | 3680                      |
| <b>10</b>  | 269                            | 38+3                             | 3170                      |
| <b>11</b>  | 267                            | 38+1                             | 3250                      |
| <b>12</b>  | 270                            | 38+4                             | 3360                      |
| <b>13</b>  | 285                            | 40+5                             | 3490                      |
| <b>14</b>  | 269                            | 38+3                             | 3550                      |
| <b>15</b>  | 280                            | 40                               | 3400                      |
| <b>16</b>  | 270                            | 38+4                             | 3290                      |
| <b>17</b>  | 273                            | 39                               | 3800                      |
| <b>18</b>  | 269                            | 38+3                             | 3900                      |
| <b>19</b>  | 355                            | 40+5                             | 3650                      |
| <b>20</b>  | 270                            | 38+4                             | 3100                      |

**Πίνακας 8.** Χαρακτηριστικά του τοκετού των γυναικών της ομάδας II (γυναίκες με προεκλαμψία) κατά την εισαγωγή στην μελέτη.

| <b>a/a</b> | <b>Ηλικία<br/>κύησης<br/>(ημέρες)</b> | <b>Ηλικία<br/>κύησης<br/>(εβδομάδες)</b> | <b>Βάρος<br/>νεογνού<br/>(gr)</b> |
|------------|---------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <b>1</b>   | 222                                   | 31+5                                     | 1560                              |
| <b>2</b>   | 242                                   | 34+4                                     | 2110                              |
| <b>3</b>   | 273                                   | 39                                       | 3290                              |
| <b>4</b>   | 293                                   | 40+13                                    | 4230                              |
| <b>5</b>   | 241                                   | 34+3                                     | 2100                              |
| <b>6</b>   | 224                                   | 32                                       | 2000                              |
| <b>7</b>   | 236                                   | 33+5                                     | 1670                              |
| <b>8</b>   | 265                                   | 37+6                                     | 2540                              |
| <b>9</b>   | 203                                   | 29                                       | 1190                              |
| <b>10</b>  | 183                                   | 26+1                                     | 560                               |
| <b>11</b>  | 235                                   | 33+4                                     | 1670                              |
| <b>12</b>  | 241                                   | 34+3                                     | 2320                              |
| <b>13</b>  | 226                                   | 32+2                                     | 1760                              |
| <b>14</b>  | 257                                   | 36+5                                     | 3140                              |
| <b>15</b>  | 241                                   | 34+3                                     | 2050                              |
| <b>16</b>  | 249                                   | 35+4                                     | 2040                              |
| <b>17</b>  | 284                                   | 40+4                                     | 3960                              |
| <b>18</b>  | 211                                   | 30+1                                     | 1210                              |
| <b>19</b>  | 276                                   | 39+3                                     | 2260                              |
| <b>20</b>  | 261                                   | 37+2                                     | 2510                              |



Στον πίνακα 9 φαίνονται τα επίπεδα της humanin του ορού όλων των γυναικών στις ομάδες I και II.

**Πίνακας 9.** Επίπεδα humanin ορού (pg/ml).

| <b>a/a</b> | <b>Ομάδα ελέγχου (n=20)</b> | <b>Γυναίκες με προεκλαμψία (n=20)</b> |
|------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| <b>1</b>   | 636,68                      | 754,92                                |
| <b>2</b>   | 686,43                      | 853,59                                |
| <b>3</b>   | 564,58                      | 850,60                                |
| <b>4</b>   | 579,00                      | 686,43                                |
| <b>5</b>   | 551,00                      | 634,12                                |
| <b>6</b>   | 689,11                      | 740,95                                |
| <b>7</b>   | 536,00                      | 629,01                                |
| <b>8</b>   | 574,25                      | 893,00                                |
| <b>9</b>   | 538,00                      | 853,59                                |
| <b>10</b>  | 562,18                      | 740,95                                |
| <b>11</b>  | 771,87                      | 829,80                                |
| <b>12</b>  | 534,00                      | 769,03                                |
| <b>13</b>  | 652,18                      | 616,33                                |
| <b>14</b>  | 683,77                      | 749,32                                |
| <b>15</b>  | 754,92                      | 774,72                                |
| <b>16</b>  | 601,30                      | 775,00                                |
| <b>17</b>  | 603,79                      | 613,81                                |
| <b>18</b>  | 522,00                      | 771,87                                |
| <b>19</b>  | 699,86                      | 794,78                                |
| <b>20</b>  | 771,87                      | 818,04                                |

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 10 δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στα βασικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (ηλικία, ύψος, βάρος, BMI, ηλικία κύησης) των γυναικών κατά την ένταξη στην μελέτη. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική διαφορά στην συστολική, διαστολική και μέση αρτηριακή πίεση ανάμεσα στις δύο ομάδες. Σχετικά με τις αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους οι δύο ομάδες γυναικών διέφεραν στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα της κρεατινίνης, της ουρίας και του ουρικού οξέος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις παραμέτρους που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του τοκετού, όπως η ηλικία κύησης κατά τον τοκετό και το βάρος του νεογνού.

**Πίνακας 10.** Σύγκριση των γυναικών των ομάδων I και II. (p, στατιστική σημαντικότητα)

|   | Ομάδα ελέγχου<br>(n=20)         | Γυναίκες με<br>προεκλαμψία (n=20) | P      |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Ηλικία (έτη) <sup>β</sup>   | 30,50 (10)                      | 27,00 (5)                         | 0,302  |
| Βάρος πριν την<br>εγκυμοσύνη (Kg) <sup>β</sup>                    | 60,00 (20)                      | 61,00 (15)                        | 0,745  |
| BMI πριν την<br>εγκυμοσύνη<br>(Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>β</sup>   | 22,07 (7,50)                    | 23,43 (5,94)                      | 0,570  |
| Αριθμός κήσεων<br>n% <sup>γ</sup>                                 | n< 2: 2 (10%)<br>n≥ 2: 18 (90%) | n< 2: 13 (65%)<br>n≥ 2: 7 (35%)   | 0,001  |
| Αριθμός ζώντων<br>τέκνων n% <sup>γ</sup>                          | n< 2: 13 (65%)<br>n≥ 2: 7 (35%) | n< 2: 18 (90%)<br>n≥ 2: 2 (10%)   | 0,130  |
| <b><u>Χαρακτηριστικά κατά την εισαγωγή στην μελέτη</u></b>        |                                 |                                   |        |
| Ηλικία κύησης<br>(ημέρες) <sup>α</sup>                            | 233,45 (29,36)                  | 242,30 (28,38)                    | 0,339  |
| Βάρος (Kg) <sup>α</sup>   | 76,60 (16,44)                   | 81,70 (14,09)                     | 0,299  |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>α</sup>                             | 28,30 (5,99)                    | 30,29 (4,64)                      | 0,247  |
| Συστολική (mmHg) <sup>α</sup>                                     | 111,70 (11,19)                  | 165,15 (18,44)                    | <0,001 |
| Διαστολική<br>(mmHg) <sup>β</sup>                                 | 67,50 (15)                      | 100,00 (10)                       | <0,001 |
| Μέση (mmHg) <sup>α</sup>  | 82,00 (8,60)                    | 123,65 (8,95)                     | <0,001 |
| <b><u>Βιοχημικοί παράγοντες κατά την εισαγωγή στην μελέτη</u></b> |                                 |                                   |        |
| Κρεατινίνη (mg/dl) <sup>α</sup>                                   | 0,63 (0,15)                     | 0,76 (0,13)                       | 0,007  |
| Ουρία (mg/dl) <sup>β</sup>  | 18,00 (6)                       | 30,50 (25)                        | 0,001  |
| SGOT (IU/L) <sup>β</sup>  | 18,00 (9)                       | 22,00 (16)                        | 0,228  |
| SGPT (IU/L) <sup>β</sup>  | 18,00 (15)                      | 13,50 (13)                        | 0,542  |
| Ουρικό οξύ (mg/dl) <sup>α</sup>                                   | 3,61 (0,89)                     | 5,89 (1,21)                       | <0,001 |
| Αιμοπετάλια<br>(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <sup>α</sup>  | 240,90 (50,05)                  | 236,35 (76,19)                    | 0,825  |
| <b><u>Χαρακτηριστικά του τοκετού</u></b>                          |                                 |                                   |        |
| Ηλικία κύησης κατά<br>τον τοκετό (ημέρες) <sup>β</sup>            | 271,50 (8)                      | 241,00 (40)                       | <0,001 |
| Βάρος νεογνού (gr) <sup>α</sup>                                   | 3361,00 (295,99)                | 2208,50 (902,61)                  | <0,001 |

α: Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων γίνεται με t-test. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (τυπική απόκλιση).

β: Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων γίνεται με Mann-Whitney U test. Οι τιμές εκφράζονται ως διάμεσος (εύρος διακύμανσης τιμών μεταξύ 25<sup>ης</sup> και 75<sup>ης</sup> εκατοστιαίας θέσης).

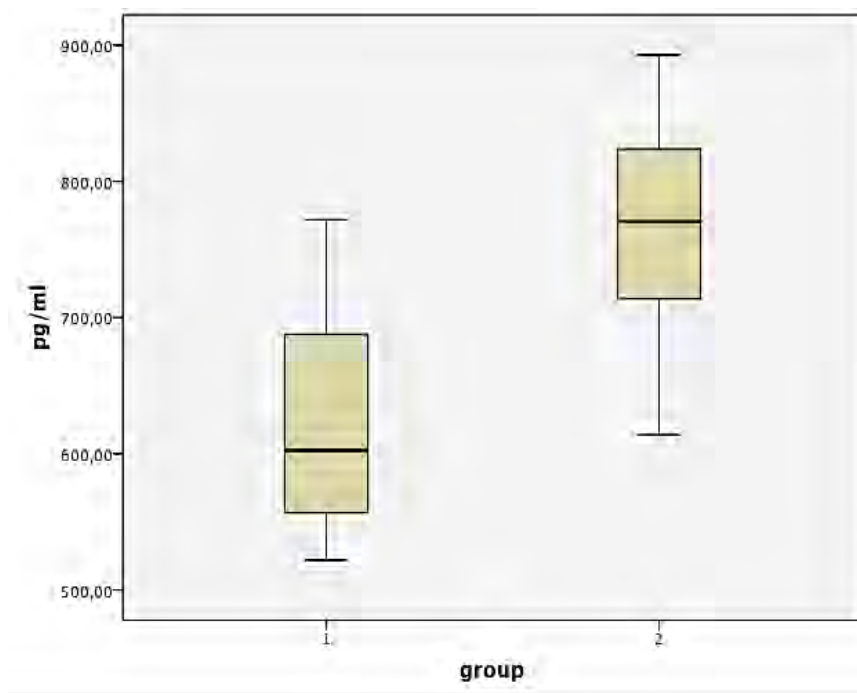
γ: Chi-square test

Σύμφωνα με τον πίνακα 11 η συγκέντρωση της humanin του ορού των γυναικών των δύο ομάδων παρουσιάζει στατιστική σημαντική διαφορά. Υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην ομάδα των γυναικών με προεκλαμψία, όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 1.

**Πίνακας 11.** Σύγκριση των επιπέδων της humanin στις δύο ομάδες γυναικών που μελετήθηκαν.

|                 | Ομάδα ελέγχου<br>(n=20) | Γυναίκες με<br>προεκλαμψία (n=20) | P      |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------------|--------|
| Humanin (pg/ml) | 625,64 (83,03)          | 757,49 (84,20)                    | <0,001 |

Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων γίνεται με *t*-test. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (τυπική απόκλιση).



| Box plot  | Ομάδα I | Ομάδα II (προεκλαμψία) |
|---|---------|------------------------|
| Εύρος διακύμανσης τιμών μεταξύ 25 <sup>ης</sup> και 75 <sup>ης</sup> εκατοστιαίας θέσης (pg/ml) | 134,65  | 126,80                 |
| Διάμεσος (pg/ml)  | 602,55  | 770,95                 |
| Ελάχιστη τιμή (pg/ml)   | 522,00  | 613,81                 |
| Μέγιστη τιμή (pg/ml)  | 771,87  | 893,00                 |

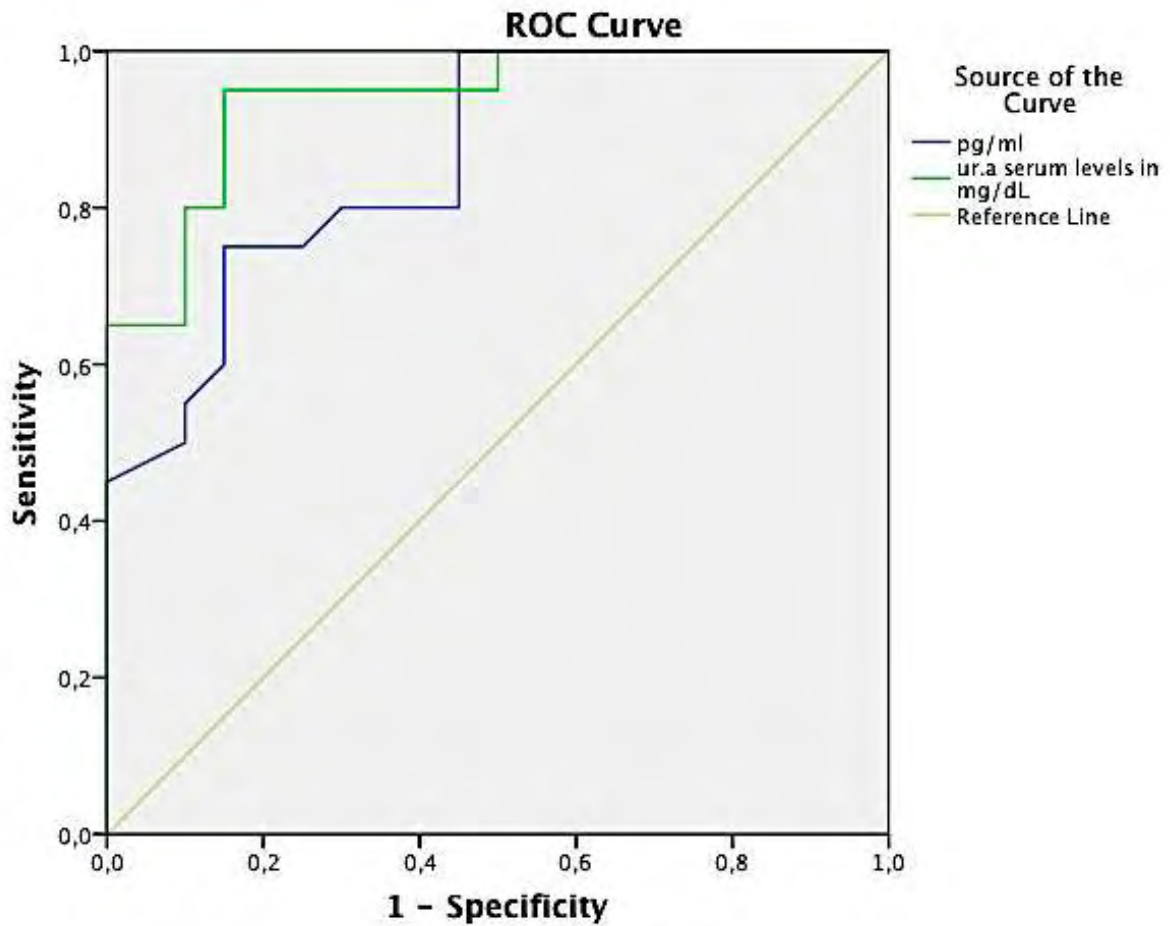
**Σχήμα 1.** Box plot της συγκέντρωσης της humanin στην ομάδα ελέγχου [1] και στις γυναίκες με προεκλαμψία [2]. Οι κεντρικές γραμμές των έγχρωμων περιοχών αντιπροσωπεύουν τις διάμεσες τιμές, ενώ τα άγκιστρα τα όρια στο εύρος των τιμών.

Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της humanin και των άλλων μεταβλητών διερευνήθηκε με τον συντελεστή Pearson. Όπως φαίνεται στον πίνακα 12, διαπιστώνεται ισχυρή θετική συσχέτιση με την συστολική ( $r= 0,500$  και  $p= 0,001$ ), την διαστολική ( $r= 0,528$  και  $p< 0,001$ ), την μέση αρτηριακή πίεση ( $r= 0,535$  και  $p< 0,001$ ) και τα επίπεδα του ουρικού οξέος ( $r= 0,554$  και  $p< 0,001$ ), ενώ ισχυρή αρνητική συσχέτιση με το βάρος γέννησης του νεογνού ( $r= -0,493$  και  $p= 0,001$ ).

**Πίνακας 12.** Ανάλυση γραμμικής συσχέτισης (linear correlation analysis) μεταξύ των επιπέδων της humanin και άλλων παραμέτρων.

|                |          | Ηλικία κύησης τοκετού (ημέρες) | Συστολική πίεση (mmHg) | Διαστολική πίεση (mmHg) | Μέση αρτηριακή πίεση (mmHg) | Ουρικό οξύ (mg/dl) | Ηλικία μητέρας (έτη) | Βάρος νεογνού (gr) | BMI   |
|----------------|----------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|-------|
| <b>Humanin</b> | <b>r</b> | -0,326                         | 0,500                  | 0,528                   | 0,535                       | 0,554              | -0,315               | -0,493             | 0,193 |
|                | <b>p</b> | 0,040                          | 0,001                  | <0,001                  | <0,001                      | <0,001             | 0,048                | 0,001              | 0,232 |

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ικανότητα της humanin να διακρίνει τις γυναίκες με ή χωρίς προεκλαμψία, πραγματοποιήθηκε ROC ανάλυση. Σύμφωνα με την ROC καμπύλη τα επίπεδα της humanin μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση- ταξινόμηση των προεκλαμπτικών γυναικών, με περιοχή κάτωθεν της καμπύλης- AUC 0,860 (95% CI: 0,749-0,971,  $p< 0,001$ ), όπως φαίνεται στο σχήμα 2.



|                         | Humanin      | Ουρικό οξύ   |
|-------------------------|--------------|--------------|
| AUC                     | 0,860        | 0,937        |
| 95% Confidence interval | 0,749- 0,971 | 0,866- 1,000 |
| p                       | <0,001       | 0,001        |

**Σχήμα 2.** ROC ανάλυση της συγκέντρωσης της humanin και της προεκλαμψίας (μπλε γραμμή). Με την πράσινη γραμμή απεικονίζεται η ROC καμπύλη του ουρικού οξέος.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την ένταξη των γυναικών στις δύο ομάδες έγινε προσπάθεια ώστε να μην διαφέρουν ως προς τα δημογραφικά τους στοιχεία αλλά και ως προς τον τρόπο ζωής τους. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, οι δύο ομάδες παρουσιάζουν ομοιογένεια όσον αφορά τα βασικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά τους. Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης, στις βιοχημικές παραμέτρους, όπως το ουρικό οξύ, και στα χαρακτηριστικά του τοκετού. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν. Υπενθυμίζεται ότι οι γυναίκες με προεκλαμψία χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος. Επιπλέον, λόγω της φύσης της νόσου οι προεκλαμπτικές γυναίκες εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, καθώς και καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου. Καταστάσεις που σχετίζονται με την μικρότερη ηλικία κύησης κατά τον τοκετό και με το χαμηλότερο βάρος των νεογνών. Επιπρόσθετα, η προεκλαμψία εμφανίζεται συχνότερα σε πρωτοτόκες. Επομένως, είναι λογικό οι γυναίκες στην ομάδα της προεκλαμψίας να εμφανίζουν μικρότερο αριθμό τοκετών, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στην αρτηριακή πίεση μεταξύ των γυναικών των δύο ομάδων, κατά την ένταξη στην μελέτη, είναι αναμενόμενη καθώς αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο για την προεκλαμψία και κατά συνέπεια για τον διαχωρισμό τους στις δύο ομάδες.

Από την παρούσα μελέτη διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση της humanin στον ορό των εγκύων γυναικών με προεκλαμψία βρέθηκε να είναι αυξημένη σε σχέση με τις νορμοτασικές εγκύους. Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα της ROC ανάλυσης φαίνεται ότι η humanin θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να ταξινομήσει τις γυναίκες σε προεκλαμπτικές ή μη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την συμμετοχή της humanin στην παθοφυσιολογία της PE. Η humanin, είναι γνωστό ότι ασκεί προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης και του οξειδωτικού στρες. Η απόπτωση αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τοξικούς παράγοντες, φάρμακα και διαταραχές της κυτταρικής ομοιόστασης. Η απόπτωση συμμετέχει στην παθογένεση πολλών νοσημάτων όπως ο καρκίνος, οι νευρολογικές διαταραχές, τα αυτοάνοσα νοσήματα και η γήρανση, ενώ ο ρυθμός της βρέθηκε να είναι αυξημένος στην προεκλαμψία, ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες που συμβαίνει στον πλακούντα (69). Το οξειδωτικό στρες, από την άλλη πλευρά, ορίζεται ως μια ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τα εξουδετερώσουν. Παρόμοια με το Alzheimer, το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο και σε νοσήματα που αφορούν τη Γυναικολογία-

Μαιευτική. Η ενδομητρίωση (121), το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (122), η πρόπτωση πυελικών οργάνων (123), η υπογονιμότητα (124) και η υπερτασική νόσος της κύησης (125) είναι μερικά από αυτά. Συνεπώς με βάση τα παραπάνω δεδομένα, θα μπορούσε, ίσως, να εξηγηθεί η πιθανή συμμετοχή της humanin στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας.

Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός που συνδέει την προεκλαμψία με την humanin θα μπορούσε να είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η προεκλαμψία, ειδικότερα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελεί μία σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας κατά τη διάρκεια της κύησης και του τοκετού. Χαρακτηρίζεται από υπέρταση και αυξημένη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση, που πιθανώς ξεκινά από την εκτεταμένη ενδοθηλιακή βλάβη. Οι ασθενείς με προεκλαμψία παρουσιάζουν, επίσης, αυξημένο οξειδωτικό στρες, αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού και εμφανή στοιχεία δυσλιπιδαιμίας (84). Τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται, ολοένα και περισσότερο, εμφανές ότι οι γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου στη μετέπειτα ζωή τους (126–128). Επιπλέον, αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου. Πιο συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου αυξάνεται κατά δώδεκα φορές σε γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας και μεταβολικού συνδρόμου σε σύγκριση με εκείνες που έχουν ελεύθερο ιστορικό. Είναι επομένως ξεκάθαρο ότι το μεταβολικό σύνδρομο, η προεκλαμψία και η καρδιαγγειακή νόσος σχετίζονται, αλλά δεν έχει ακόμα καθοριστεί μια άμεση αιτιολογική σχέση. Στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου συμμετέχει η ενδοθηλιακή, αγγειακή και μεταβολική δυσλειτουργία. Παράγοντες που συναντούνται κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας και παραμένουν μετά τον τοκετό. Η προεκλαμψία θα μπορούσε να αποτελεί έναν δείκτη για την μελλοντική ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου, καθώς οι δύο αυτές καταστάσεις ακολουθούν κοινή γενετική και παθοφυσιολογία, όπως η υπερλιπιδαιμία. Επιπρόσθετα, μοιράζονται κοινούς παράγοντες κινδύνου, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης και η νεφρική νόσος (129). Η διαπίστωση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που παίζει σημαντικότατο ρόλο στην παθογένεση, τόσο της αθηροσκλήρυνσης, όσο και της προεκλαμψίας, πιθανότατα προκαλείται από τους ίδιους μεσολαβητές και παράγοντες φλεγμονής (68). Από την άλλη πλευρά, η humanin δρα στην αθηροσκλήρυνση ως ένας κυτταροπροστατευτικός παράγοντας. Δεν είναι απίθανο, η humanin να χρησιμεύει στη σταθεροποίηση του ενδοθηλίου, αναιρώντας τις ανεπιθύμητες συνέπειες της αγγειακής φλεγμονής (61). Θα μπορούσε, επομένως, να υποθεθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των ενδοθηλιακών κύτταρων, έναντι του οξειδωτικού στρες που λαμβάνει χώρα στην προεκλαμψία. Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα της humanin θα μπορούσαν να σχετίζονται με τη διατήρηση της φυσιολογικής ενδοθηλιακής λειτουργίας στην προεκλαμψία, εισάγοντας, πιθανώς, έναν νέο διαγνωστικό και



θεραπευτικό στόχο. Επιπλέον, θα μπορούσαν να αποτελούν δείκτη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που λαμβάνει χώρα στην προεκλαμψία.

Αν θεωρηθεί, με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ότι η humanin συμμετέχει στην παθογένεση της προεκλαμψίας, ενισχύεται, ακόμα περισσότερο, η άποψη της αγγειακής συμμετοχής, του οξειδωτικού στρες και κατ' επέκταση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην παθοφυσιολογία της νόσου. Συνδυάζοντας τα στοιχεία που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της humanin, που βρέθηκαν στον ορό των προεκλαμπτικών γυναικών, αποτελούν προστατευτική απάντηση έναντι του οξειδωτικού στρες και ότι η humanin θα μπορούσε να προστατεύει έναντι της απόπτωσης και της φλεγμονώδους αντίδρασης σε επίπεδο αγγείων.

Πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι πρόκειται για cross sectional μελέτη, στην οποία οι ομάδες των γυναικών που συμμετείχαν δεν παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις στα βασικά χαρακτηριστικά τους, με αποτέλεσμα να μπορεί να διασφαλιστεί η σωστή συλλογή των αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά τα μεγέθη των υπό μελέτη ομάδων ορίστηκαν αυθαίρετα, καθώς δεν υπάρχουν, μέχρι σήμερα, βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς τη συσχέτιση της υπερτασικής νόσου της κύησης με την humanin. Η παρούσα μελέτη είναι πιλοτική, με συνέπεια τα αποτελέσματά της να μην μπορούν να συγκριθούν με προηγούμενες μελέτες. Ένα άλλο μειονέκτημα της παρούσας μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχει δυνατότητα να γίνει διερευνητική ανάλυση (exploratory analysis) σε υποομάδες, με βάση τη σοβαρότητα της προεκλαμψίας (ήπια, μέτρια, βαριά) και το βάρος των νεογνών (λιποβαρή, κανονικά, μακροσωμικά). Αν η humanin συμμετέχει στην παθογένεση της προεκλαμψίας, είναι αναμενόμενο να υπάρχει συσχέτιση των συγκεντρώσεών της με την σοβαρότητα της νόσου. Εξάλλου, όπως διαπιστώθηκε από την ανάλυση γραμμικής συσχέτισης, η αύξηση της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων του ουρικού οξέος των γυναικών (δείκτες σοβαρότητας της προεκλαμψίας) συνοδεύεται με αύξηση της συγκέντρωσης στον ορό της humanin. Αντίθετα, παρατηρείται αρνητική συσχέτιση με το βάρος γέννησης των νεογνών, καθώς όσο αυξάνεται η σοβαρότητα της προεκλαμψίας, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα προωρότητας και καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου (χαμηλό βάρος γέννησης).

Συμπερασματικά, η προεκλαμψία αποτελεί μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μητροπλακουντιακή και μητρική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (69). Χαρακτηρίζεται, επιπλέον, από υπέρταση και αυξημένη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση, που πιθανώς ξεκινά από την εκτεταμένη ενδοθηλιακή βλάβη. Οι ασθενείς με προεκλαμψία παρουσιάζουν, επίσης, αυξημένο οξειδωτικό στρες. Η υπέρταση, που σχετίζεται με την προεκλαμψία, αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της προχωρημένης εγκυμοσύνης και υποχωρεί μετά τον τοκετό ή τον τερματισμό της κύησης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο πλακούντας είναι

ο κεντρικός ένοχος για την εμφάνιση της νόσου. Η κύρια υπόθεση σχετικά με την έναρξη της προεκλαμψίας υποστηρίζει την μείωση της αιμάτωσης του πλακούντα που, με τη σειρά του, οδηγεί σε εκτεταμένη δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου της μητέρας (130). Με την παρούσα μελέτη διαπιστώνεται ότι τα επίπεδα της humanin στον ορό προεκλαμπτικών γυναικών είναι αυξημένα σε σχέση με τις νορμοτασικές εγκύους. Με την παρατήρηση αυτή ενισχύεται, ίσως, η άποψη της πλακουντικής ισχαιμίας/ υποξίας και της καρδιαγγειακής δυσλειτουργίας που είναι ευρέως αναγνωρισμένες ως μέρος του συνδρόμου της προεκλαμψίας. Περαιτέρω μελέτες, όμως, απαιτούνται για την αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης της humanin, καθώς και για τη διερεύνηση του πιθανού διαγνωστικού και θεραπευτικού της ρόλου στην υπερτασική νόσο της κύησης. Επιπλέον, ενδιαφέρον θα αποτελούσε να εξετασθεί η δυνατότητα χρήσης της humanin ως βιοχημικού δείκτη της ΡΕ. Οι παραπάνω μελέτες διευρύνουν το επίπεδο δράσης της humanin και δημιουργούν προοπτικές για καινοτόμες έρευνες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2013;
2. Al-Jameil N, Aziz Khan F, Fareed Khan M, Tabassum H. A Brief Overview of Preeclampsia. J Clin Med Res [Internet]. 2014 Feb [cited 2014 Apr 20];6(1):1–7.
3. Gray MW. Mitochondrial evolution. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2012 Sep [cited 2014 Apr 30];4(9):a011403.
4. Wallace DC. Bioenergetic origins of complexity and disease. Cold Spring Harb Symp Quant Biol [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 May 11];76:1–16.
5. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. Cell [Internet]. 2012 Mar 16 [cited 2014 Apr 29];148(6):1145–59.
6. Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. 2013;
7. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev [Internet]. 2001 Nov 15 [cited 2014 May 18];15(22):2922–33.
8. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 May 18];1813(4):558–63.
9. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell [Internet]. 2005 Mar 25 [cited 2014 Apr 29];120(4):483–95.
10. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). Exp Gerontol [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 May 6];45(6):410–8.
11. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009 May 26 [cited 2014 May 18];106(21):8665–70.
12. Drago I, Pizzo P, Pozzan T. After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. EMBO J [Internet]. 2011 Oct 19 [cited 2014 May 5];30(20):4119–25.

13. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 Oct [cited 2014 May 8];12(10):685–98.
14. Verdin E, Hirschey MD, Finley LWS, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2010 Dec [cited 2014 May 17];35(12):669–75.
15. Ganta VC, Alexander JS. Focus on carbon monoxide: a modulator of neutrophil oxidants and elastase spatial localization? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2014 May 18];297(3):H902–4.
16. Ichikawa Y, Bayeva M, Ghanefar M, Potini V, Sun L, Mutharasan RK, et al. Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2014 May 18];109(11):4152–7.
17. Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Feb 26 [cited 2014 May 6];37(4):529–40.
18. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 May 8];12(3):222–30.
19. Durieux J, Wolff S, Dillin A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* [Internet]. 2011 Jan 7 [cited 2014 Apr 29];144(1):79–91.
20. Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, et al. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001/05/01 ed. 2001;283(2):460–8.
21. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001/05/24 ed. 2001;98(11):6336–41.
22. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*. 2003/05/07 ed. 2003;423(6938):456–61.
23. Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, et al. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various

- Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci* [Internet]. 2001/11/22 ed. 2001;21(23):9235–45.
24. Luciano F, Zhai D, Zhu X, Bailly-Maitre B, Ricci JE, Satterthwait AC, et al. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem* [Internet]. 2005/01/22 ed. 2005;280(16):15825–35.
  25. Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee KW, Niikura T, et al. Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003/10/17 ed. 2003;100(22):13042–7.
  26. Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L, et al. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arter Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2010/07/24 ed. 2010;30(10):1940–8.
  27. Hashimoto Y, Nawa M, Kurita M, Tokizawa M, Iwamatsu A, Matsuoka M. Secreted calmodulin-like skin protein inhibits neuronal death in cell-based Alzheimer's disease models via the heterotrimeric Humanin receptor. *Cell Death Dis* [Internet]. 2013/03/23 ed. 2013;4:e555.
  28. Zhai D, Luciano F, Zhu X, Guo B, Satterthwait AC, Reed JC. Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *J Biol Chem* [Internet]. 2005/01/22 ed. 2005;280(16):15815–24.
  29. Ying G, Iribarren P, Zhou Y, Gong W, Zhang N, Yu ZX, et al. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol* [Internet]. 2004/05/22 ed. 2004;172(11):7078–85.
  30. Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci*. 2005/07/12 ed. 2005;77(24):3092–104.
  31. Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2009/04/24 ed. 2009;20(12):2864–73.
  32. Hashimoto Y, Kurita M, Matsuoka M. Identification of soluble WSX-1 not as a dominant-negative but as an alternative functional subunit of a receptor for an anti-Alzheimer's

- disease rescue factor Humanin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009/08/26 ed. 2009;389(1):95–9.
33. Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2009/12/10 ed. 2010;41(1):22–8.
  34. Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Ishizaka M, Yamagishi Y, Kawasumi M, et al. A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci.* 2003/04/03 ed. 2003;17(6):1150–8.
  35. Rossini L, Hashimoto Y, Suzuki H, Kurita M, Gianfriddo M, Scali C, et al. VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin. 2011;(4).
  36. Mamiya T, Ukai M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2001/12/12 ed. 2001;134(8):1597–9.
  37. Krejcova G, Patocka J, Slaninova J. Effect of humanin analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats. *J Pept Sci.* 2004/11/06 ed. 2004;10(10):636–9.
  38. Niikura T, Sidahmed E, Hirata-Fukae C, Aisen PS, Matsuoka Y. A humanin derivative reduces amyloid beta accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice. *PLoS One* [Internet]. 2011/01/26 ed. 2011;6(1):e16259.
  39. Miao J, Zhang W, Yin R, Liu R, Su C, Lei G, et al. S14G-Humanin ameliorates Abeta25-35-induced behavioral deficits by reducing neuroinflammatory responses and apoptosis in mice. *Neuropeptides.* 2008/10/22 ed. 2008;42(5-6):557–67.
  40. Zhang W, Miao J, Hao J, Li Z, Xu J, Liu R, et al. Protective effect of S14G-humanin against beta-amyloid induced LTP inhibition in mouse hippocampal slices. *Peptides.* 2009/05/26 ed. 2009;30(6):1197–202.
  41. Zhang W, Li Z, Hao J, Zhang Z, Liu L, Mao N, et al. S14G-humanin improves cognitive deficits and reduces amyloid pathology in the middle-aged APPswe/PS1dE9 mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011/10/14 ed. 2012;100(3):361–9.
  42. Kariya S, Hirano M, Nagai Y, Furiya Y, Fujikake N, Toda T, et al. Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2005/03/24 ed. 2005;25(2):165–9.

43. Colon E, Strand ML, Carlsson-Skwirut C, Wahlgren A, Svechnikov K V, Cohen P, et al. Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis. *J Cell Physiol*. 2006/04/19 ed. 2006;208(2):373–85.
44. Kariya S, Hirano M, Furiya Y, Sugie K, Ueno S. Humanin detected in skeletal muscles of MELAS patients: a possible new therapeutic agent. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2005/03/11 ed. 2005;109(4):367–72.
45. Kin T, Sugie K, Hirano M, Goto Y, Nishino I, Ueno S. Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Hum Genet*. 2006/04/28 ed. 2006;51(6):555–8.
46. Kariya S, Hirano M, Furiya Y, Ueno S. Effect of humanin on decreased ATP levels of human lymphocytes harboring A3243G mutant mitochondrial DNA. *Neuropeptides*. 2005/03/09 ed. 2005;39(2):97–101.
47. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism* [Internet]. 2009/10/06 ed. 2010;59(3):343–9.
48. Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer’s disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. *Neurobiol Aging*. 2005/11/04 ed. 2005;26 Suppl 1:65–9.
49. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S, et al. Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS One* [Internet]. 2009/07/23 ed. 2009;4(7):e6334.
50. Lee C, Wan J, Miyazaki B, Fang Y, Guevara-Aguirre J, Yen K, et al. IGF-I regulates the age-dependent signaling peptide humanin. *Aging Cell* [Internet]. 2014 Jul 18 [cited 2014 Jul 22];
51. Mottaghi-Dastjerdi N, Soltany-Rezaee-Rad M, Sepehrizadeh Z, Roshandel G, Ebrahimifard F, Setayesh N. Genome expression analysis by suppression subtractive hybridization identified overexpression of Humanin, a target gene in gastric cancer chemoresistance. *Daru* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Apr 17];22(1):14.

52. Cohen P. New role for the mitochondrial Peptide humanin: protective agent against chemotherapy-induced side effects. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2014 Apr 17];106(3):dju006.
53. Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke* [Internet]. 2006/09/09 ed. 2006;37(10):2613–9.
54. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2007/05/19 ed. 2007;85(14):3036–40.
55. Manuscript A. Protective effects of tetramethylpyrazine on rat retinal cell cultures. 2009;52(6):1176–87.
56. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2004/11/13 ed. 2005;25(1):29–38.
57. Targonski P V, Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes Jr. DR, Lerman A. Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation* [Internet]. 2003/05/29 ed. 2003;107(22):2805–9.
58. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Hear J* [Internet]. 2010/02/26 ed. 2010;31(9):1142–8.
59. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arter Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2003/02/18 ed. 2003;23(2):168–75.
60. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* [Internet]. 2012/08/08 ed. 2012;126(6):753–67.
61. Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, Wan J, Cohen P, Lerman O, et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function 2013;(December 2012).
62. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2010/06/22 ed. 2010;88(2):360–6.
63. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*. 2005/11/18 ed. 2006;185(2):219–26.



64. Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, Kim SG, Wan J, Cobb LJ, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011/07/19 ed. 2011;219(1):65–73.
65. Zacharias DG, Kim SG, Massat AE, Bachar AR, Oh YK, Herrmann J, et al. Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic [corrected] plaques in humans. *PLoS One* [Internet]. 2012/02/14 ed. 2012;7(2):e31065.
66. Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2008/10/28 ed. 2009;50 Suppl:S382–7.
67. Aisling Murphy M, Carla Janzen M, Stacy L. Strehlow M, Jeffrey S. Greenspoon M, Sue M. Palmer M. *CURRENT Treatment & Diagnosis- Obstetrics & Gynecology*. United States of America: McGraw-Hill; 2013.
68. Craici I, Wagner S, Garovic VD, Manuscript A. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? *Ther Adv Cardiovasc Dis* [Internet]. 2009/01/07 ed. 2008;2(4):249–59.
69. Shaker O, Sadik N. Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2013/03/22 ed. 2013;
70. Heidrich MB, Wenzel D, von Kaisenberg CS, Schippert C, von Versen-Hoyneck FM. Preeclampsia and long-term risk of cardiovascular disease: what do obstetrician-gynecologists know? *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2013/03/19 ed. 2013;13:61.
71. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* [Internet]. 2010/07/06 ed. 2010;376(9741):631–44.
72. Stillman IE, Karumanchi SA. The glomerular injury of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol*. 2007/07/20 ed. 2007;18(8):2281–4.
73. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005/03/04 ed. 2005;330(7491):565.
74. Saftlas AF, Olson DR, Franks AL, Atrash HK, Pokras R. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1990 Aug [cited 2014 May 19];163(2):460–5.
75. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, et al. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal

- Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2014 May 19];172(2 Pt 1):642–8.
76. Zhang J, Meikle S, Trumble A. Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Pregnancy* [Internet]. 2003 Jan [cited 2014 May 19];22(2):203–12.
  77. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* [Internet]. 2001/02/24 ed. 2001 Jan 6 [cited 2014 May 19];357(9249):53–6.
  78. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1989 Nov [cited 2014 May 19];161(5):1200–4.
  79. Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol*. 2000/03/10 ed. 2000;24(1):24–8.
  80. Lafayette RA, Druzin M, Sibley R, Derby G, Malik T, Huie P, et al. Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia. *Kidney Int* [Internet]. 1998 Oct [cited 2014 May 19];54(4):1240–9.
  81. Wang A, Rana S, Karumanchi SA, Yang W, Wagener J, Wolf N, et al. Preeclampsia : The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *News Physiol Sci*. 2009/06/11 ed. 2009;24:147–58.
  82. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int* [Internet]. 2005/05/11 ed. 2005 Jun [cited 2014 May 15];67(6):2101–13.
  83. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2010/03/25 ed. 2010;63(6):534–43.
  84. Fan P, Liu XH, He GL, Zhang S, Zhang JX, Bai H. Maternal and fetal plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity and distribution in pre-eclampsia. *Pediatr Res*. 2012/07/17 ed. 2012;72(4):426–31.
  85. Salles AM, Galvao TF, Silva MT, Motta LC, Pereira MG, Magalhaes A, et al. Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic review. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2012/05/18 ed. 2012;2012:243476.
  86. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res*. 2002/06/29 ed. 2002;90(12):1274–81.

87. Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpaci R, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med*. 2004/10/27 ed. 2004;204(3):195–202.
88. Schramm AM, Clowse MEB. Aspirin for prevention of preeclampsia in lupus pregnancy. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jul 26];2014:920467.
89. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Mar [cited 2014 May 2];111(5):649–58.
90. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* [Internet]. 2006 Jun [cited 2014 May 7];12(6):642–9.
91. Salafia CM, Pezzullo JC, Ghidini A, Lopèz-Zeno JA, Whittington SS. Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre-eclampsia. *Placenta* [Internet]. 1998 Jan [cited 2014 May 19];19(1):67–72.
92. North RA, Ferrier C, Long D, Townend K, Kincaid-Smith P. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1994 Mar [cited 2014 May 19];83(3):378–86.
93. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* [Internet]. 1994 Aug [cited 2014 May 19];101(8):669–74.
94. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2014 May 19];99(9):2139–51.
95. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2014 May 19];99(9):2152–64.

96. Cunningham, Leveno, Bloom, Hauth, Rouse S. Williams Obstetrics. 23rd ed. Mc Graw Hill, editor. 2010.
97. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1997/03/01 ed. 1997;37(3):240–9.
98. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens*. 1991/08/01 ed. 1991;4(8):700–8.
99. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN, et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1999 Oct [cited 2014 May 19];181(4):915–20.
100. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Apr [cited 2014 May 19];103(7):945–52.
101. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP, et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2007/12/07 ed. 2008;294(2):H541–50.
102. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 Apr [cited 2014 May 19];160(4):1405–23.
103. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005/10/19 ed. 2005;46(5):1077–85.
104. Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the “chicken-and-egg” question. *Endocrinology*. 2004/10/19 ed. 2004;145(11):4835–7.
105. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K-H, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Feb 12 [cited 2014 May 2];350(7):672–83.

106. Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension* [Internet]. 2007 Jul [cited 2014 May 19];50(1):137–42.
107. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2014 May 19];113(1):17–20.
108. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int* [Internet]. 2007 May [cited 2014 May 15];71(10):977–84.
109. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, et al. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 May 19];291(4):R1085–93.
110. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Jun [cited 2014 May 19];103(12):1641–50.
111. Fong FM, Sahemey MK, Hamed G, Eyitayo R, Yates D, Kuan V, et al. Maternal Genotype and Severe Preeclampsia: A Huge Review. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2014 Jul 26];
112. Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Khoury M, Illanes SE. Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jul 26];5:244.
113. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* [Internet]. 2005/03/01 ed. 2005 [cited 2014 May 19];365(9461):785–99.
114. Lachmeijer AM, Arngrímsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardóttir S, et al. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2001 Oct [cited 2014 May 19];9(10):758–64.
115. Keyes LE, Armaza JF, Niermeyer S, Vargas E, Young DA, Moore LG. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res* [Internet]. 2003 Jul [cited 2014 May 19];54(1):20–5.
116. Chesley LC. History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 1984 Dec [cited 2014 May 19];27(4):801–20.

117. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Asp Med*. 2007/04/17 ed. 2007;28(2):192–209.
118. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online*. 2006/12/16 ed. 2006;13(5):680–6.
119. Catov JM, Ness RB, Kip KE, Olsen J. Risk of early or severe pre-eclampsia related to pre-existing conditions. *Int J Epidemiol [Internet]*. 2007 Apr [cited 2014 May 2];36(2):412–9.
120. Fink JC, Schwartz SM, Benedetti TJ, Stehman-Breen CO. Increased risk of adverse maternal and infant outcomes among women with renal disease. *Paediatr Perinat Epidemiol [Internet]*. 1998 Jul [cited 2014 May 19];12(3):277–87.
121. Polak G, Wertel I, Barczynski B, Kwasniewski W, Bednarek W, Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol*. 2013/01/29 ed. 2013;
122. Hilali N, Vural M, Camuzcuoglu H, Camuzcuoglu A, Aksoy N. Increased prolidase activity and oxidative stress in PCOS. *Clin Endocrinol*. 2012/11/21 ed. 2012;
123. Kim EJ, Chung N, Park SH, Lee KH, Kim SW, Kim JY, et al. Involvement of oxidative stress and mitochondrial apoptosis in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. *J Urol*. 2012/12/25 ed. 2013;189(2):588–94.
124. Naher ZU, Ali M, Biswas SK, Mollah FH, Fatima P, Hossain MM, et al. Effect of oxidative stress in male infertility. *Mymensingh Med J*. 2013/02/19 ed. 2013;22(1):136–42.
125. Gohil JT, Patel PK, Gupta P. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defence in subjects of preeclampsia. *J Obs Gynaecol India*. 2012/12/04 ed. 2011;61(6):638–40.
126. Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens*. 2010/05/15 ed. 28(7):1349–55.
127. Garovic VD, August P. Preeclampsia and the Future Risk of Hypertension: The Pregnant Evidence. *Curr Hypertens Rep [Internet]*. 2013;1–8.
128. Schausberger CE, Jacobs VR, Bogner G, Wolfrum-Ristau P, Fischer T. Hypertensive Disorders of Pregnancy - A Life-Long Risk? *Geburtshilfe Frauenheilkd [Internet]*. 2013;73(1):47–52.
129. Ahmed R, Dunford J, Mehran R, Robson S, Kunadian V. Preeclampsia and Future Cardiovascular Risk among Women: A Review. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2014 Feb 21 [cited 2014 Apr 5];

130. Sibai BM, Ewell M, Levine RJ, Klebanoff MA, Esterlitz J, Catalano PM, et al. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1997 Nov [cited 2014 May 19];177(5):1003–10.