



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ:ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA

Δήμητρα Καλαντζή
ειδικευόμενη ιατρός Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Γ.Ν.Λάρισας

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2015

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Επιβλέπων: Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής
Σύμβουλος: Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ
Τριμελής Επιτροπή :
Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής
Μαρία Σάτρα, ΕΔΙΠ
Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ miRNA

Περιεχόμενα	Σελίδες
1. Εισαγωγή	5
1.1 Παράγοντες κινδύνου και παθογένεση της προεκλαμψίας	5
2. Νέοι προγνωστικοί δείκτες για την εμφάνιση της ΡΕ	10
2.1 Η πρωτεΐνη Corin ως προγνωστικός δείκτης της προεκλαμψίας	10
2.2 Το μόριο Coreptin ως δείκτης στην εκτίμηση της προεκλαμψίας	13
3. Δομή και λειτουργία των microRNAs (miRNAs)	15
3.1 Ρόλος της miRNAs στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης	18
3.2 Η συμμετοχή των μικρών μορίων mRNA στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της φλεγμονής	19
3.3 Τοπική βιοσύνθεση των οιστρογόνων και η συμμετοχή των μικρών μορίων RNA	20
3.4 Η αντίσταση της προγεστερόνης και η συμμετοχή των μικρών μορίων RNA	20
3.5 Η επιβίωση των κυττάρων και η κυτταρική εισβολή	22
3.6 Εξωκυττάρια αναδιαμόρφωση της μήτρας	22
3.7 Αγγειογένεση	22
3.8 Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και miRNAs σε καταστάσεις ενδομητρίωσης	23

3.9 Τα microRNAs στην εγκυμοσύνη	24
3.10 Η ανάλυση των μικρών μορίων miRNAs ως πιθανά διαγνωστικά εργαλεία	25
4. Καθ' εξίν αποβολές και η συμμετοχή των μικρών μορίων miRNA στην εξέλιξη του φαινομένου	27
4.1 Η ανίχνευση ειδικών μορίων miRNAs στην ανθρώπινη κυκλοφορία κατά την εγκυμοσύνη	29
4.2 Η έκφραση miRNA στον πλακούντα	31
4.3 miRNAs σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα	33
4.4 Συμμετοχή των miRNA στη ρύθμιση της ανοσοανοχής σε μητέρα και έμβρυο	35
5. Τα σχετιζόμενα με την εγκυμοσύνη miRNAs στο μητρικό περιφερικό αίμα	36
6. Η συσχέτιση των μικρών μορίων miRNA στην εμφάνιση προεκλαμψίας	37
6.1 Μοριακοί μηχανισμοί εμφάνισης της προεκλαμψίας	43
6.2 Βιογένεση και λειτουργία των μικρών μορίων miRNAs και η σχέση τους με την προεκλαμψία	45
6.3 Ειδικά μόρια miRNAs που εκφράζονται από τον πλακούντα σε ασθενείς με προεκλαμψία	48
6.4 Διαφορική έκφραση των μικρών μορίων miRNAs στον ανθρώπινο	51

πλακούντα	
6.5 Η miRNA-κατευθυνόμενη γονιδιακή έκφραση στον πλακούντα	54
6.6 Η οικογένεια μικρών μορίων miR-17 και η έκφραση τους στον πλακούντα σε γυναίκες με προεκλαμψία	58
6.7 Ο ρόλος των μικρών μορίων miR-17 και των παραγόντων EFNΒ2- EphΒ4 στην εξέλιξη της παθογένεσης της προεκλαμψίας	61
Συμπεράσματα	64
Βιβλιογραφία	66

1. Εισαγωγή

1.1 Παράγοντες κινδύνου και παθογένεση της προεκλαμψίας

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της προεκλαμψίας (PE) σε άτοκες γυναίκες αντικατοπτρίζει την μητρική ανοσολογική απόκριση σε καταστάσεις εγκυμοσύνης. Οι συμβατικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της PE περιλαμβάνουν τη χρόνια υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη, την μητρική ηλικία, την παχυσαρκία, τις προηγούμενες περιπτώσεις και το ιστορικό PE, την θρομβοφιλία, την συνυπάρχουσα αυτοάνοση διαταραχή, την αγγειακή ασθένεια, την εθνικότητα και τους πολλαπλούς τοκετούς [Urbich et al 2006, Bartel et al 2004].

Προϋπάρχοντες παράγοντες κινδύνου διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη μεταβολή της ευαισθησίας προς τις προσαρμοστικές αλλαγές που εμπλέκονται στην εγκυμοσύνη και έτσι μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία σε ασθενείς με PE.

Η παθογένεση της PE ωστόσο ακόμη και σήμερα παραμένει ελάχιστα κατανοητή λόγω της ετερογενούς, πολυ-συστηματικής φύσης της ασθένειας. Οι διάφορες θεωρίες έχουν τεθεί μέχρι σήμερα ώστε να μπορέσουν να εξηγήσουν την παθογένεια της PE και περιλαμβάνουν τη γενετική προδιάθεση, την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, την ισχαιμία του πλακούντα και την φλεγμονή [Urbich et al 2006, Bartel et al 2004].

Η αποτυχία της κατάλληλης εισδοχής της τροφοβλάστης της μητέρας και των σπειροειδών αρτηριών της κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης παραμένει η πιο ελπιδοφόρα εξήγηση για την παθογένεση της νόσου [Chen et al 2012]. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης, το αναπτυσσόμενο έμβρυο λαμβάνει διατροφή και παροχή οξυγόνου μέσω των μητρικών σπειροειδών αρτηριών. Για να ταιριάζει το ανατομικό σύστημα της μητέρας με την αυξανόμενη ζήτηση του οξυγόνου και των

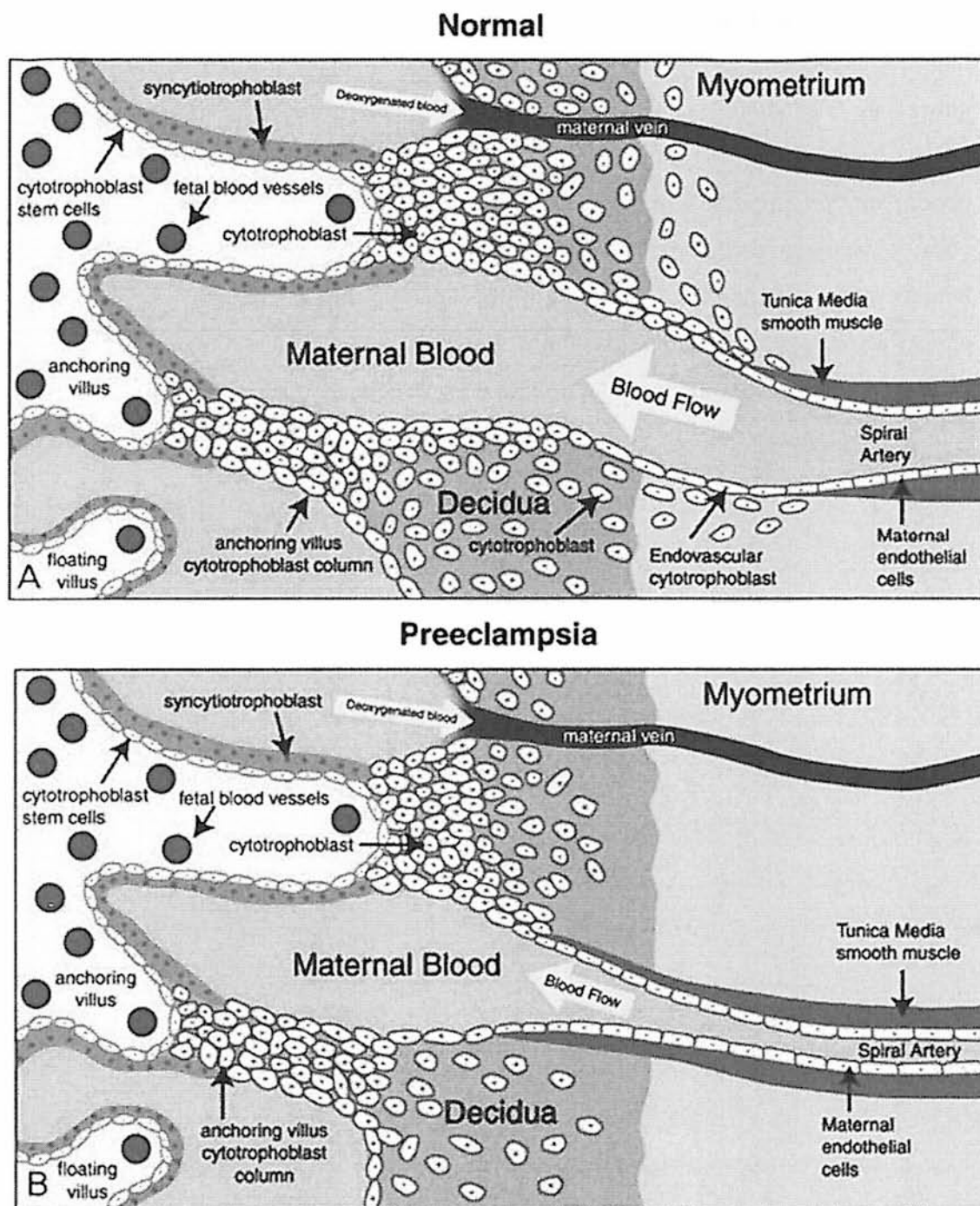
θρεπτικών συστατικών, οι αρτηρίες υφίστανται αγγειακή αναδιαμόρφωση [Agostinis et al 2012, Gilad et al 2008].

Η διαδικασία της αγγειακής αναδιαμόρφωσης ξεκινά στο πρώτο τρίμηνο και ολοκληρώνεται στις 18-20 βδομάδες της κύησης [Gilad et al 2008]. Ο σκοπός της αναδιαμόρφωσης είναι η μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών της μητέρας από αρτηρίες υψηλής αντοχής και χαμηλής χωρητικότητας, σε αιμοφόρα αγγεία με χαμηλή αντίσταση και μεγάλη χωρητικότητα. Η αγγειακή αναδιαμόρφωση συμβαίνει κατά το χρονικό διάστημα των 8-12 εβδομάδων της κύησης, περίοδο κατά την οποία τα εξωλαχνωτά κύτταρα της τροφοβλάστης εισβάλλουν στο φθαρτό τμήμα των σπειροειδών αρτηριών [Wang et al 2009].

Τα κύτταρα της τροφοβλάστης μετατρέπονται από υψηλής αντοχής σε επιθηλιακά κύτταρα χαμηλής αντίστασης και ενδοθηλιακής προέλευσης που επιτρέπουν την δημιουργία βιώσιμων συνθηκών κατά την εγκυμοσύνη [Wang et al 2009].

Η ανάπτυξη της PE λαμβάνει χώρα σε δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η εισβολή της τροφοβλάστης περιορίζεται στο εξωτερικό ενδομήτριο ενώ οι μητρικές σπειροειδείς αρτηρίες αναπτύσσονται στο μυομήτριο, οδηγώντας έτσι στην μεταβολή του μυοελαστικού φαινοτύπου [Muralimanoharan et al 2012]. Η ανεπαρκής τροφοβλαστική εισβολή οδηγεί στην μείωση της εμβρυϊκής επιφανειακής περιοχής και στην αύξηση της αντίστασης της ροής στις μητροπλακούντιες αρτηρίες, γεγονός που οδηγεί σε υποαιμάτωση και υποξία του πλακούντα [Dai et al 2012]. Το δεύτερο στάδιο χαρακτηρίζεται από υποξία και υποαιμάτωση μέσω της μεσολαβούμενης συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης, απελευθερώνοντας διάφορους φλεγμονώδεις, αντιαγγειογενετικούς και αγγειοενεργούς παράγοντες στην κυκλοφορία [Dai et al 2012]. Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε μητρική συστηματική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δηλαδή στην ενεργοποίηση του συστήματος πήξης, σε αγγειοσυστολή, σε αιμόλυση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της πρωτεϊνουρίας και της υπέρτασης, στοιχεία που είναι τα κλινικά χαρακτηριστικά της PE [Fu et al 2012].

Η απόλυτη αξιολόγηση της παθοφυσιολογίας της νόσου καθώς και η έλλειψη αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων διάγνωσης της PE, αποτελούν τις κύριες μελλοντικές προκλήσεις για τους κλινικούς γιατρούς. Η παρακολούθηση του πλακούντα παραμένει η μόνη αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση για την αξιολόγηση των συμπτωμάτων της PE. Εξ' ου και η ταυτοποίηση νέων, κλινικά αποτελεσματικών βιοδεικτών για την έγκαιρη πρόβλεψη της PE αποτελούν βασικό τομέα της έρευνας. Η ενιαία ή η συνδυαστική παρακολούθηση των βιοδεικτών μπορεί να επιτρέψει την παρακολούθηση των ασθενών υψηλού κινδύνου για PE καθώς και την ορθή παρακολούθηση των ασθενών που θα μειώσει τις κακές ή αδιάγνωστες περιπτώσεις [Gunnel et al 2011].



Εικόνα 1. Η είσοδος της τροφοβλάστης στο μυομήτριο και ο σχηματισμός αγγειακού δικτύου.

Οι βιοδείκτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι για την ανάπτυξη αποτελεσματικών παρεμβάσεων κατά της PE. Οι υφιστάμενοι βιοδείκτες πρόγνωσης δημιουργούν την ανάγκη για την εύρεση νέων βιοδεικτών με στόχο την αποτελεσματική πρόληψη της PE, που αποσκοπεί στην κατάλληλη προγεννητική επιτήρηση και στη χρήση της προφυλακτικής αγωγής, όπως σε περιπτώσεις χορήγησης χαμηλής δόσης ασπιρίνης.

Η προφυλακτική χρήση χαμηλής δόσης ασπιρίνης μπορεί είναι επωφελής, εάν ξεκινήσει νωρίς κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, δηλαδή στις ή πριν από τις 16 εβδομάδες κύησης [Hromadnikova et al 2014]. Η αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών, η οποία αρχίζει κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, εξασφαλίζει της αύξηση της προσφοράς αίματος με την μείωση της αντίσταση της ροής του αίματος και την υψηλή μητροπλακουντιακή αιμάτωση [Wulfken et al 2011]. Η διαδικασία της ανακατασκευής είναι ένα κρίσιμο προσαρμοστικό σημεία αλλαγής στην μήτρα της εγκυμονούσας μητέρας που προκαλείται από ποικίλα μόρια όπως αγγειογόνους παράγοντες, ορμόνες, μόρια προσκόλλησης, αγγειοδιασταλτικές ουσίες και άλλα [Zang et al 2013, Wu et al 2013].

Από την άλλη τα ελαττωματικά μόρια σηματοδότησης οδηγούν στην απομείωση της αγγειακής αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών και ως εκ τούτου στην παθογένεση της PE, με πολλές μελέτες να έχουν αναλύσει τα μόρια αυτά ως πιθανούς προγνωστικούς δείκτες της πρόωρης PE [Choi et al 2013, Guo et al 2013]. Τα αυξημένα επίπεδα αντιαγγειογενετικών παραγόντων όπως η διαλυτού τύπου κινάση της τυροσίνης (SFlt-1) και διαλυτή ενδογλίνη (Seng) που εντοπίζονται στο πλακούντα έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις PE γυναικών σε κύηση πριν τις 12 εβδομάδες, αλλά έχουν φτωχή προγνωστική αξία και χρειάζονται μεγαλύτερη παρακολούθηση για να έχουν κλινική εφαρμογή ως προγνωστικοί δείκτες [Zhang et al 2013, Iwaya et al 2013].

Πρόσθετες μελέτες έχουν εξετάσει τα κυκλοφορούντα επίπεδα της πρωτεΐνη-A (PAPP-A), της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και της ιντερλευκίνης - 1β (IL-1β) στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης ως προγνωστικούς δείκτες, αλλά αυτά τα μόρια

φαίνεται να έχουν κακή προγνωστική αξία για γυναίκες με PE [Shin et al 2011]. Οι Moore et al., σε μια προοπτική μελέτη στην οποία χρησιμοποίησαν δείγματα ορού γυναικών με αυξημένους παράγοντες κινδύνου για PE έχουν διατυπώσει την άποψη ότι τα μόρια αυτά έχουν υψηλή προγνωστική αξία σε σχέση με τα μόρια sFlt1 και τον παράγοντα ανάπτυξης PlGF, για την έγκαιρη διάγνωση και ανάπτυξη της PE στις 22-26 εβδομάδες της κύησης, χωρίς να βρίσκεται σημαντική συσχέτιση σε γυναίκες που ανέπτυξαν όψιμη PE [Moore et al 2007].

Ομοίως, σε άλλες διαστρωματικές αναλύσεις υγιών άτοκων γυναικών, οι Levine et al απέδειξαν κακή προγνωστική αξία των αυξημένων επιπέδων της αναλογίας sFlt1:PlGF του ορού σε χρονικό διάστημα μελέτης από 21 έως 32 εβδομάδες κύησης σε περιπτώσεις καθυστερημένης έναρξης PE [Levine et al 2006].

Η πολυπαραγοντική φύση της PE έχει οδηγήσει στην χρήση βιοχημικών και βιοφυσικών δεικτών για την έγκαιρη πρόβλεψη και διάγνωση. Οι βιοφυσικοί δείκτες όπως το Doppler μητριάων αρτηριών (UAD) και μέση αρτηριακή πίεση σε συνδυασμό με αγγειογονικούς / αντι-αγγειογονικούς παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για την πρόβλεψη της PE [Roos et al 2009]. Σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 9149 γυναίκες με μονήρεις εγκυμοσύνες, οι Poj et al απέδειξαν υψηλή προγνωστική δυναμική αξία στην αξιολόγηση της αιματικής ροής Doppler.

Η μέθοδος αυτή σε συνδυασμό με το ιστορικό της μητέρας και τους δείκτες ανευπλοειδίας, έδειξε καλύτερη προγνωστική αξία για ασθενείς με PE κατά το πρώτο τρίμηνο (AUC = 0,96) [Roos et al 2009]. Αν και οι προβλέψεις των αγγειογόνων / αντι-αγγειογόνων παραγόντων ενισχύονται όταν συνδυάζονται από το πρώτο τρίμηνο UAD-PI (AUC = 0,74), ωστόσο υπάρχουν και αρκετοί περιορισμοί στην εκτέλεση των αναλύσεων UAD όπως το γεγονός ότι αυτές πρέπει να γίνονται από έμπειρους υπερηχογραφιστές, να έχουν τυποποιημένη μεθοδολογία για την ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων της μελέτης, καθώς και ο περιορισμός χρήσης των UAD ως προγνωστικούς δείκτες, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες [Odibo et al 2013].

Οι Kusanovic et al σε μια μεγάλη διαχρονική μελέτη, ανέλυσαν δείγματα πλάσματος από γυναίκες που ήταν σε περίοδο εγκυμοσύνης από 6-15 και 20-25 εβδομάδες κύησης και βρήκε χαμηλή προγνωστική αξία για τους δείκτες sFlt-1, Placental Growth Factor (PIGF) και την αναλογία Placental Growth Factor / sFlt-1. Σε περιπτώσεις πρώιμης κύησης, τα αποτελέσματα ανάλυσης αυτών των μελετών έδειξαν ότι οι δείκτες αυτοί είχαν φτωχή προγνωστική αξία μέσα στο πρώτο τρίμηνο (10 - 12 εβδομάδες της κύησης) [Kusanovic et al 2009].

Σε μια μεγαλύτερη προοπτική μελέτη, οι αγγειογενετικοί παράγοντες από μόνοι τους ή και σε συνδυασμό με UAD αξιολογήθηκαν για την έγκαιρη πρόβλεψη από PE σε περιόδους κύησης 22-26 εβδομάδων. Φάνηκε λοιπόν ότι ενώ τα επίπεδα PIGF στο πλάσμα της μητέρας έδειξαν υψηλή προγνωστική αξία για την αναγνώριση της πρώιμης έναρξης της προεκλαμψίας (AUC = 0,80) με συνοδές σοβαρές περιπτώσεις (AUC = 0,789), τα στοιχεία για τους δείκτες Flt-1 έχουν δείξει χαμηλή προγνωστική αξία [Espinosa et al 2007]. Ομοίως, σε μια άλλη προοπτική μελέτη ασθενών-μαρτύρων βρέθηκε η χαμηλή διακριτική δυναμική των Placental Growth Factor, sFlt-1 και Seng στο να διακρίνει τις περιπτώσεις προεκλαμψίας από τους ελέγχους σε φυσιολογικές γυναίκες [Srinivas et al 2011].

2. Νέοι προγνωστικοί δείκτες για την εμφάνιση της PE

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει και προτείνει βιοδείκτες που σχετίζονται με τη πορεία και την εξέλιξη της PE, συμπεριλαμβανομένων των Seng, sFlt-1, Placental Growth Factor. Ωστόσο, διαφορετικές μελέτες ανέφεραν αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των εν λόγω δεικτών στην πρόβλεψη της PE. Η ταυτοποίηση νέων δυναμικών δεικτών για την πρόβλεψη της PE είναι κλινικής σημασίας λόγω της περιορισμένης ευαισθησίας και της ειδικότητας των υπάρχοντων ταυτοποιημένων βιοδεικτών.

2.1 Η πρωτεΐνη Corin ως προγνωστικός δείκτης της προεκλαμψίας

Το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP) είναι μια καρδιακή πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και της ομοιόστασης

του νατρίου [Zhou et al 2009, Wu et al 2009]. Για να ξεκινήσει την φυσιολογική του δράση το ANP, θα πρέπει να μετατραπεί από ανενεργό πρόδρομο ANP (pro-ANP) σε ενεργό ώριμο ANP. Συγκεκριμένα το 1999 προσδιορίστηκε μια νέου τύπου πρωτεάση σερίνης στην καρδιά, η Corin που αποτελείτο από 1042 αμινοξέα και ήταν μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί το pro-ANP σε ενεργό ANP. Η βιολογική λειτουργία του Corin προέρχεται από την διάσπαση της pro-ANP, κατά την απελευθέρωση της από τους κόκκους των καρδιομυοκυττάνων, στο αμινοξικό κατάλοιπο Arg-98, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα δραστικό κατάλοιπο ANP [Zhou et al 2009].

Η Corin αποτελείται από διακριτές περιοχές οι οποίες περιλαμβάνουν την N-τερματική κυτταροπλασματική ουρά, την διαμεμβρανική περιοχή και την εξωκυτταρική περιοχή. Η εξωκυτταρική περιοχή αποτελείται από δύο υποπεριοχές, που μπορούν αν συνδέονται σε θέσεις του χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικού υποδοχέα (LDLR). Ανάλογα με το βαθμό της N-γλυκοζυλίωσης, το μοριακό βάρος κυμαίνεται από 150-200 kDa. Η N-γλυκοζυλίωση της Corin είναι απαραίτητη για την έκφραση της κυτταρικής επιφάνειας της σχετικά με τα καρδιομυοκύτταρα και την διαμόρφωση της βιολογικής δραστηριότητας [Wu et al 2009].

Η μεσολαβούμενη επεξεργασία των ANP είναι συνδεδεμένη με την υπέρταση σε μια σειρά από ζωικά μοντέλα και γενετικές μελέτες. Σε ποντίκια που δεν εκφράζεται η Corin (knockout ποντίκια) φάνηκαν υψηλά επίπεδα μη επεξεργασμένων ειδών Pro-ANP και απουσία ώριμου ANP στον ιστό της καρδιάς.

Αυτή η κατάσταση ανεπάρκειας μπορεί να αναστραφεί έπειτα από ενδοφλέβια ένεση της ενεργού Corin που οδηγεί στην μετατροπή της pro-ANP σε ώριμη ANP. Ποντίκια ανεπαρκή για ANP ή Corin έχουν προσδιορίσει άμεσα την σχέση των χαμηλών επιπέδων της Corin ή της ANP με την εμφάνιση της υπέρτασης, λόγω της απομείωσης της νεφρικής απέκκρισης νατρίου και της καρδιακής υπερτροφίας [Chan et al 2005].

Η χρωμοσωμική περιοχή της Corin βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4p12-13, 200 kb σε μήκος και αποτελείται από 22 εξόνια. Το ανθρώπινο γονίδιο της Corin είναι συνδεδεμένο με την υπέρταση και την εμφάνιση καρδιακής νόσου. Η σημασία των

επαναλήψεων του υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας και των υποομάδων της Corin στο Pro-ANP έχουν μέχρι σήμερα αποδειχθεί με επιτυχία [Krappe et al 2004]. Παρουσία των δύο παραλλαγών T555I και Q568P έχουν εντοπιστεί στις περιοχές και σχετίζονται με μη-συντηρητικούς πολυμορφισμούς μονών νουκλεοτιδίων (SNPs) και με την ανάπτυξη για αυξημένο κίνδυνο υπέρτασης και καρδιακής υπερτροφίας σε Αфро-Αμερικανικούς πληθυσμούς [Dries et al 2005].

Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε μία λειτουργική δοκιμασία, που προσδιόρισε την παρουσία δυο μεταλλαγών της K317E και της S472G στον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και στις περιοχές της Corin που έχουν εμπλακεί σε μειωμένη δραστηριότητα και στην παθογένεση της PE [Cui et al 2012]. Επίσης η μετάλλαξη R539C, εντοπίστηκε σε υπερτασικούς ασθενείς με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ενεργοποίηση της Corin. Έτσι μεταλλάξεις / πολυμορφισμοί που προσδιορίζονται στο γονίδιο Corin μειώνουν την δραστηριότητα και στη συνέχεια την επεξεργασία του Pro-ANP σε ώριμο ANP είτε μεταβάλλοντας την δομική περιοχή, είτε μειώνοντας την ενεργοποίηση και την επιφανειακή έκφραση σε καρδιακά μυοκύτταρα [Dong et al 2013].

Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοϊστοχημείας ο εντοπισμός των Corin έχει καταδειχθεί σε κύτταρα του φθαρτού υμένα πλακούντα. Παράλληλα έχει εκτιμηθεί και ο πιθανός ρόλος τους στην εισδοχή της τροοφοβλάστης με την ενεργοποίηση του ANP του πλακούντα. Ο προσδιορισμός γίνεται με τα επίπεδα έκφρασης της Corin στο πρώτο τρίμηνο στον μητρικό ορό που δεν διαφέρει σε ολόκληρη την ηλικία κύησης, χωρίς επίσης να δείχνει σημαντικά μειωμένα επίπεδα στις γυναίκες με PE συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες [Dong et al 2013].

Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η λειτουργία της Corin και του ANP έχουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της τροοφοβλάστης καθώς και στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας της μητέρας κατά την κύηση. Τα ποντίκια που κυοφορούσαν και είχαν ανεπάρκεια των εν λόγω πεπτιδίων έδειξαν υψηλή αρτηριακή πίεση και πρωτεϊνουρία, σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν εξέφραζαν τα πεπτίδια και ποντίκια που δεν είναι σε κατάσταση κύησης. [Chan et al 2005].

Σε αυτά τα ποντίκια, η τροφοβλάστη και η αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας ήταν σημαντικά μειωμένες. Περαιτέρω, οι συγγραφείς αυτοί εντόπισαν δύο Corin γονιδιακές μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην ανεπάρκεια της δραστηριότητας της Corin. Το mRNA Corin της μήτρας και τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με PE σε σύγκριση με τις φυσιολογικές εγκύους [Cui et al 2012].

Η αποσαφήνιση του ρόλου της Corin στην παθογένεση του PE, αποτελεί λοιπόν ένα σημαντικό εν δυνάμει δείκτη εξέλιξης της PE. Μια μελέτη ελέγχου περιστατικών, περιελάμβανε 122 γυναίκες με μονήρεις κυήσεις, συμπεριλαμβανομένων 12 γυναικών με πρώιμη PE και 13 με αυξημένα επίπεδα δεικτών PE στον ορό, που αναλύθηκαν πριν τις 20 εβδομάδες της κύησης. Τα επίπεδα Corin και MR-PANP είχαν σημαντικά μεταβληθεί σε περιπτώσεις πρόωρου εμφάνισης PE σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που έχει φυσιολογική αρτηριακή πίεση ($P = 0,001$ και $p = 0,046$ αντίστοιχα) [Khalil et al 2015]. Η μελέτη έδειξε σημαντική μείωση στα επίπεδα της Corin σε γυναίκες που προορίζονται να αναπτύξουν PE.

Παρά το γεγονός ότι τα μειωμένα επίπεδα της Corin έχουν εμπλακεί στην παθογένεση PE, τα υψηλά επίπεδα της διαλυτής Corin στο πλάσμα έχουν επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με PE. Οι μελέτες αυτές υπέθεσαν τοπική δράση στη Corin στην εισβολή της τροφοβλάστης και τη συντήρηση της πίεσης του αίματος κατά την εγκυμοσύνη [Cui et al 2012]. Τα αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα οφείλονται σε καρδιακή απάντηση σε ασθενείς με υπέρτασης και PE, δείχνοντας έτσι ότι τα επίπεδα στο πλάσμα δεν είναι η ακριβή στον προσδιορισμό της νόσου.

2.2 Το μόριο Copeptin ως δείκτης στην εκτίμηση της προεκλαμψίας

Το μόριο είναι γνωστό ως αντι-διουρητική ορμόνη ή αγγειοπρεσίνη (AVP) και αποτελεί ένα εννεαπεπτίδιο, όντας μία από τις κύριες ορμόνες του άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - επινεφριδίων. Δρα ως ρυθμιστής της ομοιόστασης του καρδιαγγειακού και

του απεκκριτικού συστήματος, όντας επίσης ένα σημαντικό συστατικό του ενδοκρινικού μηχανισμού αντίδρασης στο στρες έναντι των ενδογενών συνθηκών στο σώμα [Treschan et al 2006].

Η AVP παράγεται στον υποθάλαμο και μεταφέρεται στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης. Μόλις εκκρίνεται στην κυκλοφορία έπειτα από βιολογικά ερεθίσματα, επηρεάζει την ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, την αιμοστατική λειτουργία, την αιμοδυναμική λειτουργία, καθώς και την λειτουργία ωσμορυθμιστικών και ενδοκρινολογικών επιδράσεων μέσω τριών υποδοχέων.

Εκφράζεται σε αγγειακά τοιχώματα, με την δράση ειδικών υποδοχέων V1a που μεσολαβούν την αρτηριακή αγγειοσυστολή κατά την ενεργοποίηση της βαζοπρεσίνης, ενώ μέσω των υποδοχέων V1b, που εκφράζονται στην υπόφυση και το πάγκρεας, διεγείρεται από την απελευθέρωση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης. Ενεργοποιεί τον υποδοχέα V2 μέσω της δράσης της αδενυλκυκλάσης και ασκεί αντι-διουρητική επίδραση [Kosmimizu et al 2012, Seligman et al 2011].

Πολλαπλές μελέτες έχουν διευκρινίσει την πιθανή σχέση μεταξύ της βαζοπρεσίνης με την εγκυμοσύνη και ως εκ τούτου τον ρόλο της στην παθοφυσιολογία της PE. Η σύντομη διάρκεια της βιολογικής ημίσειας ζωής της (5-20 λεπτά) στο αίμα, το μικρό μέγεθος και η ικανότητα δέσμευσης με τα αιμοπετάλια (περισσότερο από 90%) αποτελούν στοιχεία που περιπλέκουν την κυκλοφορία της AVP όπως προσδιορίζεται με γνωστές αναλυτικές μεθόδους [Struck et al 2005].

Αυτοί οι περιορισμοί μπορεί να εμποδίσουν τη χρήση της AVP ως βιοδείκτη σε κλινικές μελέτες. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1972 από τον Holwerda, ως ένα πεπτίδιο 39-αμινοξέων με καρβοξυτελικό άκρο, με την παραπάνω δομή να αποτελεί συστατικό της προπρο-βαζοπρεσίνης [Struck et al 2005]. Η Προ-προ-AVP είναι ένα πεπτίδιο 164 αμινοξέων. Η H Coreptin παράγεται σε 1: 1 στοιχειομετρική αναλογία με την AVP και σε σχετικά σταθερά επίπεδα στον ορό και το πλάσμα. Τα επίπεδα της Coreptin στο αίμα έδειξαν ταυτόσημες τροποποιήσεις με την βαζοπρεσίνη σε διάφορες ομάδες πληθυσμών ενώ τα επίπεδα φαίνεται διαταραγμένα όταν αξιολογείται το πεπτίδιο

ως βιοδείκτης σε καταστάσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου και σε ασθενείς με οξύ ενδογενές στρες και σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Ως εκ τούτου, η coreptin έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα αξιόπιστο, υποκατάστατος δείκτης για την έκκριση της βαζοπρεσίνης (AVP) [Land et al 1982].

Σε μια πρώτη μελέτη, οι Zulfikaroglu et al. μέτρησαν στον ορό του αίματος τα επίπεδα της coreptin σε 32 ασθενείς με ήπια μορφή PE, σε 32 ασθενείς με σοβαρή μορφή και 32 φυσιολογικές γυναίκες κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης. Τα επίπεδα coreptin σε εγκυμοσύνες περιπλέκεται σε καταστάσεις PE καθώς φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερες από εκείνες των φυσιολογικών γυναικών. Ωστόσο, η μελέτη δεν παρείχε πληροφορίες σχετικά με την ηλικία κύησης και τα επίπεδα της coreptin. Αυτή ήταν η πρώτη μελέτη για τη διαλεύκανση του ρόλου των coreptin στην παθογένεση PE και παρουσίασε τα επίπεδα της coreptin του ορού ως δείκτη για την PE.

Σε μια άλλη μελέτη για την εκτίμηση της επίδρασης του κοιλιακού τοκετού έναντι της γέννησης με καισαρική τα επίπεδα της coreptin στον μητρικό ορό σε έγκυες γυναίκες, φάνηκαν αυξημένα στις γυναίκες με PE σε σύγκριση με τις φυσιολογικές γυναίκες. Ακόμη και αν αυτή η μελέτη δείχνει κάποια στοιχεία σχετικά με τον ρόλο της coreptin είναι δεδομένο σαφώς ότι υπάρχουν υψηλότερα μητρικά επίπεδα της πρωτεΐνης σε PE σε σχέση με ασθενείς με φυσιολογική αρτηριακή πίεση που υποβλήθηκαν σε κοιλιακό τοκετό [Foda et al 2012].

Μια πρόσφατη έρευνα έχει επικεντρωθεί στη χρήση της coreptin ως ένα βιολογικό δείκτη για την πρόβλεψη της PE. Σε μια πρόσφατη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 50 ασθενείς με PE, 54 γυναίκες με φυσιολογική πίεση και 33 μη έγκυες γυναίκες, φάνηκε ότι τα επίπεδα της coreptin στο πλάσμα σε 6 εβδομάδες κύησης ήταν σημαντικά υψηλότερα από ό, τι σε γυναίκες με φυσιολογική πίεση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Περαιτέρω με τη χρήση άγριου τύπου C57BL/6J, καταδείχθηκε ότι η χρόνια έγχυση AVP σε ποντικούς μιμείται την κλινική παρουσίαση της PE δηλαδή υπέρταση κύησης και πρωτεϊνουρία [Santinal et al 2014].

3. Δομή και λειτουργία των microRNAs (miRNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) αποτελούν μια κατηγορία των μικρών μη-κωδικοποιητικών ρυθμιστικών RNA που επηρεάζουν τη μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNAs. Η εν λόγω δομή του mRNA αναστέλλει την λειτουργία των ριβοσωμάτων με αποτέλεσμα τα εν λόγω μόρια να μην μπορούν να μεταφραστούν. Έχουν καταγραφεί σε μια βάση δεδομένων (miRBaseRelease 20) 1961 ανθρώπινα μικρά miRNAs.

Σε ανθρώπινα κύτταρα, λαμβάνει χώρα η μεταγραφή πρόδρομων miRNA (PRI-microRNAs) που μέσω πολυσταδιακής βιογένεσης σχηματίζουν ώριμα miRNAs, μήκους μέχρι 25 νουκλεοτιδίων. Τα μικρο-RNAs είναι σε θέση να ρυθμίζουν την έκφραση εκατοντάδων mRNAs στα κύτταρα στόχους την ίδια χρονική στιγμή, ελέγχοντας έτσι μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων του κυτταρικού θανάτου και του μεταβολισμού. Ως εκ τούτου, η παρεκκλίνουσα έκφραση miRNA συνδέεται με διαταραγμένη κυτταρική λειτουργία και σε ορισμένες περιπτώσεις σε παθολογικές καταστάσεις όπως γυναικολογικές ασθένειες, καρκίνο, φλεγμονώδεις νόσους και καρδιαγγειακές διαταραχές (Roberts et al 2001, Khan et al 2006).

Επιπλέον, πρόσφατα ευρήματα καταγράφουν αλλαγές έκφρασης miRNA σε παθολογικές καταστάσεις στο ενδομήτριο. Στα κύτταρα θηλαστικών, τα miRNA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II σε ένα μόνο σκέλος του RNA που είναι διπλωμένο σχηματίζοντας μια πρόδρομη φουρκέτα από miRNA (premiRNA) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε ένα δίκλωνο RNA που ονομάζεται πρώιμο miRNA (PRI-miRNA).

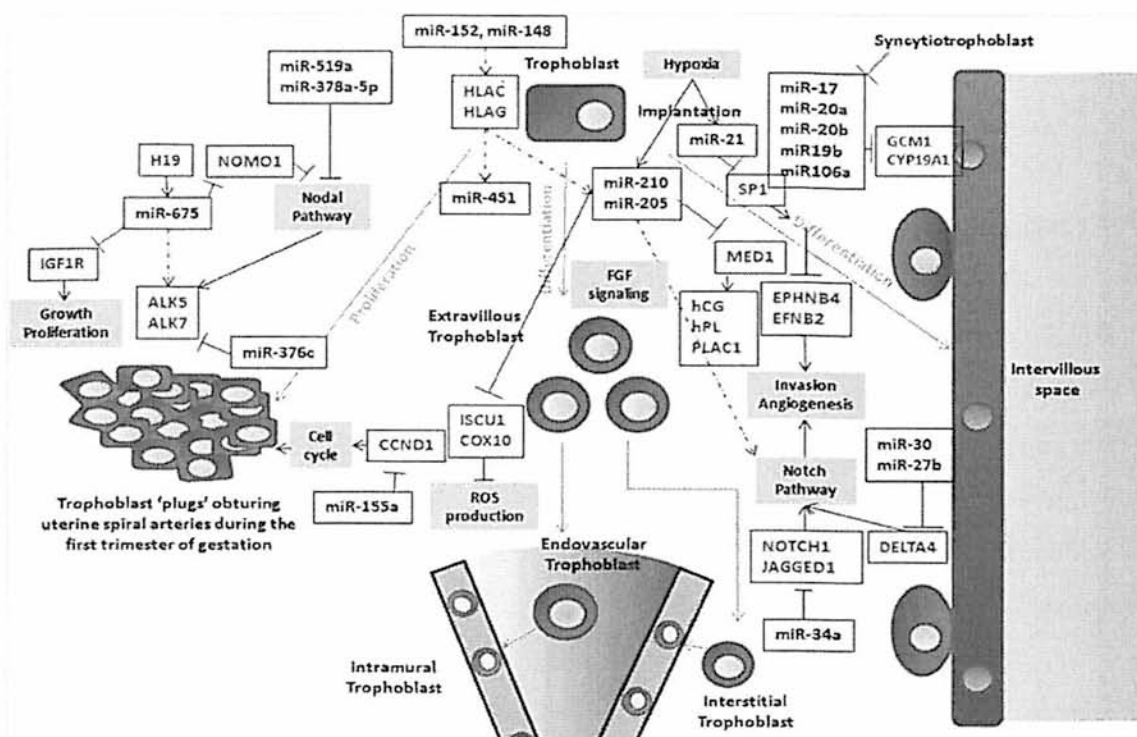
Τα προ-miRNA μεταφέρονται μέσα στο κυτταρόπλασμα μέσω των exportin-5 και Ran-GTP, όπου ένα τμήμα του διασπάται και τελικά μετατρέπεται σε ώριμο miRNA. Αυτό το δίκλωνο μικρό RNA χωρίζεται σχεδόν σε δύο όμοια τμήματα (Roberts et al 2001, Khan et al 2006).

Το ένα τμήμα του διαμορφωμένου miRNA προκαλεί επαγόμενη αποσιώπηση στην έκφραση mRNA καθώς και στην αναστολή της μετάφρασης ή αποικοδόμηση του

mRNA. Τα περισσότερα miRNAs πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικούς ρόλους σε μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, οι ιικές λοιμώξεις, οι μεταβολικές ασθένειες και οι νευρολογικές διαταραχές (Roberts et al 2001, Khan et al 2006).

Τα ασυνήθη επίπεδα έκφρασης των miRNA έχουν παρατηρηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπων και σε πολλές παθολογικές διαδικασίες όπως στην προεκλαμψία, στο αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου, τα μητρικά λειομνώματα, το αδενοκαρκίνωμα των ωοθηκών, την ενδομητρίωση και τις καθ'έξιν αποβολές (RPL) [Roberts et al 2001, Khan et al 2006].

Επιπλέον, τα πρόσφατα ευρήματα από διαδικασίες αλληλούχισης (11)έδειξαν, ότι το επιθήλιο του ενδομητρίου εκφράζει διακριτά πρότυπα miRNA κατά τις διάφορες φάσεις της έμμηνου ρύσης [Maynard et al 2011]. Η αυξημένη έκφραση ενός συγκεκριμένου miRNA προκαλεί την καταστολή της μετάφρασης, λαμβάνοντας υπόψη ότι η ρύθμιση προς τα κάτω των miRNA ασκεί το αντίθετο αποτέλεσμα. Αυτές οι τροποποιήσεις στη μετάφραση του mRNA καθορίζουν ένα ξεχωριστό πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών, που επηρεάζει πολλές μοριακές οδούς και προκαλεί πολλές διαφορετικές κυτταρικές και ιστολογικές αλλαγές [Maynard et al 2011].



Εικόνα 2. Η έκφραση των μικρών μορίων RNA στον σχηματισμό του πλακούντα.

Ως εκ τούτου, τα συνδυασμένα αποτελέσματα των πολλαπλών miRNAs μπορούν να επηρεάσουν την υγεία και την εξέλιξη της ασθένειας, και μπορεί να καθορίσουν την έκβαση μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Αν και διαξάγεται εκτεταμένη έρευνα, μόνο ορισμένα κλάσματα ανθρώπινου miRNA είναι καλά χαρακτηρισμένα και συνεπώς η επιρροή του miRNA στην εξέλιξη της παθοφυσιολογίας ορισμένων ασθενειών μένει ακόμη να διερευνηθεί.

Όλα αυτά τα νέα ευρήματα μπορούν να προωθήσουν μια βαθύτερη κατανόηση των αλλαγών που εμπλέκονται σε ασθένειες της αναπαραγωγικής οδού με αποτέλεσμα να είναι χρήσιμη η ανάπτυξη νεότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων καθώς και λιγότερο επεμβατικών διαγνωστικών εργαλείων.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αξιολογήσει την επίδραση των miRNA στην παθοφυσιολογία γυναικολογικών αναπαραγωγικών ασθενειών και κυρίως της προεκλαμψίας.

3.1 Ρόλος της miRNAs στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης

Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από miRNAs που εμπλέκονται στην ενδομητρίωση [Pariday et al 2005, Pan et al 2007] ενώ φαίνεται να υπάρχει και διαφορική έκφραση μεταξύ ευτοπικής και έκτοπης ενδομητρίωσης. Κατά συνέπεια, ένας σημαντικός αριθμός miRNAs έχει προσδιοριστεί ότι αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων που λειτουργούν σε προφλεγμονώδεις διαδικασίες, καθώς και στην αγγειογένεση, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την προσκόλληση των μορίων στόχων.

Στις περισσότερες από τις περιπτώσεις, το επίπεδο της έκφρασης αυτών των miRNAs είναι μειωμένο σε ευτοπικούς ιστούς, μέσω της αξιολόγησης του έκτοπου ιστού των γυναικών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με εκείνες τις γυναίκες που δεν έχουν ενδομητρίωση. Η παρουσία διακριτών προτύπων miRNA μεταξύ ιστών ενδομητρίωσης και μη ενδομητριακών ιστών δείχνει έμμεσα ότι τα μόρια miRNA μπορεί να έχουν μια σημαντική λειτουργία στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης.

Οι Pan et al. προσδιόρισαν διαφορική έκφραση των miRNAs μέσω της ανάλυσης μικροσυστοιχιών του ενδομητρίου από ευτοπικούς ιστούς. Αρκετά από αυτά τα διαφορετικά μόρια miRNAs είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν σε διαδικασίες που είναι ζωτικής σημασίας για την δημιουργία και την εξέλιξη της ενδομητρίωσης όπως η αγγειογένεση, η φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα.

Άλλες παρόμοιες μελέτες αποκάλυψαν 50 διαφορετικά miRNAs που εκφράζονται διαφορεικά σε ευτοπικές περιπτώσεις στο ενδομήτριο σε καταστάσεις ωοθηκικής ενδομητρίωσης [Filiggedhu et al 2010]. Συγκεκριμένα, σε αρκετές οικογένειες στις οποίες έχει γίνει ανάλυση των miRNA, συμπεριλαμβανομένων των

miR-9, miR-34, α5-7, miR-15, miR16, και miR-125 η έκφραση τους φαίνεται να είναι ρυθμιζόμενη προς τα κάτω σε καταστάσεις ευτοπικής ενδομητρίωσης [Pan et al 2008]. Άλλα miRNAs όπως τα miR-199a και miR-122 είναι ρυθμισμένα προς τα πάνω σε ασθενείς με ενδομητρίωση σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ενδομητρίωση. Έχει προταθεί ότι η σχετική απόκλιση στην έκφραση αυτών των miRNAs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση της σοβαρής μορφής ενδομητρίωσης σε σχέση με την ήπια μορφή ενδομητρίωσης [Pan et al 2008].

Είναι ενδιαφέρον ότι, ορισμένες μελέτες έχουν επίσης αξιολογήσει miRNA ως ένα πιθανό μη επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για την πρόιμη ενδομητρίωση με δεδομένο το γεγονός ότι μερικά miRNA απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος [Cho et al 2014]. Αρκετές παθολογικές διεργασίες όπως η φλεγμονή, η τοπική βιοσύνθεση των οιστρογόνων, η αντίσταση στην προγεστερόνη, η κυτταρική μετανάστευση, η αγγειογένεση και η επιγενετική ρύθμιση είναι ζωτικής σημασίας στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης. Όπως αναφέρεται λεπτομερώς, τα miRNAs φαίνεται να έχουν ένα ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση αυτών των διαδικασιών.

3.2 Η συμμετοχή των μικρών μορίων mRNA στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της φλεγμονής

Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από τους Lin et al. αποκάλυψε ότι στρωματικά κύτταρα από ιστούς ενδομητρίωσης έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των miR20a. Η έκφραση του miR200a οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της φωσφατάση-2 που είναι διπλής ειδικότητας και οδηγεί σε συνεχή και παρατεταμένη εξωκυτταρική ρύθμιση κινασών. Επιπλέον, η ανάπτυξη ινοβλαστών μέσω του παράγοντα-9 επάγεται επίσης από την δράση της προσταγλανδίνης E2 διαμέσου εξωκυτταρικού σήματος σε στρωματικά κύτταρα ιστών που έχουν χαρακτηριστεί από ενδομητρίωση, πράγμα που δηλώνει την συμβολή τους στην φλεγμονή και στην παθογένεση της ενδομητρίωσης.

3.3 Τοπική βιοσύνθεση των οιστρογόνων και η συμμετοχή των μικρών μορίων RNA

Η τοπική βιοσύνθεση των οιστρογόνων και η ανεπάρκεια του ορμονικού μεταβολισμού σε κύτταρα ενδομητρίωσης φαίνεται να είναι σημαντική για την ανάπτυξη της. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα μόρια miR17-5p, miR-23a, miR-23b και το miR-542-3p εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε ευτοπικούς και εκτοπικούς ιστούς στο ενδομήτριο των ασθενών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με το φυσιολογικό ευτοπικό ενδομήτριο. Η διαφορική έκφραση αυτών των miRNAs προβλέπεται από υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στεροειδικών ενζύμων κλειδιών όπως το CYP19A1 και το Star, καθώς και της κυκλοοξυγενάσης -2 σε έκτοπους ιστούς ενδομητρίου, ασθενών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με ευτοπικά ενδομήτρια και μη ενδομητρικούς ιστούς. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μία παρεκκλίνουσα έκφραση των μορίων miRNAs μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ενδομητρίωσης με στόχο την σταθερότητα των συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την στεροειδογόνο οδό (Toloubeydokhti et al 2008).

3.4 Η αντίσταση της προγεστερόνης και η συμμετοχή των μικρών μορίων RNA

Το μεταγραφικό αποτύπωμα του εκκριτικού ενδομητρίου των γυναικών με ενδομητρίωση δείχνει τις μεταβολές της έκφρασης των μικρών μορίων RNA μετά από την επίδραση της προγεστερόνης.

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν το πρότυπο έκφρασης των miRNA σε γυναίκες με ενδομητρίωση διαφέρει από τις υγιείς γυναίκες ειδικά στην πρώιμη εκκριτική φάση. Μέλη των οικογενειών miR-9 και του miR-34 εμφανίζουν χαρακτηριστικά μειωμένη έκφραση σε ασθενείς με ενδομητρίωση με ταυτόχρονη τροποποίηση της δράσης της προγεστερόνης σε αυτούς τους ασθενείς (Burney et al 2009).

Επιπλέον, οι Petracco et al. προσδιόρισε μια υποθετική θέση δέσμευσης του miR135 στο γονίδιο HOXA10 που δείχνει ότι τα μόρια miR135a και miR135b εκφράζονται σε φυσιολογικό ενδομήτριο και η έκφραση τους είναι αυξημένη στο ενδομήτριο των γυναικών με ενδομητρίωση. Επίσης έδειξαν ότι τα μόρια miR135a και

miR135b στοχεύουν το γονίδιο HOXA10 και ρυθμίζουν τη λειτουργία του μέσω της καταστολής της έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης HOXA10.

Έτσι, τα microRNAs μπορεί να λειτουργήσουν με τη ρύθμιση σημείων στόχων επηρεάζοντας την δράση της προγεστερόνης στο ενδομήτριο, συμβάλλοντας επίσης στην πρόληψη της φυσιολογικής κυτταρικής απόκρισης στην προγεστερόνη. Μελέτες σε τρωκτικά έχουν ερευνήσει το ρόλο των miRNAs στην φυσιολογική απόκριση του ενδομητρίου κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάση στη χωρική και χρονική αντίδραση και στον ρόλο που μπορούν να παίζουν τα miRNAs στη ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία εμφύτευσης (Shen et al 2013).

Περαιτέρω έρευνα που διεξάγεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο αποκάλυψε ότι τα miR-30b και miR-30d είναι ρυθμισμένα προς τα άνω, ενώ τα miR-494 και miR-923 ρυθμίζονται προς τα κάτω στο ενδομήτριο. Αυτά τα miRNAs στοχεύουν σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στην λειτουργία του ενδομητρίου, όπως τα CAST, CFTR, FGFR2, και LIF επιβεβαιώνοντας τη σημασία των miRNA σε αυτή τη διαδικασία (Altmae et al 2013).

3.5 Η επιβίωση των κυττάρων και η κυτταρική εισβολή

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η ατελής μετάβαση στο ενδομήτριο από την πολλαπλασιαστική σε εκκριτική φάση αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης και την εμφύτευση. Ορισμένα miRNAs όπως τα miR-183, ρυθμίζονται προς τα κάτω σε καταστάσεις ενδομητρίωσης και συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης των κυττάρων, της κυτταρικής εισβολής, της κυτταρικής προσκόλλησης και της απόπτωσης.

Η τοπική φλεγμονή και αναδιαμόρφωση του ιστού είναι ζωτικής σημασίας κατά τη διάρκεια του ενδομητριακού αναπτυξιακού κύκλου. Η ρύθμιση προς τα κάτω του miR-17-5p τη επάγει την χαμηλότερη έκφραση του αυξητικού παράγοντα-β και της ιντερλευκίνης-8 και την υψηλότερη έκφραση του επαγωγίμου μεταγραφικού παράγοντα-1a, καθώς και των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων ενισχύοντας την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρική πολλαπλασιασμό σε καταστάσεις ενδομητρίωσης [Aguado et al 2012, Wu et al 2013].

3.6 Εξωκυττάρια αναδιαμόρφωση της μήτρας

Η εξωκυττάρια αναδιαμόρφωση της μήτρας επηρεάζει την εμφύτευση του ενδομητρίου ιστού έξω από την κοιλότητα της μήτρας και συμβάλλει στο σχηματισμό της πρόωρης ενδομητριοτικής βλάβης. Μια πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε την απορύθμιση των miRNAs όπως τα miR-19γ και miR-29c που εμπλέκονται στη ρύθμιση γονιδίων εξωκυττάριας μήτρας σε ενδομητρίωματα. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-29c οδηγεί σε άμβλυνση της απάντησης στην αντίδραση της μήτρας που φαίνεται να στοχεύουν ειδικά το γονίδιο upakin1B (Albinson et al 2011, Viitoratos et al 2012).

3.7 Αγγειογένεση

Η επίδραση των miRNAs στην αγγειογόνο διαδικασία σε καταστάσεις ενδομητρίωσης έχει αξιολογηθεί σε αρκετές μελέτες. Ο παράγον VEGF-A και ο αναστολέας αγγειογένεσης της θρομβοσπονδίνης-1 (TSP-1) παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Σε μια πρόσφατη μελέτη οι γυναίκες με ενδομητρίωση παρουσίασαν σημαντική αύξηση του TSP-1 με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης του VEGF-A σε ιστούς ωοθηκικών ενδομητριομάτων σε σύγκριση με το ευτοπικό ενδομήτριο. Σε αυτή τη μελέτη, ο VEGF-A και ο TSP-1 έδειξαν μια σημαντική αντίστροφη συσχέτιση με τα επίπεδα των μορίων miR-125a, miR-222 και miR-17-5p, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του TSP-1 και του VEGF-A μπορεί να ρυθμίζεται από αυτά τα miRNAs. Επιπλέον, ορισμένα miRNAs απέδειξαν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες

(miRNA- 15β, -16, -221, -222), ενώ άλλα μόρια φάνηκε ότι έχουν μια προαγγειογόνο δράση (MiRNA-17-92 cluster) [Sato et al 2009, Yauk et al 2010].

Σε μια πρόσφατη μελέτη εντοπίστηκαν 156 miRNAs που εκφράζονται διαφορεικά σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από ενδομητρίωση και σε κανονικά ενδομήτρια. Ανάμεσα τους, υπήρχαν έξι ρυθμιζόμενα προς τα άνω μόρια (miR-29γ-3p, -138, -203-3p, -411-5p, -424-5p) και έξι ρυθμισμένα μόρια προς τα κάτω (miR 16, -373- 3p, -449-3p, -556-3p, -636, -93), με τα περισσότερα από αυτά να συμμετέχουν στην ινωδόλυση και την αγγειογένεση [Brown et al 2001].

Η μελέτη, επίσης αποκάλυψε ότι τα ωοθηκικά ενδομητρίωματα παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης των miR-29c-3p, -138, -202-3p, -411-5p, -411-3p και μειωμένα επίπεδα έκφρασης των miR-449b-3p. Σε περιτοναϊκά εμφυτεύματα και ορθοκολπικές αλλοιώσεις φαίνεται να εκφράζονται σημαντικά υψηλότερα επίπεδα των miR-16-5p, -29-3p, 138-5p, -202-3p, -411-5p, -424-5p, -935, ενώ φαίνεται να υπάρχει μειωμένη έκφραση των miR-556-3p και -449-3p. Τα miRNAs φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο την προαγωγή των αλλοιώσεων της ενδομητρίωσης επηρεάζοντας διαφορετικές παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως η ινωδόλυση και η αγγειογένεση μέσω της γονιδιακής έκφρασης των VEGF-A, TSP-1, PAI-1 και uPA [Brown et al 2001].

3.8 Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και miRNAs σε καταστάσεις ενδομητρίωσης

Οι πολυμορφισμοί απλού νουκλεοτιδίου (SNPs) είναι ακολουθίες DNA με μεταβολές σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο στο γονιδίωμα. Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου KRAS σε μεταμοσχευμένο ενδομήτριο σε ποντίκια προκάλεσε ενδομητρίωση και μακροπρόθεσμη επιβίωση των αλλοιώσεων. Ωστόσο, παρά τις εκτεταμένες αναλύσεις των μεταλλάξεων, κωδικεύουσες περιοχές του γονιδίου αυτού δεν έχουν βρεθεί [Figueras et al 2008, Hurley et al 2012].

Πολυμορφισμοί μονών νουκλεοτιδίων εντός των miRNAs, σε θέσεις πρόσδεσης των miRNA μπορεί να αλλάξουν την σταθερότητα του mRNA ή την του μετάφραση και ως εκ τούτου, μπορεί να οδηγήσουν σε διάφορες παθολογικές διεργασίες

συμπεριλαμβανομένων του κακοήθους μετασχηματισμού Το γονίδιο KRAS είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται σε ένα miRNA με εξαρτώμενο τρόπο. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι μια παραλλαγή SNP στο γονίδιο LCS6 επηρεάζει την δέσμευση των miRNA στην μη μεταφραζόμενη περιοχή του KRAS και έχει προσδιοριστεί στο 31% των γυναικών με σοβαρή ανθεκτική ενδομητρίωση, ενώ η συχνότητα εμφάνισης στο παγκόσμιο πληθυσμό είναι 5,8% [Figueras et al 2008, Hurley et al 2012].

Αυτή η παραλλαγή αλληλόμορφου ήταν παρούσα σε σχεδόν το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων ενδομητρίωσης. Γυναίκες με παραλλαγές στο γονίδιο KRAS παρουσιάζονται πιο συχνά με πόνο και δυσμηνόρροια σε σχέση με τις γυναίκες που δεν έχουν παραλλαγές. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα άτομα με την παραλλαγή KRAS παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης περιτοναϊκής ενδομητρίωσης και υπογονιμότητας. Ωστόσο, το στάδιο IV της ενδομητρίωσης, ήταν εξίσου κοινή μεταξύ των ατόμων σε κάθε ομάδα [Figueras et al 2008, Hurley et al 2012].

3.9 Τα microRNAs στην εγκυμοσύνη

Τα miRNA κατά την περίοδο της περιεμφυτευτικής διαδικασίας της έμμηνου ρύσεως ή σε διαδικασίες φλεγμονής δρουν και ενεργοποιούνται συμβαίνουν με στόχο να προετοιμάσουν την ανοσολογική δεκτικότητα του ενδομητρίου για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Αυτές οι διαδικασίες που ελέγχονται από διάφορες πρωτεΐνες, ένζυμα και αγγειογόνους παράγοντες εκφράζονται διαφορετικά και υπό αυστηρούς όρους και ρυθμίσεις. Οι μεταβολές στην έκφραση του ενδομητρίου φαίνεται να ευθύνεται για την ιστική προσαρμογή στην αναγέννηση, με αποτέλεσμα την δυσλειτουργική αιμορραγία της μήτρας, την αποτυχία εμφύτευσης του εμβρύου και τις μεταβολές στις διαταραχές του ενδομητρίου.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση δυναμικών μεταβολών στην μήτρα μέσω μεταβλητών πρότυπων γονιδιακής έκφρασης με τον έλεγχο των γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση (Pan & Chegini 2008, Chakrabarty et al., 2007).

Ένας σημαντικός αριθμός miRNAs εκφράζονται ειδικά κατά τη διάρκεια της περιεμφυτευτικής και προεμφυτευτικής περιόδου σε μελέτες που έχουν αξιολογηθεί σε ποντίκια. Μεταξύ των 32 miRNAs που προσδιορίστηκαν ότι επάγουν διαδικασίες αυξανόμενης ρύθμισης τα κυριότερα από αυτά τα miR-101 και miR-199a φαίνεται να στοχεύουν το γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης-2 (Cox2), το οποίο είναι γνωστό για τον κρίσιμο ρόλο του στην διαδικασία της εμφύτευσης ενώ επίσης μπορεί να προωθήσει την διαδικασία φλεγμονής και την καρκινογένεση (Chakrabarty et al., 2007).

3.10 Η ανάλυση των μικρών μορίων miRNAs ως πιθανά διαγνωστικά εργαλεία

Η ενδομητρίωση γενικά διαγιγνώσκεται μέσω της οπτικοποίησης των ενδομητριοσικών βλαβών κατά τη χειρουργική επέμβαση και το γεγονός αυτό αποτελεί μια σημαντική τεχνική για τη διάγνωση. Για το λόγο αυτό, η διάγνωση και η παρέμβαση συχνά καθυστερεί. Αυτή η καθυστέρηση επιδεινώνεται περαιτέρω από την απουσία συμπτωμάτων σε ορισμένους ασθενείς και από την έλλειψη ευαίσθητων βιοδεικτών για την ανίχνευση του πρόωρου σταδίου της νόσου. Ως εκ τούτου, νεότερα και λιγότερο επεμβατικά διαγνωστικά εργαλεία για τη διάγνωση της νόσου στα πρώιμα στάδια είναι απαραίτητα.

Τα MicroRNA έχουν επίσης μελετηθεί ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες σε καταστάσεις ενδομητρίωσης αφού η παρουσία τους μεταβάλλεται στο πλάσμα. Η έκφραση αυτών των μορίων έχει αναφερθεί σε διάφορους τύπους συμπαγών όγκων και λευχαιμίας, καθώς και σε αρκετές άλλες ασθένειες, όπως διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα, την κίρρωση του ήπατος, τον καρκίνο των ωοθηκών και ο διαβήτης τύπου 2.

Οι Jia et al. αξιολόγησαν τη σκοπιμότητα των miRNA ως διαγνωστικά εργαλεία για την ενδομητρίωση μέσω της εκτίμησης των επιπέδων miR-17-5p, miR-20a, και miR22 που ρυθμίζονται προς τα κάτω σε γυναίκες με ενδομητρίωση σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση.

Μια άλλη μελέτη έχει εντοπίσει τρία διαφορετικά μόρια miRNA ανάμεσα σε μελέτες σε υγιή άτομα, σε ασθενείς που έχουν ενδομητρίωση καθώς και ασθενείς που

έχουν προσβληθεί από επιθηλιακό ωοθηκικό καρκίνωμα, αντικατοπτρίζοντας τόσο τα μοναδικά πρότυπα έκφρασης miRNA και τους διάφορους παθογόνους μηχανισμούς για κάθε ασθένεια.

Αρκετές μελέτες σε μόρια miRNAs έχουν εκτιμήσει όχι μόνο τους δυνητικούς διαγνωστικούς δείκτες, αλλά επίσης και δείκτες που σχετίζονται με διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου. Μεταξύ των έξι miRNAs που έχουν αναλυθεί, τα miR-199a και miR-122 είναι προς τα άνω ρυθμισμένα στον ορό ασθενών και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση μεταξύ σοβαρών και ήπιων μορφών ενδομητρίωσης (Zhu et al 2010, Zhang et al 2007, Xiz et al 2010).

Περαιτέρω ανάλυση έδειξε επίσης ότι η σχετική συγκέντρωση των miR-122 μπορεί να συσχετίζεται με εκείνη των miR-199a. Είναι ενδιαφέρον ότι, η *in silico* λειτουργική ανάλυση έδειξε ότι δύο μόρια μικρών miRNAs στοχεύουν στο γονίδιο SOX4, που είναι γνωστό ότι συνδέεται με την απόπτωση και την διαφοροποίηση των καρκινωμάτων του ενδομητρίου. Η ρύθμιση προς τα πάνω των δύο αυτών miRNAs στον ορό των ασθενών με ενδομητρίωση υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου μέσω της αξιολόγησης της έκφρασης του γονιδίου SOX4, αν και η υπόθεση αυτή απαιτεί περαιτέρω έρευνα (Zhu et al 2010, Zhang et al 2007, Xiz et al 2010).

Το επίπεδο έκφρασης των miR-199a επίσης συσχετίζεται με την πυελική πρόσφυση και την διείσδυση στην πύελο, όπως και των άλλων κλινικών χαρακτηριστικών της νόσου (Zhu et al 2010, Zhang et al 2007, Xiz et al 2010).

Εν κατακλείδι, έχουν προσδιοριστεί έξι διαφορετικά εκφρασμένα μόρια miRNAs που προσδίδουν την πιθανή χρησιμότητα στη διάγνωση ενδομητρίωσης. Μεταξύ αυτών, τα μόρια miR-199a και miR-542-3p βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, όταν συνδυάζονται ως διαγνωστικοί δείκτες φτάνοντας σε μια ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση ενδομητρίωσης έως 96,61% και 79,66%, αντίστοιχα. Επιπλέον, το miR199a συσχετίζεται με πυελική προσκόλληση και τη διασπορά της βλάβης καθώς και με την ορμονική μεσολάβηση στα μονοπάτια σηματοδότησης, αποδεικνύοντας ότι μπορεί να

παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου (Zhu et al 2010, Zhang et al 2007, Xiz et al 2010).

Όλα αυτά τα πρόσφατα ευρήματα υποστηρίζουν το γεγονός ότι κυκλοφορούν miRNAs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικοί νέοι μη επεμβατικοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και την ταξινόμηση της νόσου σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης και να διαφοροποιούνται οι περιπτώσεις νόσου μεταξύ σοβαρών και ήπιων μορφών.

Ωστόσο πρόσθετες μελέτες χρησιμοποιώντας ανεξάρτητους πληθυσμούς πρέπει να πραγματοποιηθούν με σκοπό να επικυρώσουν αυτό το δυναμικό εργαλείο διάγνωσης.

4. Καθ' έξιν αποβολές και η συμμετοχή των μικρών μορίων miRNA στην εξέλιξη του φαινομένου

Η μη εκούσια απώλεια της εγκυμοσύνης είναι ένα σχετικά συχνό φαινόμενο, με περίπου 15% όλων των κλινικά αναγνωρισμένων κύσεων να οδηγείται σε αποβολή. Οι καθ' έξιν αποβολές ορίζονται ως 3 συνεχόμενες αποβολές πριν την 20η εβδομάδα και επηρεάζουν το 1% έως 2% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Αν και οι πολυάριθμες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, έχουν οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι οι αιτίες παραμένουν σε πολλές περιπτώσεις άγνωστες. Ωστόσο, η αιτιολογία του φαινομένου έχει ταξινομήσει τα αίτια σε τουλάχιστον έξι πιθανές ομάδες: στη λοίμωξη (1%), σε ανατομικές ανωμαλίες (5%-10%), στην έλλειψη ωχρινικής φάσης (5%-20%), σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες (7%-50%), σε ανοσολογικούς μηχανισμούς (50%) και σε καταστάσεις αγνώστου αιτιολογίας (15%) (Luo 2009).

Πρόσφατα, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρεκκλίνουσα έκφραση του ανθρώπινου αντιγόνου λευκοκυττάρων (HLA)-G συσχετίζεται με τον φαινόμενο των καθ' έξιν αποβολών (RPL) (Luo 2009). Το HLA-G είναι ένα μη κλασσικό αντιγόνο μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) κατηγορίας Ib που εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στις λάχνες του τροφοβλάστη στο έμβρυο κατά την διάρκεια της κύησης και φαίνεται να παίζει ένα κρίσιμο ρόλο στην μητρική ανοσολογική ανοχή του εμβρύου (Luo 2009). Η

κλασική μορφή MHC της κατηγορίας I δεν εκφράζεται σε αυτόν τον ιστό. Η διαφορική και ειδική έκφραση των HLA-G και HLA υποδεικνύει ότι η έκφραση τέτοιων γονιδίων είναι πολύ οργανωμένη.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίδραση των miRNA στην ρύθμιση του HLA-G σε καταστάσεις καθ' έξιν αποβολών. Μετά την εκτέλεση πειραμάτων μικροσυστοιχίας miRNA σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από RPL σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες που υποβλήθηκαν σε εκλεκτική έκτρωση, η κατάσταση υπερέκφρασης του miRNA-133a βρέθηκε σε περιπτώσεις αποβολών με φυσιολογικό καρυότυπο. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του miR133a δεν ήταν σημαντικά διαφορετική σε ανώμαλους καρυότυπους σε καταστάσεις αποβολών. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι το HLA-G είναι ένας στόχος των miR133a μέσω σύνδεσης του στην μη μεταφραζόμενη περιοχή 3 ' του HLA-G. Ως εκ τούτου, η υψηλή έκφραση miR133a μπορεί να μεσολαβήσει στη μείωση του HLA-G σε επίπεδο πρωτεΐνης, που μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση της RPL, δεδομένου ότι το HLA-G προσδίδει ανοσολογική ανοχή για να εξασφαλιστεί μια επιτυχής εγκυμοσύνη.

Άλλες μελέτες έδωσαν ενδείξεις ότι η λειτουργική ανάλυση SNPs σε PRI-miR-125 μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία σε RPL (72). Δυο παραλλαγές αλληλόμορφων στο pri-miR-125, έχουν οδηγήσει σε μεταβολή της παραγωγής του miR-125 και έχουν ήδη εντοπιστεί. Το miR-125 προκαλεί στοχευμένη αναστολή της λευχαιμίας μέσω του υποδοχέα του παράγοντα (LIFR) και του EKBB2. Ο LIF είναι ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην αύξηση και την διαφοροποίηση της τροφοβλάστης στο ανθρώπινο πλακούντα, ενώ το EKBB2 ανήκει στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των στρωματικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση των κυττάρων τροφοβλάστης στο πλακούντα κατά τη διάρκεια μετά την εμφύτευση. Επιπλέον, το γονίδιο erbB2 μπορεί να προκαλέσει αυξημένα επίπεδα αγγειογένεσης και αύξηση του VEGF.

Όλα τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα γονίδια μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της κύησης στον άνθρωπο και οι

διαταραχές στη ρύθμιση δύναται να προκαλέσουν σημαντικές ασθένειες. Η μειωμένη έκφραση του miR-125 μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση των LIFR και ErbB2 (Betoni et al 2013, Ura et al 2014).

Προφανώς, η έκτοπη έκφραση της LIFR μπορεί να αποφράξει μερικώς την δραστηριότητα του EIP και να βλάψει την ανάπτυξη της τροφοβλάστης και τη διαφοροποίηση της κατά τη διάρκεια της μετά-εμφυτευτικής περιόδου. Τέλος, περαιτέρω μελέτες έχουν ερευνήσει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών σε μικρά μόρια miRNA συμπεριλαμβανομένων των miR-146aC> G, miR-149T> C, miR-196a2T> C και του miR-499A> G σε ένα πληθυσμό γυναικών από την Κορέα ((Betoni et al 2013, Ura et al 2014). Οι ασθενείς που έπασχαν παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα μεταλλαγών στα miR-196a2CC και miR-499AGbGG σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου από υγιείς ασθενείς. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεταλλάξεων παρατηρήθηκε να έχει συνεργιστικές επιδράσεις και αυτοί οι πολυμορφισμοί σχετίζονται με σημαντικές μορφές ιδιοπαθούς καθ' έξιν αποβολών.

Αυτά τα πρόσφατα ευρήματα, αποκαλύπτουν την επιρροή των miRNA στην κυτταρική απορύθμιση γεγονός που μπορεί να επιτρέπει τη δυνατότητα μελλοντικών νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ωστόσο, η μοριακή γνώση των miRNAs σε RPL εξακολουθεί να είναι περιορισμένη και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να γίνει πλήρως κατανοητή.

4.1 Η ανίχνευση ειδικών μορίων miRNAs στην ανθρώπινη κυκλοφορία κατά την εγκυμοσύνη

Η αναζήτηση μικρών μορίων miRNAs που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση επιπλοκών κατά την εγκυμοσύνη ξεκίνησε από τους Chim et al το 2008. Εκείνη την εποχή, περίπου 100 miRNAs ήταν γνωστό ότι εκφράζονται κυρίως στον πλακούντα, αλλά και από άλλα σημεία και ιστούς που θα μπορούσαν να ανιχνεύονται στη μητρική κυκλοφορία, και ως εκ τούτου να είναι χρήσιμοι διαγνωστικοί

δείκτες. Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Chim et al υπέθεσαν ότι η πλειοψηφία των miRNAs του πλάσματος που δεν σχετίζονται με την εγκυμοσύνη κατάγονται από το αιμοποιητικό σύστημα σε σύγκριση με τα πρότυπα των 157 μικρών μορίων miRNAs που ανιχνεύονται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης σε ιστούς του πλακούντα και αντίστοιχα σε κύτταρα του αίματος της μητέρας.

Η έρευνα εντόπισε 34 μικρά μόρια miRNAs που εκφράζονται στον πλακούντα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από δέκα φορές από ό, τι στα κύτταρα του αίματος. Οι ερευνητές απέδειξαν περαιτέρω ότι τέσσερα είναι τα πιο άφθονα μόρια των μικρών μορίων miRNAs του πλακούντα (miR-141, miR-149, το miR-299-5p, και του miR-135b) τα οποία είναι ανιχνεύσιμα στο μητρικό πλάσμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αλλά δεν ήταν ανιχνεύσιμα στο πλάσμα μετά την εγκυμοσύνη, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι είχαν πλακουντιακή προέλευση.

Ακολουθώντας, στον πλακούντα έχουν εντοπιστεί και άλλα ειδικά μόρια miRNAs που έχουν ταυτοποιηθεί στο πλάσμα και στον ορό σε διάφορες άλλες μελέτες. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν σαφώς ότι τα πλακουντιακά miRNAs απελευθερώνονται στην μητρική κυκλοφορία. Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) του πλακούντα έχει επίσης προταθεί ότι ανιχνεύονται στην κυκλοφορία μετά την εγκυμοσύνη, με τη μορφή των αποπτωτικών σωμάτων.

Οι Luo et al. απέδειξαν πρόσφατα ότι τα μικρά μόρια miRNAs εξάγονται από τους ανθρώπινους ιστούς του πλακούντα και συγκεκριμένα της συγγενισμένης της συγγενισμένης στην μητρική κυκλοφορία μέσω του σχηματισμού εξωσωμάτων και πρότεινε ότι τα μικρά μόρια miRNAs αντανάκλασαν την φυσιολογική κατάσταση της εγκυμοσύνης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία. Επειδή η συγγενισμένη τους πιθανότητα αντικατοπτρίζει ιστο-ειδικές φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με επιπλοκές της κύησης. Για τον προσδιορισμό των μικρών μορίων miRNAs, που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη και τις επιπλοκές της, οι ερευνητές έχουν λάβει δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Η πρώτη στρατηγική αρχίζει με τη σύγκριση των συγκεντρώσεων των miRNAs από ιστούς απομονωμένου πλακούντα μεταξύ ασθενών που πάσχουν από την διαταραχή και υγιείς μάρτυρες. Οι διαφορές στην έκφραση των μικρών μορίων miRNA που εντοπίζονται στον πλακούντα προσδιορίζεται με την ανάλυση των μικροσυστοιχιών ή των διαδικασιών αλληλούχισης δεύτερης γενιάς και στη συνέχεια επικυρώνονται από διαδικασίες ποσοτικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου. Επειδή το πλάσμα ή ο ορός είναι ο προτιμώμενος τύπος δειγμάτων ώστε να επιτραπεί μια μη επεμβατική διάγνωση, οι ασθενείς επιλέγονται για να προσδιοριστεί εάν είναι παρόντα στο μητρικό ορό ή στο πλάσμα μικρά μόρια miRNA. Η εναλλακτική στρατηγική είναι να ξεκινήσει η ευθεία ανάλυση του πλάσματος ή του ορού για την ανάλυση μικρών μορίων miRNA που συσχετίζονται με επιπλοκές της εγκυμοσύνης. Τα miRNAs που προσδιορίζονται με τις προσεγγίσεις αυτές δεν είναι κατ' ανάγκη πλακούντο-ειδικά, αντίθετα τα πρότυπα διαφορικής έκφρασης των miRNAs μπορεί να αντανακλούν καταστάσεις εγκυμοσύνης ή παθολογικές καταστάσεις της μητέρας. Αν και η αναγνώριση των miRNAs ως μη επεμβατικών βιοδεικτών στην εγκυμοσύνη είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο, μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί στην αρχική φάση της μεθόδου. Ένας μεγάλος αριθμός των υποψηφίων miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί και πολλά από αυτά είναι πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για συγκεκριμένες διαταραχές της εγκυμοσύνης.

4.2 Η έκφραση miRNA στον πλακούντα

Οι τρέχουσες μελέτες για την ανάλυση των miRNA και των σχετικών προτύπων έκφρασης δείχνουν ότι μια ομάδα miRNAs που εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά από τον πλακούντα και τους εμβρυϊκούς ιστούς του εγκεφάλου (Miura et al., 2010). Η περιοχή τους στο γονιδίωμα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, C19MC και αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο σύμπλεγμα miRNA που αναφέρθηκε ποτέ. Αποτελείται από 54 miRNAs, 43 εκ των οποίων έχουν κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί (Bentwich et al. 2005, Bortolin-Cavaillé et al, 2009, Liang et al., 2007).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτό είναι παρόν μόνο στα πρωτεύοντα θηλαστικά και φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα επικαλύψεων και μεταλλάξεων. Εκτός από την τρέχουσα αύξηση της γνώσης σχετικά με miRNA, δεν είναι ακόμη σαφές εάν όλοι οι τύποι miRNAs βρίσκονται σε μια μορφή συμπλέγματος με cis και trans μορφές (Tsai et al., 2009).

Η μελέτη κατέδειξε ότι η υπερμεθυλίωση ενός mRNA επηρεάζει σημαντικά το πρότυπο έκφρασης ενώ η κατάσταση μεθυλίωσης μιας περιοχής πλούσιας σε CpG έχει επίσης καθοριστική σημασία. Η αποτύπωση γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης έχει φανεί συχνά να εκφράζεται μόνο σε εμβρυϊκά στάδια ή σε ιστούς του πλακούντα, δείχνοντας ότι τα miRNA εμπλέκονται στην ανθρώπινη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Tsai et al., 2009).

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί έξι διαφορετικά ήδη miRNAs που επάγουν την ρυθμιζόμενη έκφραση σε υποξικούς τροφοβλάστες (MiR-93, miR-205, το miR-224, το miR-335, το miR-451 και M1K 491) και χαρακτηρίζονται από μια προς τα κάτω ρύθμιση της έκφρασης σε κατάσταση υποξίας (miR-424) (Mouillet et al. 2010, Donker et al 2007).

Η έκφραση του γονιδίου MED1, είναι αρκετά υψηλή σε πλακούντες ποντικού (Mouillet et al., 2010). Το γονίδιο MiR-205 εκφράζεται σε πρότυπα αιμοποιητικών και αναπαραγωγικών συστημάτων (Landgraf et al., 2007). Ιδιαίτερα εκφράζεται σε κύτταρα τροφοβλάστης και τα επίπεδα της είναι μη ανιχνεύσιμα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Mouillet et al., 2010). Το γεγονός υποδηλώνει ότι το γονίδιο miR-205 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή του επιθηλίου του πλακούντα σε καταστάσεις τραυματισμού.

Πολλές περαιτέρω έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs και η έκφραση τους μεταβάλλεται σε τραυματισμένους πλακούντες έπειτα από έκθεση σε τοξικούς παράγοντες. Σε ασθενείς που εκτίθενται σε καπνό τσιγάρου οι πλακούντες τους έχουν χαρακτηριστική έκφραση στα γονίδια miR-16, miR-21 και miR-146a ρυθμίζεται μετά από πρόκληση και έκθεση σε καπνό τσιγάρου (Maccani et al. 2010).

Στην αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά TCL-1, το γονίδιο miR-146a επηρεάζεται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο μέσω της μείωσης της έκφρασης στη νικοτίνη και το βενζοπυρένιο (Maccani et al. 2010). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ένα σημαντικό ρόλο του γονιδίου miR-146 σε καταστάσεις στρες.(Avissar-Whiting et al., 2010).

Πρόσφατες μελέτες έχουν περιγράψει μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης των miRNA στην προεκλαμψία. Σε μία μελέτη φάνηκε η έκφραση των γονιδίων miR-210, το miR-1, σε μια περιοχή που εδράζεται στο 14q32.31, όπως και η επίδραση στα γονίδια miR-584 και miR-34c-5P, με μόνο το miR-210 να μπορεί να επιβεβαιώσει τη συμμετοχή του στον παθομηχανισμό της προεκλαμψίας.

Η έκφραση κάποιων άλλων miRNAs είναι αυξημένη σε περιπτώσεις χοριοκαρκινώματος σε σύγκριση με τα κύτταρα της κανονικής τροφοβλάστης (miR-9 *, miR-96, miR-203, το miR-372 και miR-200a) (Chao et al., 2010). Μέσα σε αυτή την ομάδα κυττάρων και κυτταρικών τύπων, εμφανίζεται υπερέκφραση του γονιδίου M1K 199b που μπορεί να εμφανίσει ένα ρόλο κλειδί στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της τροφοβλάστης γεγονός που οδηγεί σε αυξανόμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του χοριοκαρκινώματος.

Μέχρι στιγμής, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά για την έκφραση miRNA σε μεμονωμένους τύπους κυττάρων στο πλακούντα δηλαδή σε ιστούς που βρίσκονται γύρω τα κύτταρα τροφοβλάστης. Το γονίδιο και το εκφραζόμενο μόριο ριβονουκλεοτιδίων miR-320 επάγεται με βλαστοκύστες κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μήτρας (Xia et al., 2010a, b). Το μόριο MiRNA-222 έχει περιγραφεί ως σημαντικός παράγοντας διαφοροποίησης των κυττάρων του ενδομητρίου σε στρωματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Qian et al., 2009).

4.3 miRNAs σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα

Παρόμοια με την έκφραση του γονιδίου C19MC, σε μελέτες σε ειδικά ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (HES) φάνηκε ένα ειδικό πρότυπο έκφρασης των miRNA.

Η μεγάλη πλειοψηφία των μορίων σε αυτούς τους ιστούς χαρακτηρίζεται από miRNAs που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 19 και το φυλετικό χρωμόσωμα X (Navarro και Monzo 2010, Suh et al, 2004). Μεταξύ των 36 μορίων miRNAs που εντοπίστηκαν, επτά miRNAs εκφράστηκαν αποκλειστικά σε HES κύτταρα (miR-200C, miR-368, mir-154 *, miR-371, το miR-372, το miR-373 και του miR-373 *) γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα miRNAs ελέγχουν συγκεκριμένες σημαντικές λειτουργίες των HES. Περαιτέρω, αυτή η μελέτη αποκάλυψε επίσης μια ομάδα miRNAs που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης και σε αυτά περιλαμβάνονται τα let-7, miR-301, το miR-374, το miR-21, miR-29b και το miR-29.

Οι ερευνητές στην περίπτωση αυτή αναφέρουν ότι τα miRNAs μπορεί να είναι οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης HES ή της διαφοροποίησης. Ως εκ τούτου, ο εντοπισμός των mRNAs θα παρέχει πληροφορίες σχετικά με το δίκτυο της ρύθμισης των μοριακών μονοπατιών σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Suh et al., 2004). Πρόσθετες μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή των miRNAs σε εμβρυϊκά κύτταρα και η συμμετοχή τους στην διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων έχουν προσδιοριστεί σε ποντικούς. Το γονίδιο MiR-17 και τα μέλη της οικογένειας τους όπως τα miR-17-5p, miR-20a, miR-93, και miR-106a, εκφράζονται διαφορετικά σε αναπτυσσόμενα έμβρυα ποντικού και φαίνεται να έχουν πολύ σημαντική λειτουργία για τον έλεγχο της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.

Τα γονίδια MiR-93 και miR-17-5p εκφράζονται έντονα μέσα στο μεσόδερμα εμβρυικών κυττάρων και συγκεκριμένα το miR-93 εντοπίζεται ως κύριο μόριο διαφοροποίησης σε κύτταρα ενδοδέρματος και τροφοεξωδέρματος σε κύτταρα βλαστοκύστης (Foshay και Gallicano, 2009). Μια πιο πρόσφατη μελέτη σε εμβρυϊκά κύτταρα ποντικών που έχουν αναλυθεί που βρίσκονται σε κάθε στάδιο ανάπτυξης, έχει προσδιοριστεί ένας μόνο μικρός αριθμό miRNAs που επάγονται ή καταστέλλονται σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή.

Παρατήρησαν επίσης ότι σε αρκετές μελέτες έχουν προσδιοριστεί miRNAs που χαρακτηρίζονται από δραματικές αλλαγές κατεύθυνσης στην έκφραση μεταξύ των

διαδοχικών σταδίων ανάπτυξης και προτείνουν ότι εκφράζονται έντονα μόνο κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων. Από την μελέτη τους βρέθηκαν εννέα μόρια miRNAs που εμπλέκονται στην ανάπτυξη τροφοεξωδέρματος όπως τα miR-297, το miR-96, το MIK 21, το miR-29c, το miR-214, το miR-125a και το miR-424. Τα μόρια mRNA έχουν επίπεδα έκφρασης ρυθμισμένα προς τα πάνω, ενώ το miR-376a ρυθμίζεται προς τα κάτω σε διαδικασίες σχηματισμού της βλαστοκύστης (Viswanathan et al., 2009).

Κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από κύτταρα βλαστοκύστης, παρατηρείται αυξημένη έκφραση κυρίως σε μέλη της οικογένειας των γονιδίων let-7 και miR-24.

Το γονίδιο MiR-24 sdx2 αποτελεί στόχος και σημαντικός δείκτης βλαστικών κυττάρων που είναι σημαντικός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της κυτταρικής διαφοροποίησης (Viswanathan et al., 2009).

4.4 Συμμετοχή των miRNA στη ρύθμιση της ανοσοανοχής σε μητέρα και έμβryo

Αρκετά μόρια miRNAs φαίνεται να καταστέλλουν την έκφραση του ανοσοποιητικού συστήματος που σχετίζεται με αντίστοιχα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των HLA-G, χωρίς να μεταβάλλουν την γονιδιακή ρύθμιση της τροφοβλάστης. Σε διαφορετικές παθολογικές και μη καταστάσεις, τα HLA-G εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανοσολογικής ανοχής, όπως στην εγκυμοσύνη, σε φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες ή στον καρκίνο (Veit και Chies, 2009). Η μη φυσιολογική έκφραση των HLA-G σχετίζεται με την κακή έκβαση της νόσου (Chen et al., 2010). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν μια παρεκκλίνουσα υπερμεθυλίωση των miR-148 και miR-152 σε πρωτογενή ανθρώπινα δείγματα κυττάρων καρκίνου του μαστού, υποδηλώνοντας ένα ρυθμιστικό ρόλο για αυτά τα μόρια miRNAs στην έκφραση των HLA-G (Lehmann et al., 2008).

Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε από μια μελέτη σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος. Το γονίδιο MiR-152 επηρεάζει την έκφραση των HLA-G. Επιπλέον, η υπερ-έκφραση του γονιδίου miR-152 αυξάνει τη διαμεσολαβούμενη κυτταρόλυση σε

σε κυτταρικές σειρές NK υποδηλώνοντας ότι το miR-152 έχει ένα σημαντικό ρόλο στην απόκριση της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Zhu et al., 2010).

5. Τα σχετιζόμενα με την εγκυμοσύνη miRNAs στο μητρικό περιφερικό αίμα

Τα κύτταρα του πλακούντα είναι υπεύθυνα για την ενίσχυση του περιφερικού αίματος με μόρια miRNAs στη μητρική κυκλοφορία και φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προσαρμογή του οργανισμού σε καταστάσεις εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα όσον αφορά την επαγωγή ανοσολογικής ανοχής. Σε πολυάριθμες μελέτες σε κυττάρων C19MC προσδιορίστηκε ένα σύμπλεγμα μορίων miRNA που έχουν ανιχνευθεί στο μητρικό αίμα. Τα αυξημένα επίπεδα του πλάσματος σε πλακουντιακά μόρια RNA συνδέονται με κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με την δυσλειτουργία του πλακούντα, όπως η προεκλαμψία και ο περιορισμός στην ενδομήτρια ανάπτυξη, ενώ είναι λίγα γνωστά σχετικά με την παρουσία miRNA του πλακούντα στο αίμα της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και η συσχέτιση των επιπέδων με την εμφάνιση με ασθενειών.

Ο πλακούντας παρουσιάζει ειδική έκφραση σε μόρια miRNA γεγονός που οδηγεί σε αλλαγές στον ορό του αίματος ειδικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ορισμένα miRNA μπορεί να τροποποιούνται στην έκφραση τους έως και πάνω από 600 φορές γεγονός που δίνει την δυνατότητα σε ερευνητές να διακρίνουν με ακρίβεια ποιές γυναίκες είναι έγκυες σε σχέση με τις μη έγκυες γυναίκες, αναλύοντας τα δεδομένα τριών μορίων miRNA που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (miR-526a, miR-527 και 520d-5P) (Gilad et al., 2008).

Ανάμεσα στα σημαντικά αυξημένα επίπεδα μορίων miRNAs στο πλάσμα εγκύων, τα miRNA-424 και miR-141 αποτελούν χρήσιμα μόρια για τη διάγνωση των κακοηθειών (Mouillet et al., 2010α). Το μόριο MiR-141 ανήκει στην οικογένεια του συμπλέγματος miR-200, που φυσιολογικά εκφράζεται αποκλειστικά σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και συμμετέχει στην καρκινογένεση του καρκίνου του μαστού (Neves et al., 2010). Το μόριο MiR-424 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας.

Η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης είναι η δεύτερη κύρια αιτία περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Πρόσφατα, μια συσχέτιση μεταξύ του FGR και των αυξημένων επιπέδων κυκλοφορούντων miRNA έχει περιγραφεί με βάση τις συνθήκες υποξίας οι οποίες εμπλέκονται συχνά στην παθοφυσιολογία της ανάπτυξης του εμβρύου και στον ενδομήτριο περιορισμό της.

6. Η συσχέτιση των μικρών μορίων miRNA στην εμφάνιση προεκλαμψίας

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η προεκλαμψία (PE) είναι μια διαταραχή πολλαπλών συστημάτων που σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση της εγκυμοσύνης και χαρακτηρίζεται από υπέρταση, πρωτεϊνουρία, και άλλες συστηματικές διαταραχές κυρίως κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, κατά τη διάρκεια του τοκετού ή την πρώιμη περίοδο μετά τον τοκετό. Δέκα έως είκοσι τοις εκατό των σοβαρών περιπτώσεων της προεκλαμψίας μπορεί να εξελιχθεί σε HELLP σύνδρομο (αιμόλυση, αυξημένες ηπατικές λειτουργίες, χαμηλά αιμοπετάλια) και επιληπτικές κρίσεις (εκλαμψία) (Laughi et al 2007).

Η προεκλαμψία επηρεάζει το 5-8% των κυήσεων και είναι μια κορυφαία άμεση αιτία της μητρικής και νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Η κλινική διάγνωση γίνεται με την παρουσία αυξημένης αρτηριακής πίεσης ($\geq 140 / 90$ mmHg ή η μέση αρτηριακή πίεση ≥ 105 mmHg) και πρωτεϊνουρία (≥ 300 mg πρωτεΐνης σε 24-h συλλογής ούρων). Προς το παρόν δεν υπάρχουν αξιόπιστοι δείκτες για τον εντοπισμό ασθενών προσυμπτωματικά. (Laughi et al 2007).

Η πρώιμη ταυτοποίηση των γυναικών με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης PE είναι κρίσιμο σημείο για την αξιολόγηση της νόσου, διότι η προσεκτική παρακολούθηση και η παραπομπή σε εξειδικευμένη περιγεννητική φροντίδα που θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο. Επειδή είναι

γενικά αποδεκτό ότι ο πλακούντας διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της PE, αρκετές μελέτες έχουν ερευνήσει την έκφραση του προτύπου δράσης των μικρών μορίων miRNAs σε ιστούς πλακούντα. Σε μια από αυτές τις μελέτες, οι Pineles et al έκαναν μια επιλογή 157 miRNAs από μετά από μελέτες Realtime PCR και έδειξαν ότι η PE χαρακτηρίζεται από την αυξορρύθμιση αυτών των συγκεκριμένων μορίων miRNAs (του miR-182 και του miR-210) στον πλακούντα. Αναλύσεις μικροσυστοιχιών που βασίστηκαν σε ταυτόχρονη πραγματοποίηση μελετών PCR πραγματικού χρόνου, προσδιορίζοντας περαιτέρω έναν αριθμό διαφορικών εκφραζόμενων πλακουντιακών miRNAs σε καταστάσεις PE (Fabian et al 2009).

Πιο πρόσφατα, οι Ishibashi et al. πραγματοποίησαν μια συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ κανονικών φυσιολογικών γυναικών και γυναικών με προεκλαμψία σε μεγάλη κλίμακα, με μεθοδολογίες υψηλής απόδοσης αλληλούχισης και ποσοτική PCR προσδιορίστηκαν 22 miRNAs, που είναι σημαντικά ρυθμιζόμενα σε πλακούντες με προεκλαμψία.

Με βάση έρευνες για τα πρότυπα έκφρασης των μη κωδικών μικρών μορίων miRNA σε ασθενείς με PE μπορεί δυνητικά να ενισχύσουν την κατανόησή μας για την παθοφυσιολογία της νόσου. Αλλά από μια διαγνωστική σκοπιά, ο ορός ή το πλάσμα αποτελούν ένα προτιμώμενη δείγμα επιλογής. Σε μια μικρή μελέτη, οι Yang et al χρησιμοποίησαν μια διαδικασία επιλογής αλληλούχισης σε πρότυπα έκφρασης μικρών μορίων miRNA στον ορό 4 γυναικών με PE κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης

Δεκαπέντε μικρά μόρια miRNAs προσδιορίστηκαν ως άνω και επτά προς τα κάτω ρυθμιζόμενα σε ασθενείς με ασθενείς με PE [24]. Μια άλλη ομάδα που χρησιμοποίησε μικροσυστοιχίες για να ταυτοποιήσει τα μικρά μόρια miRNAs στο ορό ασθενών που λαμβάνονται στις 37-40 εβδομάδες κύησης από γυναίκες με όψιμη έναρξη της PE. Βρέθηκε ότι, 13 είχαν προς τα άνω και 2 προς κάτω-ρυθμιζόμενα miRNAs. Παράλληλα 7 μικρά μόρια (miR-24, miR-26a, miR-103, το miR-130β, miR-181, το miR-342-3p και το miR-574-5p) σε αναλύσεις πραγματικού χρόνου PCR βρέθηκαν

αυξημένα σε πλάσμα γυναικών με σοβαρή PE. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα πρότυπα έκφρασης των μορίων miRNA έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες, που αποδίδουν σημαντική ετερογένεια σε πληθυσμούς ασθενών (Fabian et al 2009).

Παρ' όλα αυτά, αρκετά μόρια miRNAs έχουν επιβεβαιωθεί από διάφορες ομάδες. Ειδικότερα, αρκετοί ανεξάρτητοι ερευνητές έχουν δείξει ότι τα επίπεδα miR-210 είναι αυξημένα σε ιστούς του πλακούντα σε ασθενείς με PE. Τα ευρήματα αυτά έχουν προσελκύσει πολλή προσοχή και έχουν οδηγήσει σε μελέτες παρακολούθησης για την αξιολόγηση των μορίων miR-210 ως πιθανό μη επεμβατικό βιοδείκτη σε ασθενείς με PE. Οι Zhang et al παρατήρησαν μια αυξημένη ρύθμιση μορίων miR-210 στο πλάσμα των ασθενών με PE (n = 15), με μεγαλύτερη αύξηση σε πιο σοβαρές μορφές PE σε σχέση με ήπιες μορφές PE. Επειδή υπάρχει ανεπαρκής οξυγόνωση του πλακούντα πιστεύεται ότι η αιτία αυτή αποτελεί σημαντικό λόγω παρουσίας της PE, με την ομάδα αυτή να έχει εξετάζει τροφοβλαστικά κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν υπό συνθήκες υποξίας, υπολογίζοντας ότι το μόριο miR-210 εμφανίζει αυξορρύθμιση σε αυτές τις καταστάσεις. Επιπλέον, η έκτοπη έκφραση των μορίων miR-210 αναστέλλει την ικανότητα μετανάστευσης και εισβολής των καλλιιεργημένων κυττάρων της τροφοβλάστης σε πειραματικές δοκιμασίες. Αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας για να διαπιστωθεί αν το μόριο miR-210 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης για την πρόβλεψη της εμφάνισης ή τη σοβαρότητα της PE.

Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν τα miRNAs που μπορούν να οδηγήσουν στην πρόβλεψη της PE νωρίς κατά την εγκυμοσύνη, πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων οι Hromadnikova et al χρησιμοποίησαν αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επτά προηγούμενων μικρών μορίων miRNA που σχετίζονται με την κύηση κατά τη διάρκεια της πρόωρης εγκυμοσύνης. Σε σύγκριση με καταστάσεις φυσιολογικής εγκυμοσύνης, οι συγγραφείς διαπίστωσαν σημαντικές μεταβολές στα μικρά μόρια miRNAs κατά τη διάρκεια της πρώιμης κύησης

(μέσα στην 12η έως την 16η εβδομάδα) στο πλάσμα των γυναικών που έχουν αναπτύξει PE (n = 5), με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (IUGR) (n = 1) ή IUGR (N = 1).

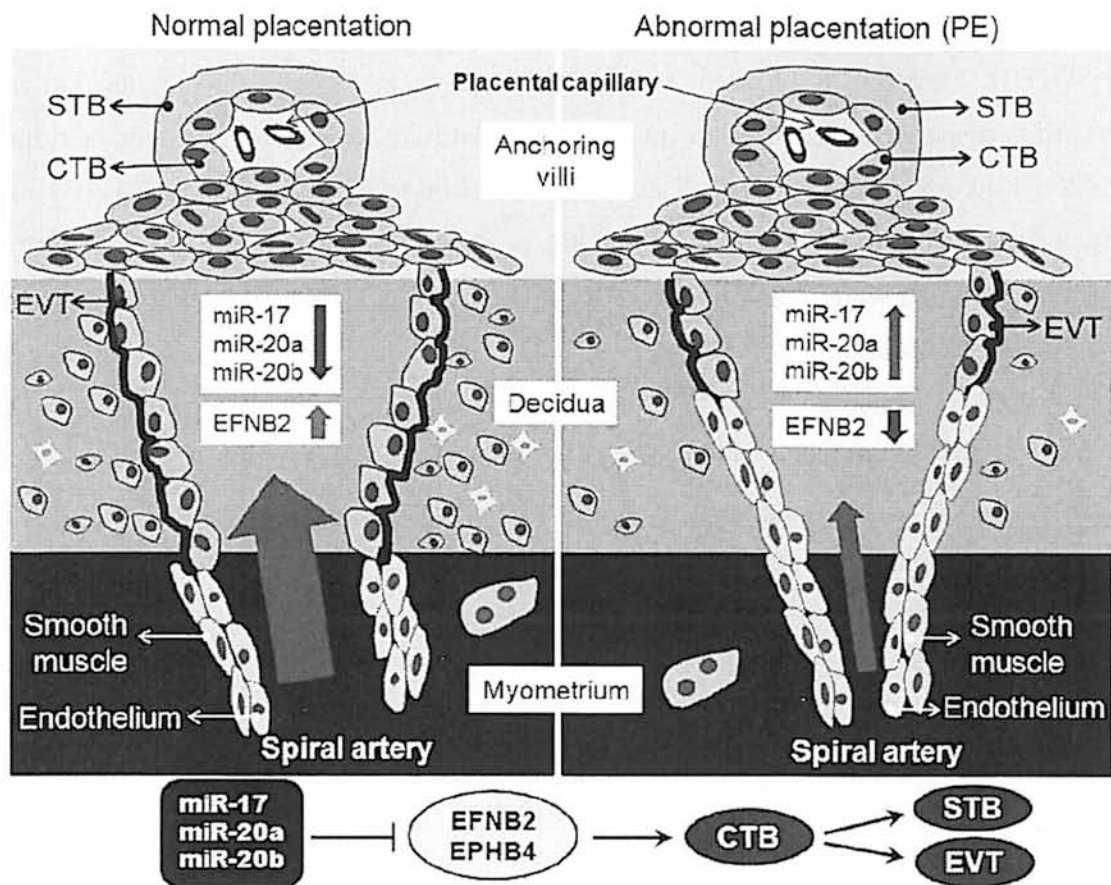
Είναι ενδιαφέρον ότι οι συγκεντρώσεις αυτών των miRNAs δεν ήταν διαφορετικές από τους ελέγχους κατά τη στιγμή της κλινικής εκδήλωσης της PE ή του IUGR. Τα αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη είναι ελπιδοφόρα και δείχνουν ότι τα μόρια αυτά είναι πολύ ελκυστικοί υποψήφιοι για την έγκαιρη πρόβλεψη της PE.

Δυστυχώς, το μικρό μέγεθος των δειγμάτων στις περισσότερες μελέτες περιορίζει την ικανότητά να μπορούμε να εκτιμούμε τη διαγνωστική ισχύς αυτών των miRNAs στην συμμετοχή τους στην εξέλιξη της PE. Σε μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και παρακολούθησης είναι αναγκαίο να επιβεβαιωθούν περαιτέρω αυτά τα συμπεράσματα. Επιπλέον, μια πιο ολοκληρωμένη συστηματική έρευνα μικροσυστοιχιών και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του προτύπου έκφρασης των miRNA πριν την έναρξη της PE θα πρέπει να διεξάγεται με την ελπίδα εντοπισμού πρόσθετων μορίων miRNAs με αλλαγμένες συγκεντρώσεις στο πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης. Αυτή η προσπάθεια μπορεί να βοηθήσει όχι μόνο στην αναγνώριση των γυναικών με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης PE, αλλά και στην στρωματοποίηση της σοβαρότητας την νόσου.

Δεδομένου του ρόλου των μη κωδικών μικρών μορίων miRNAs στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων, όχι μόνο μπορεί να βοηθήσει στο να πέσει φως σχετικά με το υποκείμενο των παθολογικών μηχανισμών εξέλιξης της νόσου, αλλά μπορεί επίσης να παρέχει πρόσθετα διαγνωστικά εργαλεία αξιολόγησης της PE.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Ishibashi et al πραγματοποίησαν μια μεγάλης κλίμακας μελέτη, χρησιμοποιώντας τεχνικές υψηλής απόδοσης για την ταυτοποίηση miRNAs που αυξάνονται σε ιστούς του πλακούντα σε ασθενείς με PE. Η υπολογιστική ανάλυση αξιολόγησης του Υδροξυστεροειδούς (17-β) και της αφυδρογονάσης 1 (HSD17B1), το οποίο αποτελεί ένα στερεοειδογεντικό ένζυμο που εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα, ως κοινός στόχος πέντε miRNAs μπορεί να βοηθήσει αισθητά στην αξιολόγηση των κλινικών περιπτώσεων ασθενών με PE. Από αυτά, δύο μόρια όπως τα

miR-210 και τα miR-518c, έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι στοχεύουν το γονίδιο HSD17B1. Επιπλέον, η έκφραση του HSD17B1, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδα πρωτεΐνης, φαίνεται να μειώνεται σημαντικά σε πλακούντες και πλάσμα ασθενών με προεκλαμψία. Για να εκτιμηθεί η λειτουργία του γονιδίου HSD17B1 ως προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση PE, οι συγγραφείς έκαναν και μια προοπτική μελέτη. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της πρωτεΐνης HSD17B1 μειώθηκαν σημαντικά σε εγκύους ασθενείς που βρίσκονταν στις 20-23 και 27-30 εβδομάδες της κύησης, πριν την έναρξη της PE, σε σύγκριση με εκείνες τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση. Οι ευαισθησίες (75% και 88%), οι ειδικότητες (67% και 51%) και οι αναλογίες πιθανοτήτων (6,09 και 7,83) των συγκεκριμένων περιπτώσεων για την πρόβλεψη της PE στις 20-23 και στις 27-30 εβδομάδες της κύησης ήταν πολύ ενθαρρυντικά στοιχεία και δείχνουν ότι τα επίπεδα HSD17B1 στο πλάσμα είναι ένας πιθανός προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση της PE.



Εικόνα 3. Ο ρόλος των μικρών μορίων miR-17 και των παραγόντων EFNB2-EphB4 στην εξέλιξη της παθογένεσης της προεκλαμψίας

Τα κυκλοφορούντα λοιπόν μικρά μόρια miRNAs έχουν αναδειχθεί ως δυνητικά νέοι διαγνωστικοί βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες του ανθρώπου, όπως ο καρκίνος, ο τραυματισμός των ιστών, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς επίσης και η παθολογική εγκυμοσύνη. Σχετικά με αυτή την άποψη, αν και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της PE παραμένουν ελάχιστα κατανοητή, έχουν εμφανιστεί δεδομένα μιας δυσρυθμιζόμενης έκφρασης των miRNAs σε πρώιμα στάδια της κύησης (σε χρονικό

διάστημα 12-14 εβδομάδων) στον ορό εγκύων γυναικών που ανέπτυξαν PE στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 12 αυξορυθμιζόμενα και 7 μειορυθμιζόμενα μόρια miRNAs. Μεταξύ των μορίων miRNAs που ρυθμίζονται προς τα πάνω σε αυτά ανήκει το miR-210 και το miR-520a που σχετίζονται με PE. Όσον αφορά τα σημερινά δεδομένα, αξίζει να σημειωθεί ότι μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε την αύξηση αρκετών μικρών μορίων miRNAs στον ορό των γυναικών κατά τη διάρκεια της πρόωρης κύησης (δηλαδή κατά την 12η έως 16η εβδομάδα της κύησης) και σε περιπτώσεις με μεταγενέστερη έναρξη της PE [Friedman et al 2009].

Στην μελέτη Bartel et al, έχουν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα στην έκφραση του μορίου miR-1233 μέσω της τεχνολογίας chip, της TLDA και μέσω της επιβεβαίωσης με την μέθοδο της qRT-PCR, αναδεικνύοντας την τεχνική ως αξιοσημείωτο εργαλείο για τον έλεγχο της υπερ-έκφρασης miRNA σε ασθενείς με PE. Αν και αυτή είναι η πρώτη μελέτη που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του miR-1233 στην εκτίμηση της PE, αυτό το μόριο miRNA έχει ήδη εμπλακεί σε ασθενείς με νεφρικό καρκίνωμα.

Είναι ενδιαφέρον, επίσης το γεγονός ότι τα μικρά μόρια miRNAs που αυξορυθμίζονται στον ορό των εγκύων γυναικών που έχουν αναπτύξει καθυστερημένη PE, σχετίζονταν με τον καρκίνο σε αρκετές μελέτες, όπως τα miR-650 σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, miR-32 και miR-193a-3p για καρκίνο του παχέος εντέρου, το miR-152 στο καρκίνο του ενδομητρίου, το miR-215 και το miR-204 στο μεταστατικό νεφροκυτταρικό καρκίνωμα [Garofalo et al 2011].

Επιπλέον, σύμφωνα με τις τρέχουσες διαπιστώσεις, τα μόρια miR-296-5p και miR-25 έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένα σε πλακούντες γυναικών με PE. Αντίθετα, υπάρχουν επίσης και πολλά μειωμένα μόρια miRNAs στον ορό εγκύων γυναικών που αναπτύσσουν PE με όψιμη εμφάνιση, ενώ έχουν επίσης αναφερθεί προηγουμένως και σε ασθενείς με καρκίνο [Ryan et al 2011].

Ειδικότερα, τα μόρια miR-144 συσχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνων, με τα επίπεδα τους να μειώνονται σημαντικά σε ιστούς καρκίνου της ουροδόχου κύστης και σε καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ τα miRNA - 126 [23] miR-335, miR-668, miR-15β,

miR-204 θεωρούνται ογκοκατασταλτικά. Σύμφωνα λοιπόν με τα δεδομένα τα κυκλοφορούντα μόρια miRNAs είναι αυξημένα σε γυναίκες που ανέπτυξαν PE σε μεταγενέστερο στάδιο. Παρ' όλα αυτά, δεδομένου ότι η πλειονότητα των miRNAs δεν είχε επικυρωθεί από qRT-PCR, αλλά μόνο από TLDA, επιβεβαιωτικές μελέτες με qRT-PCR θα ενίσχυαν το ρόλος των miRNAs στην παθογένεια της PE [Ryan et al 2011].

6.1 Μοριακοί μηχανισμοί εμφάνισης της προεκλαμψίας

Οι αγγειολογικοί παράγοντες όπως ο παράγοντας ανάπτυξης του πλακούντα (PIGF), ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και οι υποδοχείς της Flt1, VEGFR-2, Tie-1 και Tie-2, αποτελούν σημαντικά μόρια για την εξέλιξη και την ανάπτυξη του πλακούντα. Μεταβολές στην ρύθμιση οδηγούν σε μεταβολές στην σηματοδότηση των μονοπατιών αγγειογένεσης σε περιπτώσεις πρώιμης εμφάνισης της προεκλαμψίας ενώ επηρεάζουν και την εισδοχή στην περιοχή της τροφοβλάστης σε ασθενείς με προεκλαμψία. Επιπρόσθετα, άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονώδης αντίδραση, η ανεπάρκεια του άξονα αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης καθώς και άλλες γενετικές ανωμαλίες μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου.

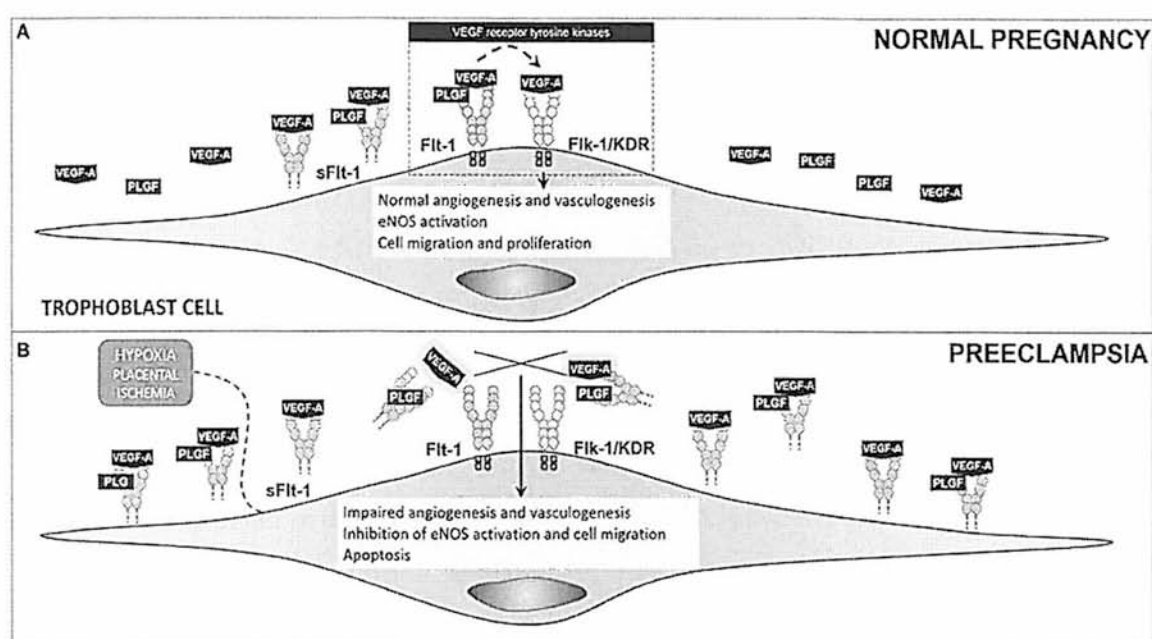
Από την άλλη ο πλακούντας φαίνεται ότι παράγει τοξίνες και άλλες κυτοκίνες. Ο ρόλος αυτών των αγγειογενετικών παραγόντων συνάδει με εκείνον του διαλυτού παράγοντα κινάσης της τυροσίνης καθώς και του πρόδρομου ενδογλυνικού παράγοντα σε καταστάσεις πρώιμης αγγειακής ανάπτυξης στην περιοχή του πλακούντα. Στις περιπτώσεις αυτές η υποξία φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας ενεργοποίησης.

Παράλληλα η διαδικασία της υποξίας φαίνεται να ενεργοποιεί την μειωμένη διαπερατότητα του πλακούντα των δραστικών μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Το οξειδωτικό στρες ευνοεί την απελευθέρωση και την ενεργοποίηση κυτοκινών, αντιαγγειακών παραγόντων, μικροσωματιδίων και άλλων πιθανών προσδετών.

Τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων sFlt1 και sEng έδειξαν αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες, εβδομάδες πριν την εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων της ασθένειας. Συγκρίνοντας

νορμοτασικούς ασθενείς με εκείνους με προεκλαμψία, τα αυξημένα επίπεδα του ελεύθερου PIGF και VEGF είναι σημαντικά μειωμένα, ενώ τα επίπεδα των sFlt1 είναι σημαντικά αυξημένα.

Είναι λοιπόν σαφές ότι η αύξηση του sFlt1 σχετίζεται με την μειωμένη παραγωγή των PIGF και VEGF επηρεάζοντας την ανάπτυξη του πλακούντα. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Αυτές οι αλλαγές προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία οδηγώντας σε υπέρταση και πρωτεϊνουρία δηλαδή στην εξέλιξη της προεκλαμψίας.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου του VEGF στην εμφάνιση προεκλαμψίας

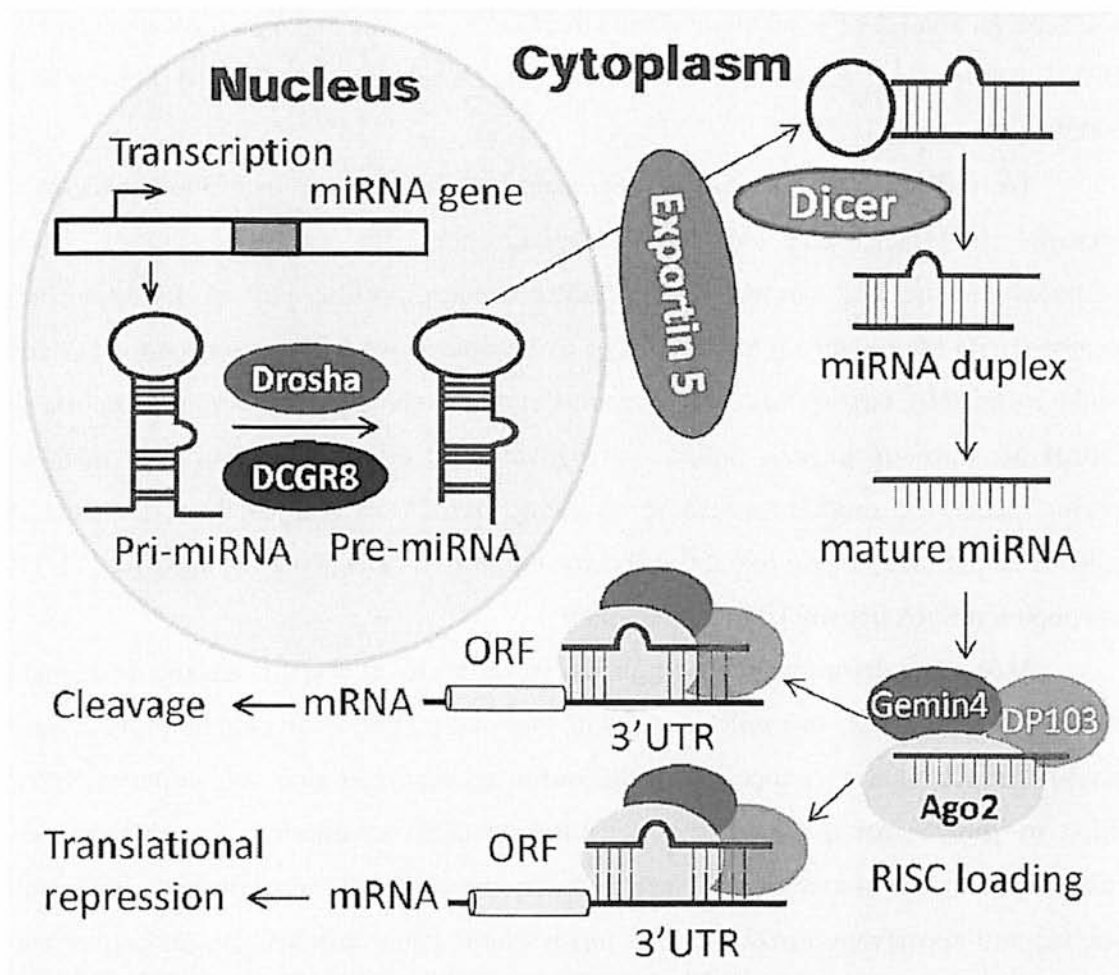
Εικόνα 4. Η διαδικασία της υποξίας φαίνεται να ενεργοποιεί την μειωμένη διαπερατότητα του πλακούντα των δραστικών μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, την ενεργοποίηση κυτοκινών, αντιαγγειακών παραγόντων, μικροσωματιδίων και άλλων πιθανών προσδετών.

6.2 Βιογένεση και λειτουργία των μικρών μορίων miRNAs και η σχέση τους με την προεκλαμψία

Μη κωδικοποιητικό RNA ή μικρό RNA είναι ένα μόριο RNA που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη (όπως το αγγελιαφόρο RNA), αλλά έχει κάποιον άλλο λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο. Τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη μη κωδικοποιητικού RNA είναι το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA), που παίζουν σημαντικό υποστηρικτικό ρόλο στην μετάφραση. Η περιοχή του γενετικού κώδικα όπου κωδικοποιείται ένα μη κωδικοποιητικό RNA (αντί για μία πρωτεΐνη), ονομάζεται «γονίδιο RNA».

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 διάφοροι νέοι τύποι μη κωδικοποιητικού RNA έχουν ανακαλυφθεί, ενώ οι επιστήμονες έχουν εξιχνιάσει τον ρόλο που παίζουν πολλοί από αυτούς. Στις αρχές της δεκαετίας του 2000 υπήρχαν ενδείξεις ότι η μεταγραφή στα κύτταρα των θηλαστικών (και ίσως και σε άλλα) ήταν πιο πολύπλοκη από ό,τι πιστευόταν ως τότε. Αυτό έδειξε ότι ο ρόλος του RNA είναι πολύ πιο ευρύς στη βιολογία και παίζει ενεργό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση. Μια ιδιαίτερη ομάδα μη κωδικοποιητικού RNA είναι το μικροRNA (μRNA), που ανακαλύφθηκε στον άνθρωπο και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και παίζει κομβικό ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας πολλών γονιδίων.

Η βιοσύνθεση miRNA αρχίζει με την RNA πολυμεράση II μέσω της αρχικής εξαρτώμενης μεταγραφής των μεγάλων πρωτογενών μορίων pri-miRNAs από τα γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs, πολλά από τα οποία βρίσκονται στα εσώνια των γονιδίων του ξενιστή τους. Αυτές οι μορφές των pri-miRNAs αποτελούν σημαντικά πρόδρομα μόρια. Στα θηλαστικά, τα μεγάλου μήκους pri-miRNAs πρώτα υφίστανται σημαντική επεξεργασία στο πυρήνα μέσω μιας διαδικασίας που γίνεται από την RNase III ενδονουκλεάση και την δεσμευτική πρωτεΐνη στο δίκλωνο μόριο RNA (dsRNA), DGCR8, σχηματίζοντας ένα πρόδρομο μόριο 60-70 νουκλεοτιδίων miRNA (pro-miRNA) με δομή στελέχους-βρόχου [Fasanaro et al 2008].



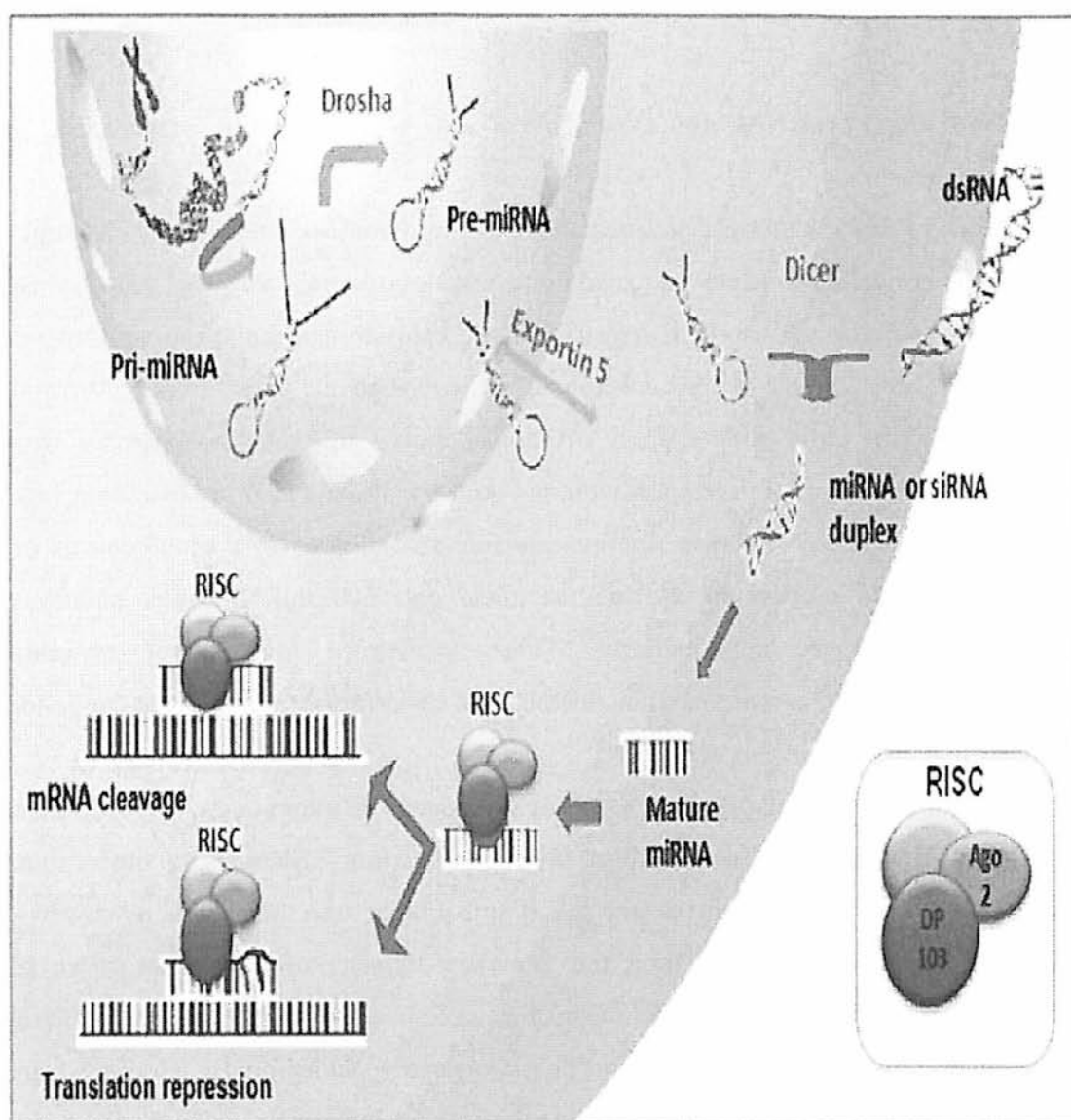
Εικόνα 5. μορφές των *pri-miRNAs* αποτελούν σημαντικά πρόδρομα μόρια . Στα θηλαστικά, τα μεγάλου μήκους *pri-miRNAs* υφίστανται σημαντική επεξεργασία στο πυρήνα.

Τα πρόδρομα μόρια *pro-miRNAs* στη συνέχεια εξάγονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την βοήθεια του παράγοντα Exportin 5 και υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία με ένα άλλο ένζυμο την RNase III σχηματίζοντας δίπολα miRNA. Τέλος, η αμφίδρομη μορφή των miRNA ξετυλίγεται, οδηγώντας σε ενίσχυση των λειτουργιών του ώριμου miRNA, το οποίο ενσωματώνεται στο σύμπλοκο επαγόμενης σίγασης (RISC)

που περιέχει πρωτεΐνες στον πυρήνα του και άλλες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων της DP103 ελικάσης, της gemin4 και του γονιδίου της λευχαιμίας 10 (MOV10) [Meister et al 2005].

Το miRNARISC σύμπλεγμα δεσμεύει ειδικές θέσεις στο 30-αμετάφραστη περιοχή (30UTR) των mRNA στόχου, προκαλεί απενεργοποίηση μέσω πολυαδενυλίωσης και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση, καθώς και σε μεταφραστική καταστολή. Η Μεταγραφική αναστολή έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το miRNA καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης. Η βιβλιογραφία προτείνει έντονα ότι αυτό σε μεγάλο βαθμό επιτυγχάνεται με αποσταθεροποιητικούς mRNAs στόχου μέσω της συμπληρωματικής σύνδεσης μεταξύ της ακολουθίας των μορίων miRNA με μια αλληλουχία από 2-7 νουκλεοτίδια miRNA και μέσω της περιοχής 3'UTR του μορίου mRNA στόχου [Bartel et al 2009].

Δεδομένου ότι η αντιστοίχιση μπορεί να είναι είτε τέλεια είτε ατελής σε επίπεδο συμπληρωματικότητας, ένα miRNA είναι σε θέση να ρυθμίζει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων και επομένως μπορεί να ρυθμίζονται περισσότερα από ένα μόρια miRNA. Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία της βιβλιογραφίας επισημαίνει ένα ανασταλτικό ρόλο στην λειτουργία των miRNA στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, υπάρχουν μελέτες που προτείνουν εναλλακτικούς μηχανισμούς μέσω miRNA που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου. Για παράδειγμα, το μόριο miR-373 έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση της E-cadherin μέσω των C2 στοχευμένων συμπληρωματικών αλληλουχιών στον υποκινητή τους [Place et al 2008].



Εικόνα 6. Το miRNARISC σύμπλεγμα δεσμεύει ειδικές θέσεις στο 30-αμετάφραστη περιοχή (30UTR) των mRNA στόχων, προκαλεί απενεργοποίηση μέσω πολυαδενυλίωσης και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση, καθώς και σε μεταφραστική καταστολή. Η Μεταγραφική αναστολή έχει αναγνωριστεί ως ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το miRNA καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης.

6.3 Ειδικά μόρια miRNAs που εκφράζονται από τον πλακούντα σε ασθενείς με προεκλαμψία

Από το 2007, διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μεθόδους υπολογισμού μικρών μορίων miRNA μέσω της ανάλυσης μικροσυστοιχιών και της μεθόδου της μελέτης πραγματικού χρόνου PCR σχετικά με τον πρότυπο έκφρασης των miRNAs σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις σε ανθρώπινους πλακούντες. Αυτές οι μελέτες έκφρασης έχουν αποκαλύψει ότι πολλά ειδικά miRNAs εκφράζονται στον ανθρώπινο πλακούντα. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη μελέτη ανάλυσης του γονιδιώματος σε επίπεδο ελέγχου για την παρουσία των miRNA έχει προσδιοριστεί ότι σε ένα ανθρώπινο πλακούντα περιέχονται πάνω από 600 miRNAs των οποίων η λειτουργία οφείλει να προσδιοριστεί. Άλλοι ερευνητές έχουν επίσης εντοπίσει περισσότερες από 300 μορφές ώριμων miRNAs σε ανθρώπινο πλακούντα με τη χρήση διαφόρων συστοιχιών [Mayor et al 2011].

Η ανάλυση των μικρών miRNA στον ανθρώπινο πλακούντα έχει προσδιορίσει πολυάριθμα miRNAs με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης. Μέσω της διαδικασίας αλληλούχισης έχει κατασκευαστεί μια μικρή βιβλιοθήκη από RNA του ανθρώπινου πλακούντα ειδικά μέσω της ανάλυσης των χοριακών λαχνών και έχει βρεθεί ότι πολλά μόρια miRNAs του πλακούντα έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης που κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα γονιδίων C19MC που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19. Το σύμπλεγμα C19MC είναι η μεγαλύτερη συστάδα γονιδίων του ανθρώπου γονιδιώματος που εκφράζουν miRNA.

Αυτή η ομάδα είναι πρωτεύον σύμπλεγμα έκφρασης και εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πλακούντα. Τα ανοίγματα του συμπλέγματος C19MC απαρτίζουν περίπου τα 100 kb του ανθρώπινου χρωμοσώματος στην περιοχή 19q13.41, που αποτελείται από 54 μικρά μόρια miRNAs, ενώ 43 έχουν κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί [Zhang et al 2008].

Το σύμπλεγμα C19MC miRNAs κωδικοποιεί και συμβάλλει στην λειτουργία των εξονίων μέσω της μεταγραφής της πρωτεΐνης Pol-II. Τα πρότυπα έκφρασης συνδέονται με την κατάσταση μεθυλίωσης μιας περιοχής πλούσιας σε CpG με μέγεθος περίπου 17,6 kb που κωδικοποιεί συμπλέγματα κωδικοποίησης. Η μεθυλίωση του DNA και το πρότυπο της στην περιοχή του συμπλέγματος C19MC ρυθμίζει την γονιδιωματική αποτύπωση μόνο των μορίων αλληλομόρφων που έχουν πατρική έκφραση στον πλακούντα, αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο του στην ανθρώπινη εμβρυϊκή ανάπτυξη, που είναι παρόμοιος με εκείνο άλλων αποτυπωμένων γονίδια όπως αυτού του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 2 [St-Pierre et al 2011].

Μελέτες σχετικά με το πρότυπο έκφρασης του συμπλόκου C19MC που κωδικοποιεί miRNAs στους πρωτογενείς ανθρώπινους τροφοβλάστες (PHTs) αποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των ανθρώπινων miRNAs που εκφράζονται στην τροφοβλάστη, εκφράζονται σε πολύ υψηλότερο επίπεδο. Η υψηλότερη έκφραση του συμπλέγματος C19MC περιλαμβάνει τα miR-517a, 517b miR-, miR-516b, miR-525-5p, miR-512-3p και miR-515-3p. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διαπίστωση ότι τα μόρια miR-517a-3p, miR-519a-3p και το miR-520c-3p εκφράζονται σε αφθονία στον πλακούντα μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων [St-Pierre et al 2011], υποδεικνύοντας ότι οι ειδικές λειτουργίες του πλακούντα δεν περιορίζονται μόνο στην τροφοβλάστη.

Επιπλέον, ορισμένα από αυτά τα πλακουντιακά ειδικά μόρια miRNAs έχουν ανιχνευθεί στην μητρική κυκλοφορία κατά την διάρκεια της κύησης με σημαντική μείωση μετά τη λήξη της κύησης, συμπεριλαμβανομένων των miR-515-3p, miR-516-5p, miR-517a, miR-517c, miR-518b, miR-520A *, miR-520H, miR-525, το miR-526a και του miR-526b [Miura et al 2010].

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα μητρικώς κυκλοφορούντα miRNAs μπορεί να αποτελέσουν δυναμικούς νέους παράγοντες διάγνωσης για τις διαταραχές της εγκυμοσύνης. Αν και οι βιολογικές λειτουργίες του συμπλέγματος C19MC στον πλακούντα προς το παρόν είναι άγνωστες, ωστόσο η παρουσία του θεωρείται σημαντική

για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του πλακούντα λόγω των υψηλών επιπέδων της έκφρασης [Miura et al 2010].

Εκτός από την αφθονία στην έκφραση του συμπλέγματος C19MC, πολυάριθμες μελέτες έχουν επίσης δείξει τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των miRNAs στον ανθρώπινο πλακούντα. Αν και οι βιολογικές λειτουργίες των μορίων miRNAs έχουν καθοριστεί σχετικά με την λειτουργία του πλακούντα χρησιμοποιώντας καθιερωμένες μελέτες σε κύτταρα τροφοβλάστης ή in vitro ανάλυση των διαφόρων γονιδίων στόχων αποτελεί σημαντικό βοηθητικό στοιχείο.

6.4 Διαφορική έκφραση των μικρών μορίων miRNAs στον ανθρώπινο πλακούντα

Συγκριτικές αναλύσεις miRNAs πλακούντων υγιών εγκύων και ασθενών με PE και πρόωρο τοκετό έχουν εντοπίσει πάνω από μια δεκάδα μικρών μορίων miRNAs που υπόκεινται σε έκτοπη ρύθμιση στον ανθρώπινο πλακούντα.

Με τη χρήση μεθόδων ανάλυσης πραγματικού χρόνου με ποσοτική RT-PCR, οι Pineles et al. έχουν προσδιορίσει για πρώτη φορά την έκφραση 157 ώριμων ανθρώπινων miRNAs σε δείγματα πλακούντα ασθενών με PE. Από τις μελέτες βρέθηκαν 153 μικρά μόρια miRNAs που εκφράζονται στον πλακούντα και 7 μικρά μόρια miRNAs (miR-210, το miR-155, το miR-181β, miR-182 *, M1K 100β, miR-154 *, και του miR-183) που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση σε γυναίκες με PE.

Οι Zhu et al. στη συνέχεια συνέκριναν τα μόρια miRNA σε ανθρώπινους πλακούντες γυναικών με φυσιολογικούς τοκετούς και γυναικών ήπια και σοβαρή PE χρησιμοποιώντας τις μικροσυστοιχίες miRNA που περιέχουν 455 ανθρώπινα miRNAs, 344 miRNAs ποντικών και 236 miRNAs αρουραίου. Οι ερευνητές λοιπόν εντόπισαν 34 μικρά μόρια miRNAs που σχετίζονται με την PE, 11 μόρια miRNAs, με προς τα άνω ρύθμιση και 23 προς τα κάτω ρύθμιση της έκφρασης σε πλακούντες γυναικών με PE συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες.

Στη συνέχεια, αρκετές μελέτες έχουν αναλύσει το miRNAome σε ανθρώπινο πλακούντα χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες με περισσότερους miRNA ανιχνευτές. Οι

Enquobahrie et al. χρησιμοποίησαν μικροσυστοιχίες που περιέχουν 1295 ανιχνευτές για τις μορφές των ανθρώπινων ώριμων miRNAs και 379 για νέα μικρά RNA. Στις μελέτες αυτές βρέθηκαν οκτώ νέα miRNAs και προσδιόρισαν μόρια miRNAs τα 139-5p, miR-500, το miR-1247, miR-34c-5P, και miR-1 σε γυναίκες με PE σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες.

Σε μια άλλη μελέτη, οι Mayor-Lynn et al. χρησιμοποίησαν ένα αναπτυγμένο σύστημα μικροσυστοιχιών που περιέχει 1213 ανιχνευτές για 820 ώριμα miRNAs και ανέλυσαν 21 δείγματα ιστού του πλακούντα από γυναίκες με PE, μεταξύ των οποίων υπήρχαν γυναίκες με πρόωρο τοκετό και υγιείς μάρτυρες που είχαν υποστεί καισαρική τομή. Βρήκαν επίσης 20 μόρια miRNAs μεταξύ των οποίων και τρεις ομάδες μορίων miRNAs με χρήση τεχνικών ανάλυσης σε πραγματικό χρόνο. Η προς τα κάτω έκφραση των miR-15b, miR-181, το miR-210 και miR-483-5p ανιχνεύθηκε στην ομάδα πρόωρων τοκετών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, σε σύγκριση μεταξύ ασθενών με PE με φυσιολογικούς ασθενείς, δεν παρατηρήθηκε διαφορά για αυτά miRNAs, εκτός από τα miR-15b, που έχουν χαμηλότερη έκφραση σε γυναίκες με PE.

Παραδόξως, κάθε δημοσιευμένη εργασία που έχει αναφερθεί σε ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των μορίων miRNAs, έχει ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ άλλων μελετών. Ο λόγος για την διαφορά δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανόν προέρχεται από τις διαφορετικές συστοιχίες και τα δείγματα RNA που έχουν χρησιμοποιηθεί. Τα πιο συχνά προσδιοριζόμενα πλακούντα μόρια miRNA όπως το miR-210, βρέθηκε να ρυθμίζεται προς τα άνω σε πλακούντες γυναικών με PE σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες στις περισσότερες μελέτες, εκτός από μία μελέτη που ανέφερε ότι το miR-210 είναι μειωμένο σε γυναίκες με πρόωρο τοκετό σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογικό τοκετό, αλλά χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ των γυναικών με PE [Mayor-Lynn et al 2009].

Σε μια μελέτη πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες miRNA που περιέχουν 894 μοναδικούς ανιχνευτές για να καλύψουν όλα τα πιθανά μόρια miRNAs που είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων της miRBase (έκδοση 14.0) και επιβεβαιώθηκαν τα miRNAs με την ανάλυση πραγματικού χρόνου PCR. Σε αυτές τις

μελέτες δεν βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα του miR-210 σε γυναίκες με PE έναντι των γυναικών με φυσιολογικούς πλακούντες. Επίσης βρέθηκαν εννέα μικρά μόρια miRNAs μεταξύ των ασθενών με PE και των ασθενών ,ε με φυσιολογική αρτηριακή πίεση, μεταξύ των οποίων πέντε είχαν αυξορύθμιση (miR-20b, miR-516a-5P, miR-512-3p, miR-2277, και του miR-524-3p) και τέσσερις μειορύθμιση μικρών μορίων (miR-151-3p, miR-146a, miR-192 και του miR-34c-5P). Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου με ειδικούς εκκινητές για να επιβεβαιώσει την παρουσία των miRNAs σε δείγματα πλακούντα, εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα του μορίου miR-17 της οικογένειας miRNAs (δηλαδή, miR-17, miR-20a, και του miR-20b) που σημαντικά υπερεκφράζεται σε ασθενείς με PE σε σύγκριση με υγιείς ασθενείς [Wang et al 2012].

Η υποξία διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην κανονική αλλά και στην μη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα ενώ φαίνεται ότι ρυθμίζει και την έκφραση miRNA στην τροφοβλάστη. Οι Mouillet et al. διαπίστωσαν επτά μικρά μόρια miRNAs (miR-93, miR-205, M1K 224, miR-335, το miR-424, το miR-451 και του miR-491) σε ιστούς τροφοβλάστης που εκτίθενται σε υποξία με τεχνικές χρήσης μικροσυστοιχιών miRNA. Έχει επίσης ανακαλυφθεί ότι το μόριο miR-210 σε καταστάσεις υποξίας μπορεί να υπερεκφραστεί τόσο σε ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και σε κύτταρα όγκου. Πιο πρόσφατα, έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκφραση του miRNA-210 επίσης αυξάνεται σε καλλιιεργούμενους τροφοβλάστες υπό υποξικές συνθήκες [Lee et al 2011].

Υπάρχει επίσης μια πρόσφατη δημοσίευση που συνέκρινε το πρότυπο έκφρασης miRNA μεταξύ του πρώτου και του τρίτου τριμήνου της κύησης σε ανθρώπινο πλακούντα. Μεταξύ των 191 μικρών μορίων miRNAs που προσδιορίστηκαν, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, όπως τα miR-17-92, C14MC, το miR-371 και C19MC ήταν σημαντικά υψηλότερα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, ενώ τα miRNAs της οικογένειας let-7, της οικογένειας miR-34, το σύμπλεγμα miR-29, το miR-195 και το miR-181γ ήταν σημαντικά αυξημένα στον πλακούντα το τρίτο τρίμηνο [Lee et al 2011]. Η διαφορική έκφραση υποδηλώνει τις αναπτυξιακές αλλαγές της έκφρασης των miRNA στον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης τόσο του miR-517b όσο και η αλλαγή στην έκφραση των μορίων miR-519a είναι σε συνδυασμό με το βάρος του πλακούντα και τις μεταβολές των χοριακών λαχνών αλλαγές που εμφανίζονται κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης. Τόσο το miR-517b όσο και το miR-519a εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στην τροφοβλάστη και η έκφραση τους συσχετίζεται με το βάρος των λαχνών στην ίδια εβδομάδα κύησης κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου. Στην περίοδο αυτή το όρια του miR-517b ρυθμίζονται αυξητικά σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης στις χοριακές λάχνες, ενώ η έκφραση του miR-519a ρυθμίζεται αυξητικά επίσης σε δείγματα ανάλυσης χοριακών λαχνών. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν το ρόλο των μικρών μορίων miRNAs στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού της τροφοβλάστης και επομένως, τον ρόλο των miRNAs στην ανάπτυξη του πλακούντα [Lee et al 2011].

6.5 Η miRNA-κατευθυνόμενη γονιδιακή έκφραση στον πλακούντα

Είναι σαφές ότι τα μικρά μόρια miRNAs διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης του πλακούντα και στην λειτουργία του, καθώς απενεργοποίηση μικρών μορίων miRNA μέσω μετάλλαξης σε ιστούς ποντικών Ago2 προκαλεί δυσμορφία του πλακούντα με ένα πολύ μειωμένο πάχος και το θάνατο των μεταλλαγμένων εμβρύων. Επιπλέον, η μείωση των μορίων miRNA στην CTBs μέσω μικρών μορίων παρεμβολής RNA (siRNA) με την μεσολάβηση του Dicer ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε καλλιεργημένα κύτταρα στο πρώτο τρίμηνο δημιουργίας του πλακούντα, ενοχοποιώντας ένα αρνητικό ρυθμιστικό αποτέλεσμα των miRNAs σε κύτταρα τροφοβλάστης. Η απώλεια της λειτουργίας με τη χρήση καθιερωμένων κυττάρων τροφοβλάστης σε πρωτογενή μοντέλα καλλιέργειας έχει επίσης προτείνει ένα κρίσιμο ρόλο για τα μικρά μόρια miRNAs του πλακούντα στην ανάπτυξη και την αγγειογένεση, καθώς και στην λειτουργικότητα του πλακούντα. Ωστόσο, η τρέχουσα κατανόηση των ρόλων που έχουν τα ειδικά μόρια miRNAs στην ρύθμιση, την ανάπτυξη και την λειτουργία του πλακούντα βρίσκεται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο. Οι περισσότερες, αν όχι όλες οι μελέτες, έχουν επικεντρωθεί στο

πρότυπο έκφρασης των μικρών μορίων miRNA στον πλακούντα σε φυσιολογικές γυναίκες καθώς και σε γυναίκες κατά την εγκυμοσύνη. Αν και η ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη των σημείων στόχων βοηθά στην εκτίμηση της δυσλειτουργίας του πλακούντα, οι λειτουργικές μελέτες σε ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές χοριοκαρκινώματος έχουν προτείνει πολλούς ρυθμιστικούς ρόλους στην λειτουργία των miRNAs σε κύτταρα τροφοβλάστης. Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με χοριοκαρκίνωμα, η υπερέκφραση του miR-152 καταστέλλει την έκφραση του HLA-G και προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων φονιάδων μέσω της διαδικασίας της κυτταρόλυσης, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε ένα άλλο δείγμα από ανθρώπινο πλακούντα και κύτταρα χοριοκαρκινώματος, τα κύτταρα JAR χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του miR-34a που αναστέλλει την κυτταρική εισβολή μέσω της στόχευσης των παραγόντων Notch1 και Jagged1 και ενδεχομένως την ενεργοποίηση του αναστολέα του πλασμινογόνου-1 [Zhu et al 2010].

Η έκφραση του miRNA-199b έχει βρεθεί να μειώνεται σε ιστούς χοριοκαρκινώματος σε σύγκριση με τους μη καρκινικούς ιστούς της τροφοβλάστης. Το μόριο miR-199b φαίνεται να προάγει τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση των κυττάρων τροφοβλάστης μέσω της αναστολής της πρωτεΐνης αναστολέα της φωσφατάσης 2A. Έχει αναφερθεί επίσης πρόσφατα ότι η έκφραση του miR αναστέλλει την κυτταρική σύντηξη (syncytialization) και επάγει την έκφραση ενός συνόλου ενδοθηλιακών κυττάρων και δεικτών σε κύτταρα BeWo (Wang και Chen), εμπλέκοντας και ενισχύοντας τον δυνητικό ρόλο του miR-17 και της οικογένειας των miRNAs στην διαφοροποίηση των CTB, προωθώντας την αναστολή των λαχνών μέσω των μονοπατιών EVTs και STBs, αντίστοιχα [Dai et al 2012].

Λίγες μελέτες έχουν επίσης χρησιμοποιήσει κύτταρα PHT και έχουν χαρακτηρίσει την βιολογική τους λειτουργία σε ασθενείς με PE. Η υποξία επάγει την έκφραση πολλών miRNAs, συμπεριλαμβανομένων miR-210 και miR-205, σε καλλιεργημένα κύτταρα τροφοβλάστης [Dai et al 2012]. Η απώλεια στην λειτουργία με

επιμόλυνση με πρόδρομες ουσίες ή με ανταγωνιστές σε πρωτογενή κύτταρα τροφοβλάστης έχουν δείξει ότι το miR-210 αναστέλλει την κατανάλωση οξυγόνου, γεγονός που θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για την πλακουντιακή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με PE [Landles et al 2003]. Η αναγκαστική έκφραση του μορίου miR-205 αναστέλλει την έκφραση του μεσολαβητή 1 (MED1) που είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη του πλακούντα. In vitro μελέτες, με την χρήση siRNA silencing MED1 στην πρωτοβάθμια μορφή της CTBs δείχνουν ότι διαταράσσεται η έκφραση σε αρκετούς δείκτες διαφοροποίησης της τροφοβλάστης, ενοχοποιώντας ένα ρόλο στο μόριο miR-205 στην προσαρμογή του πλακούντα στην υποξία [Landles et al 2003].

Η υπερέκφραση του miR-155 σε γυναίκες με PE αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, αλλά αυξάνει την συγκυτιοποίηση σε ανθρώπινους ιστούς πρώτου τριμήνου που προέρχονται από HTR-8 / SV-neo κύτταρα [Dai et al 2012]. Η υπερέκφραση σε ασθενείς με PE προκαλεί μειορύθμιση στο μόριο miR-195 σε HTR-8 / SV-neo κύτταρα και προάγει την κυτταρική εισβολή μέσω της στόχευσης του Acvr2a (ActRIIA), του υποδοχέα τύπου II για την activinA. Είναι ενδιαφέρον, ότι η σταθερή υπερέκφραση του miR-378A-5P σε κύτταρα HTR-8 / ΚύτταραSVneo ενισχύει την κυτταρική επιβίωση, την μετανάστευση και την κυτταρική εισβολή μέσω του αυξητικού παράγοντα β (TGFb) [Dai et al 2012].

Επιπλέον, το μόριο miR-376c ρυθμίζει έμμεσα τις κυτταρικές διαδικασίες μέσω της TGFb σηματοδότησης. Η υπερέκφραση του παράγοντα σε ασθενείς με PE-μειορρυθμίζεται με την δράση του miR-376c και προκαλεί αυξημένο πολλαπλασιασμό στα κύτταρα, αυξημένη κυτταρική μετανάστευση και κυτταρική εισβολή, ενώ προωθεί και την διαφοροποίηση του πλακούντα μέσω της στόχευσης του υποδοχέα ακτιβίνης μέσω της δράσης της κινάση 5, έναν υποδοχέα τύπου I για τα συμπλέγματα TGFb και ALK7. Το miR-378A-5P / TGFb μονοπάτι φαίνεται να είναι σημαντικό για την ανάπτυξη του πλακούντα καθώς νοκ-άουτ ποντίκια για τα συγκεκριμένα γονίδια παρεκκλίνουν από την φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα και μειώνουν τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συνδυασμό με την αυξημένη απόπτωση, που οδηγεί σε πρόωρο τοκετό [Park et al 2012]. Το πιο κοινό μόριο miRNA του πλακούντα που σχετίζονται με την εμφάνιση προεκλαμψίας είναι το miR-210 και έχει αποδειχθεί ως ένα από τα πιο κοινά μόρια που ρυθμίζονται αυξητικά σε καταστάσεις υποξίας [Park et al 2012]. Αυτό το miRNA είναι εξελικτικά συντηρημένο και εκφράζεται παντού σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ενώ επάγεται ειδικά σε καταστάσεις υποξίας από τον παράγοντα (HIF1A), μέσω της απευθείας δέσμευσης στον υποκινητή του miR-210 [Huang et al 2010]. Η υποξία με γνώμονα την έκφραση του miR-210 προάγει την αγγειογένεση μέσω της μειορρύθμισης του ephrin-A3, καταστέλλοντας την αγγειακή παραγωγή του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFA), που προάγει την ενδοθηλιακή κυτταρική μετανάστευση και την κυστιδιογένεση. Επιπλέον, το miR-210 μπορεί να προκαλεί την στοχευόμενη επαγωγή της πρωτεϊνικής-τυροσινικής φωσφατάσης 1B, αναστέλλοντας τον παράγοντα VEGFA στα ενδοθηλιακά κύτταρα [Fasarano et al 2007].

Μια πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε αρουραίους με ισχαιμική φλοιική εγκεφαλοπάθεια και υποξικά μοντέλα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων απέδειξαν ότι το miR-210 ενεργοποιεί την Notch σηματοδότηση και επάγει την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και τον σχηματισμό του νευρικού σωλήνα. Επειδή η σηματοδότηση Notch παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της τροφοβλάστης και ειδικά στην ενδαγγειακή προώθηση του κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του πλακούντα, τα στοιχεία αυτά δείχνουν τον σημαντικό ρόλο του miR-210 στην ανάπτυξη του πλακούντα [Hunkapiller et al 2011].

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο των miRNAs στην αγγειογένεση. Η πρώτη απόδειξη ήρθε από μια μελέτη εμβρύων ποντικού με ομόζυγη απαλοιφή του εξονίου 1 και 2 του γονιδίου Dicer με αποτέλεσμα το θάνατο του εμβρύου μεταξύ της 12,5 και 14,5 ημέρας της κύησης λόγω του κινδύνου μειωμένου σχηματισμού των αιμοφόρων αγγείων, ο οποίος δείχνει έναν ουσιώδη ρόλο στον

σχηματισμό του παράγοντα Dicer στην εμβρυϊκή αγγειογένεση σε δείγματα ποντικού [Yang et al 2005].

Σε *in vitro* μελέτες που περιέχουν καλλιεργούμενα ενδοθηλιακά κύτταρα παρέχονται περισσότερα στοιχεία σχετικά με το ρόλο του Dicer στην βιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της τριχοειδικής ανάπτυξης και του σχηματισμού του νευρικού σωλήνα. Όλα αυτά δείχνουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που απαιτούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πλακούντα. Πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι το μόριο miR-155 μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την ανάπτυξη του πλακούντα και την αγγειογένεση διότι στοχεύει στην εμφάνιση της PE μειορρυθμίζοντας τον αγγειογόνο παράγοντα που είναι πλούσιος σε κυστεΐνη, μέσω του αγγειογενετικού επαγωγέα 61, που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την κυτταρική προσκόλληση [Chen et al 2007].

Αν η παραγωγή των miRNA καθώς και το πώς ρυθμίζεται η αγγειογένεση είναι εν πολλοίς άγνωστη, αυτή είναι μια σημαντική περιοχή που δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση επειδή η αγγειογένεση είναι κρίσιμη για το σχηματισμό και την επέκταση της μητρικής, εμβρυϊκής και πλακουντιακής αγγειακής ομοιόστασης [Reynolds et al 2005].

6.6 Η οικογένεια μικρών μορίων miR-17 και η έκφραση τους στον πλακούντα σε γυναίκες με προεκλαμψία

Με τη χρήση των μικροσυστοιχιών και την πραγματικού χρόνου ποσοτική PCR ανάλυση, έχουν εντοπιστεί σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα miR-17, miR-20a και του miR-20b σε ασθενείς με PE έναντι των φυσιολογικών δειγμάτων από ανθρώπινους πλακούντες. Αυτά περιλαμβάνουν τα μικρά μόρια miR-17 που ανήκουν στην οικογένεια miR-17-92 που είναι σύμπλεγμα σημαντικό για την αγγειογένεση [Hunkapiller et al 2011]. Το σύμπλεγμα έχει έξι miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, και miR-92a-1, που υποβάλλονται σε επεξεργασία από έναν κοινό πρόδρομο. Με βάση τις αναλύσεις αλληλουχιών στις έως τώρα μελέτες

ομαδοποιούνται τέσσερις οικογένειες: η οικογένεια miR-17 (του miR-17 και του miR-20a), η οικογένεια miR-18, η οικογένεια miR-19 και η οικογένεια του miR-92. Το σύμπλεγμα έχει δύο παραλλαγές στα θηλαστικά, τις miR-106a-363 και Mik 106b-25, οι οποίες προέρχονται από παλαιότερους διπλασιασμούς γονιδίων.

Αυτές περιέχουν ομόλογα miRNAs σε εκείνες τις θέσεις που κωδικοποιούνται τα miR-17-92. Το μικρό μόριο miRNA miR-20b βρίσκεται στο miR-106a-363 σύμπλεγμα και ανήκει στην οικογένεια miR-17. Η ανάλυση αλληλουχίας αποκάλυψε ότι τα miR-17, miR-20a και το miR-20b, οδηγούν σε μια υπόθεση ότι υπάρχουν ενδεχομένως επικαλυπτόμενες λειτουργίες που στοχεύουν σε παρόμοια σύνολα γονιδίων. [Chen et al 2007].

Η Βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων για την πρόβλεψη στόχου προτείνει πολλά γονίδια στόχους μικρών μορίων miR-17, miR-20a και miR-20b, συμπεριλαμβανομένων των HIF1A, της ιντερλευκίνης 8, του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών 2, του VEGFA και του B4 υποδοχέα Eph (EphB4). Μεταξύ των πιθανών στόχων της οικογένειας των μικρών μορίων miR-17 είναι τα γονίδια EFNB2 και EphB4 που φαίνεται να παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στην διαμόρφωση των αρτηριδίων της μήτρας μέσω της έκφρασης του EFNB2, ενώ η έκφραση του EphB4 προάγει την διαφοροποίηση των φλεβών στην μήτρα της μητέρας κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης του ανθρώπινου πλακούντα. Επομένως η έκφραση των γονιδίων EphB4 και EFNB2 είναι οι μοριακοί δείκτες της εξέλιξης των φλεβών και των αρτηριών και ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των Eph υποδοχέων κινασών τυροσίνης, δηλαδή μορίων που δρουν μέσω επαφής των κυττάρων (μέχρι 20 nm) για να ελέγχουν την αρτηριακή ανάπτυξη καθώς και την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά επίσης την κινητικότητα και την προσκόλληση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και των περικυττάρων για την ανάπτυξη της αρτηριακής δομής [Foo et al 2006].

Ο EFNB2 δεσμεύει τον EphB4 υποδοχέα ειδικά με πολύ υψηλή συγγένεια. Η έκφραση του EphB4 εμφανίζεται στις φλέβες όλων των διαμέτρων και έχει ενοχοποιηθεί στην αγγειογένεση όγκου, ενώ θεωρείται ένας στόχος θεραπείας. Επειδή και οι δύο

παράγοντες ο EFNS και ο EPHs είναι κινάσες τυροσίνης, η δράση τους επάγει την αμφίδρομη σηματοδότηση που είναι απαραίτητη και ειδικά για την οριοθέτηση των αρτηριο-φλεβικών ορίων. Ο EFNB2 προκαλεί σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα EphB4 που αναστέλλει κυτταρική προσκόλληση, ενώ ο EphB4 έχει αντίστροφη σηματοδότησης μέσω του EFNB2 επάγοντας την κυτταρική προσκόλληση και διαφοροποίηση. Η Αλληλεπίδραση των υποδοχέων Eph και η δεσμευμένη στην επιφάνεια των κυττάρων ephrin προκαλεί μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα και του συνδέτη κυττάρων που εκφράζουν, μεσολαβώντας σε διαφόρους τύπους κυτταρικών αποκρίσεων όπως η κυτταρική προσκόλληση και η μετανάστευση [Foo et al 2006]

Αυτά είναι επίσης πιθανόν να διαθέτουν ένα ρόλο στην αγγειογένεση, επειδή η προαγγειογονική λειτουργία του EFNB2 καθορίζει την ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα μέσω των δραστηριοτήτων των ενδοθηλιακών παραγόντων VEGFA, VEGFR2 και VEGFR3. Κατά τη διάρκεια της κύησης στον άνθρωπο, οι εκφράσεις στην τροφοβλάστη τόσο του EFNB2 όσο και του EphB4 μπορεί να μειωθούν σημαντικά σε οποιοδήποτε στάδιο της κύησης, ενώ οι δομές αυτές φαίνεται να συμμετέχουν στην οικοδόμηση της λειτουργικής αρτιότητας του πλακούντα.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πλακούντα του ανθρώπου η εναλλαγή ανάμεσα στην φλεβική EPHB4b και στην αρτηριακή EFNB2b ανάπτυξη διαφοροποιείται μέσω του EVTs. Αυτή η αρτηριακή μετατροπή της ενδαγγειακής λειτουργίας φαίνεται να προκαλεί αντικατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τον σχηματισμό των σπειροειδών αρτηριών αλλά όχι των φλεβών.

Από την άποψη αυτή, η εργασία από τον Susan Fisher έχει δείξει ότι τα μοντέλα αλληλεπίδρασης του συμπλόκου CTB δημιουργούν ένα σήμα σηματοδότησης για να κατευθύνει την εισβολή προς το τοίχωμα της μήτρας με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν εντός της μήτρας μόνο οι σπειροειδείς αρτηρίες (EFNB2b), αλλά όχι οι φλέβες (EPHB4b) κατά την διαδικασία σχηματισμού του ανθρώπινου πλακούντα [Red-Horse et al 2006]. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε πειράματα ποντικών, οι τροφοβλάστες

εκφράζουν υψηλά επίπεδα EFNB2 και EphB4 σε πρώιμα στάδια της κύησης, δηλώνοντας τους κρίσιμους ρόλους που έχουν τα μόρια στην ανάπτυξη του πλακούντα.

Εν τω μεταξύ, ο φαινότυπος των σπειροειδών αρτηριών μπορεί να διακοπεί σε ασθενείς με ανεπάρκεια των EFNB2p/EPHB4, πιθανόν λόγω της αυξημένης ροής αίματος, επειδή η διάτμηση έχει βρεθεί ότι αυξάνει την αρτηριακή έκφραση σε όγκους EphB4. Αυτή η διακοπή μπορεί να μειώσει την αναδιαμόρφωση του τροφοβλάστη και την κατανομή των σπειροειδών αρτηριών και μπορεί να σηματοδοτήσει την ολοκλήρωση της λειτουργίας του [Red-Horse et al 2006].

Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι να προσδιορίσουμε τόσο τον EFNB2 όσο και τον EphB4 ως άμεσους στόχους του miR-17 από δοκιμασίες έκφρασης του γονιδίου μέσω της δράσης της λουσιφεράσης η ρύθμιση της δράσης του EFNB2/EphB4 δεν είχε ποτέ αναφερθεί. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν αξιοσημείωτα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA σε άτομα που εκφράζουν τον παράγοντα και εμφανίζουν σοβαρή PE έναντι των φυσιολογικών πλακούντων [Red-Horse et al 2006].

Η άμεση λοιπόν αυτή αντίστροφη σχέση μεταξύ της ανάπτυξης του πλακούντα και της έκφρασης των μικρών μορίων miR-17 της οικογένειας miRNAs σε γυναίκες που εκφράζουν τους παράγοντες EFNB2 / EphB4 και έχουν σοβαρή μορφή PE έναντι των γυναικών με φυσιολογικούς πλακούντες, δείχνει την ιδιαίτερη σημασία των μορίων miR-17-οικογένειας miRNAs στην διαφοροποίηση του τροφοβλάστη, στην ενδαγγειακή ανάπτυξη, καθώς και στον μετασχηματισμό και στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πλακούντα.

6.7 Ο ρόλος των μικρών μορίων miR-17 και των παραγόντων EFNB2-EphB4 στην εξέλιξη της παθογένεσης της προεκλαμψίας

Έχει φανεί πρόσφατα ότι η οικογένεια μορίων miR-17-miRNAs ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση των παραγόντων EFNB2-EphB4 σε ανθρώπινους πλακούντες λόγω των ακόλουθων παρατηρήσεων. Πρώτον, με τη χρήση μικροσυστοιχιών και

πραγματικού χρόνου RT-PCR βρέθηκε ότι υπάρχουν μικρά μόρια miRNA-17 της οικογένειας miRNAs που υπερεκφράζονται σε ανθρώπινο πλακούντα σε ασθενείς με PE σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυήσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από αντιστρόφως ανάλογη έκφραση σε άτομα με έκφραση EFNB2.

Δεύτερον, η ανάλυση της βιοπληροφορικής προβλέπει την άμεση δέσμευση του miR-17-της οικογένειας των miRNAs στην περιοχή του 30-UTR της EFNB2 και του EphB4. Τρίτον, η υπερέκφραση του παράγοντα miR-17 της οικογένειας miRNAs ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση του EFNB2 ενώ η επιμόλυνση με τον παράγοντα miR-17 ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση του EphB4 στα κύτταρα BeWo [Wang et al 2012].

Αντίθετα, οι εργασίες από την ομάδα του Fisher et al έδειξαν ότι οι παράγοντες EphB4 και EFNB2 παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης του τροφοβλάστη και τη μετανάστευση κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης του πλακούντα λόγω των ακόλουθων διαπιστώσεων.

Οι EphB4 και EFNB2 ρυθμίζονται προς τα κάτω σε διαφορετικά δείγματα από τροφοβλάστες. Όταν το σύμπλεγμα CTB διαφοροποιηθεί σε διηθητικές μορφές CTBs, η έκφραση του EphB4 μειορρυθμίζεται, με μια ταυτόχρονη ρύθμιση προς τα άνω του EFNB2 και άλλων μελών της οικογένειας EDP/EPH όπως οι παράγοντες EFNB1 και EPHB2. Οι ενδοαγγειακοί υποπληθυσμοί CTBs, εκφράζουν επίσης υψηλά επίπεδα του EFNB2 και του EPHB2, όταν τα κύτταρα CTB καλλιεργούνται σε υποστρώματα λαμινίνης που εντοπίζονται στις πρωτεΐνες EFNB2 ή EphB4. Το σύμπλεγμα CTBs που εκφράζει EFNB2 προκαλεί γρήγορη μετανάστευση σε NIH 3T3 κύτταρα [Wang et al 2012]. Επιπλέον, η έκφραση EFNB2/EphB4 στο ενδομήτριο προκαλεί αλλαγές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε ποντίκια.

Η διαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών ενεργοποιείται μέσω της αύξησης της έκφρασης του EFNB2β. Η αυξημένη έκφραση του EphB4 στον σχηματισμό των αρτηριών μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα σημαντικό σήμα για την ολοκλήρωση της ανακατασκευής των σπειροειδών αρτηριών. Οι παραπάνω διαπιστώσεις μας οδηγούν στο

να προτείνουμε ένα νέο μόριο miR-17 / EFNB2-EphB4 που διαμορφώνει την ρύθμιση της πρόωρης εξέλιξης του πλακούντα, η οποία μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεση της PE. Κατά τη διάρκεια της κανονικής ανάπτυξης του πλακούντα τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των miR-17 επιτρέπουν την υψηλότερη έκφραση της EphB4 και της EFNB2 στον πλακούντα. Αυτό διευκολύνει τη διαφοροποίηση του CTB και την προώθηση στο μητρικό φθαρτό, καθώς και στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας. Συνεπώς, η λειτουργία των αρτηριών της μήτρας μπορεί να μετατραπεί σε ροή χαμηλής αντίστασης για να διευκολυνθεί η αυξημένη ροή αίματος μέσω των πολύ μειωμένων πιέσεων, προωθώντας έτσι την αμφίδρομη ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αναπνευστικών αερίων (οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα) καθώς και την απομάκρυνση των μεταβολικών παραπροϊόντων.

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ανώμαλης πλακουντοποίησης σε ασθενείς με PE, η αυξημένη έκφραση του miRNAs17 καταστέλλει την έκφραση της EFNB2 και EphB4 οδηγώντας στην αναστολή της ενδαγγειακής αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Η αποτυχία στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών θα περιορίσει τη ροή του αίματος στο έμβρυο γεγονός που συμβάλλει στην παθογένεση της PE.

Συμπεράσματα

Ο ανθρώπινος πλακούντας παράγει και εκκρίνει πολλά μόρια miRNAs που εντοπίζονται στην μητρική κυκλοφορία. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα μικρά μόρια miRNAs είναι κρίσιμα στην ανάπτυξη του ανθρώπινου πλακούντα και στην φυσιολογική λειτουργία του ανθρωπίνου σώματος κατά την περίοδο της κύησης. Η έκφραση miRNA στον πλακούντα ποικίλλει ανάλογα με τα στάδια της κύησης και ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η τάση του οξυγόνου. Επίσης, η λειτουργική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα μικρά μόρια miRNAs ρυθμίζουν διάφορες εκδηλώσεις που σχετίζονται με τον πλακούντα, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του, περιλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της τροφοβλάστης, την κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση, όπως επίσης τον κυτταρικό μεταβολισμό και την παραγωγή στεροειδών ορμονών.

Οι διαταραχές κατά την κύηση ιδιαίτερα σε καταστάσεις PE, συνδέονται με την ανώμαλη έκφραση των μικρών μορίων miRNAs. Παρά αυτές τις συναρπαστικές προόδους στην έρευνα των miRNA σε ανθρώπινους πλακούντες καθώς και τον ορό σε ασθενείς με προεκλαμψία, η κατανόηση σχετικά με το πώς τα μικρά μόρια miRNAs συμβάλλουν στην φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα και τη παθολογική λειτουργία είναι περιορισμένη.

Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να διερευνήσουν διεξοδικά τη ρύθμιση της έκφρασης των μικρών μορίων miRNAs στον πλακούντα. Πολλοί παράγοντες μεταγραφής είναι γνωστό ότι ελέγχουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων και της ανάπτυξης της τροφοβλάστης. Η ρύθμιση της έκφρασης των miRNA στον πλακούντα; επηρεάζει τα στάδια σηματοδότησης των ενδοκυτταρικών μονοπατιών όντας κρίσιμη σημασίας για τη ρύθμιση της φυσιολογίας του πλακούντα στην ρύθμιση της έκφραση του miRNA. Τα microRNAs δυνητικά στοχεύουν πολλά γονίδια ενώ ένα γονίδιο είναι συχνά στόχο πολλών miRNAs. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ένα δίκτυο γονιδίων που απευθύνονται σε ένα σύμπλεγμα miRNA και πώς αυτά τα γονίδια διαμεσολαβούν την επίδραση του miRNA στον πλακούντα.

Το γεγονός αυτό επίσης είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ειδικά για το πώς διαφορετικές μορφές μικρών μορίων miRNAs αλληλεπιδρούν για να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου στόχου. Οι μελέτες λοιπόν που ήδη έχουν διενεργηθεί θα βελτιώσουν την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ρύθμιση των miRNA στην δραστηριότητα της τροφοβλάστης. Οι τρέχουσες λειτουργικές μελέτες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη χρήση της τροφοβλάστης σε κυτταρικές σειρές και σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων. Για να κατανοήσουμε πλήρως τις λειτουργίες των miRNAs, απαιτούνται in vivo μοντέλα. Η χρήση των βιοψιών ιστού και η ανάλυση δειγμάτων ορού παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργίες του miRNA και της συμμετοχής τους στην παθογένεια της εγκυμοσύνης.

Η ανίχνευση των miRNAs στη μητρική κυκλοφορία αυξάνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους ως μοριακούς βιοδείκτες miRNAs που συμβάλλουν στην

παρακολούθηση της εξέλιξης της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και της κύησης. Η ανώμαλη έκφραση των miRNAs σε γυναίκες με προεκλαμψία κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ενισχύει επίσης τη δυνατότητα χρήσης των miRNAs ως θεραπευτικών στόχων. Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να συνεχίσουν να εντοπίζουν νέα υποψήφια γονίδια miRNAs τα οποία μπορεί να έχουν ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αιτιολογική αξιολόγηση των διαταραχών της κύησης.

Συγκεκριμένα, είναι σημαντικό να συλλεγούν δείγματα αίματος από ένα μεγάλο αριθμό των εγκύων γυναικών που έχουν υγιείς ή περίπλοκες παθολογικές εγκυμοσύνες, προσδιορίζοντας τα πιθανά μόρια miRNA που μπορούν να προβλέψουν διαταραχές της κύησης. Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης των μικρών μορίων miRNAs για την πρόληψη ή τη θεραπεία διαταραχών της κύησης, οι στρατηγικές και οι μελέτες που μπορούν να προσδιορίσουν αυξήσεις ή μειώσεις στα επίπεδα των miRNA πρέπει να επιβεβαιώνονται από in vivo μελέτες με τη χρήση ζωικών μοντέλων.

Βιβλιογραφία

- Agostinis C, Bulla R, Tisato V, De Seta F, Alberico S, Secchiero P, et al. Soluble TRAIL is elevated in recurrent miscarriage and inhibits the in vitro adhesion and migration of HTR8 trophoblastic cells. *Hum Reprod* 2012;27:2941e7.
- Aguado-Fraile, E. et al. miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One* 7, e44305 (2012).
- Albinsson, S. et al. Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PLoS One* 6, e18869 (2011).
- Altm€ae S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus- Evers A, Horcujadas JA, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci* 2013;20:308–17.

- Avissar-Whiting, M., Veiga, K.R., Uhl, K.M., Maccani, M.A., Gagne, L.A., Moen, E.L., et al., 2010. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod. Toxicol.* 29 (4),401–406.
- Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297 (2004).
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., et al., 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* 37 (7), 766–770.
- Betoni, K. Derr, M.C. Pahl, L. Rogers, C.L. Muller, R.E. Packard, et al., MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: comparison of new and published results, *Hypertens Pregnancy* 32 (2013) 321–339.
- Bortolin-Cavaille, M.L., Dance, M., Weber, M., Cavaille, J., 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 37 (10), 3464–3473.
- Brown, M. A., Lindheimer, M. D., de Swiet, M., Van Assche, A. & Moutquin, J. M. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 20, IX–XIV (2001).
- Buckingham, S., 2003. The Major World of microRNAs. In: 2nd Horizon Symposium. Understanding the RNAissance. Black Point Inn in Maine, USA.
- Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2009;15:625–31.
- Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H., Dey, S.K., 2007. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (38), 15144–15149.

- Chan, O. Knudson, F. Wu, J. Morser, W. P. Dole, Q. Wu, Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 785–790.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 22, 125–132 (2012).
- Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung T-Y, Lau T-K, Chiu RWK, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54(3):482–90.
- Cho SH, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. SGI Meeting, March 2014:T-264.
- Choi SY, Yun J, Lee OJ, Han HS, Yeo MK, Lee MA, et al. MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray. *Placenta* 2013;34:799e804.
- Cui, W. Wang, N. Dong, J. Lou, D.K. Srinivasan, W. Cheng, et al., Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy, *Nature* 484 (2012) 246–250.
- Dai Y, Qiu Z, Diao Z, Shen L, Xue P, Sun H, et al. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/ SVneo cells via down-regulating cyclin D1. *Placenta* 2012;33:824e9.
- Dev. Biol.* 326 (2), 431–443.
- Dong, C. Fang, Y. Jiang, T. Zhou, M. Liu, J. Zhou, et al., Corin mutation R539C from hypertensive patients impairs zymogen activation and generates an inactive alternative ectodomain fragment, *J Biol Chem* 288 (2013) 7867–7874.
- Donker, R.B., Mouillet, J.F., Nelson, D.M., Sadovsky, Y., 2007. The expression of argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 13 (4), 273–279.]

- Dries, R.G. Victor, J.E. Rame, R.S. Cooper, X. Wu, X. Zhu, et al., Corin gene minor allele defined by 2 missense mutations is common in blacks and associated with high blood pressure and hypertension, *Circulation* 112 (2005) 2403–2410.
- E. Zulfikaroglu, M. Islimye, E.A. Tonguc, A. Payasli, F. Isman, T. Var, et al., Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in preeclampsia, *J Obstet Gynaecol Res* 37 (2011) 1198–1202.
- Espinoza, R. Romero, J.K. Nien, R. Gomez, J.P. Kusanovic, L.F. Gonçalves, et al., Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor, *Am J Obstet Gynecol* 196 (2007) [326.e1–e13].
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem* 2010;79:351–79.
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine-kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008;283:15878–83.
- Figueras, F. et al. Customized birthweight standards for a Spanish population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 136, 20–24 (2008).
- Filigheddu N, Gregnanin I, Porporato PE, Surico D, Perego B, Galli L, et al. Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:369549
- Foda, I.A. Abdel Aal, Maternal and neonatal copeptin levels at caesarean section and vaginal delivery, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 165 (2012) 215–218.
- Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, Lindblom P, Shani M, Zicha D, Adams RH. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 2006; 124:161–173.
- Foshay, K.M., Gallicano, G.I., 2009. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation.

- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;9:92–105.
- Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, et al. MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension* 2013;61:864e72.
- Garofalo M, Croce CM. microRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*
- Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148.
- Gunel T, Zeybek YG, Akçakaya P, Kalelioglu I, Benian A, Ermis H, et al. Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet Mol Res* 2011;10:4034e40.
- Guo Y, Ying L, Tian Y, Yang P, Zhu Y, Wang Z, et al. miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *FEBS J* 2013;280:4531e8.
- Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific microRNAs in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *J Mol Diagn* 2012;14:160e7.
- Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidziec M, Plaks V, Maltepe E, Kitajewski J, Cross JC, Fisher SJ. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of preeclampsia. *Development* 2011; 138:2987–2998.
- Hurley, J., Roberts, D., Bond, A., Keys, D. & Chen, C. Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods Mol Biol* 822, 33–52 (2012).
- Iwaya T, Yokobori T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, et al. Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. *Carcinogenesis* 2012;33:2391e7..

- Khalil, N. Maiz, R. Garcia-Mandujano, M. Elkhoul, K.H. Nicolaides, Longitudinal changes in maternal corin and mid-regional proatrial natriuretic peptide in women at risk of pre-eclampsia, *Ultrasound Obstet Gynecol* 45 (2015) 190–198.
- Khan, D. Wojdyla, L. Say, A.M. Gülmezoglu, P.F. Van Look, WHO analysis of causes of maternal death: A systematic review, *Lancet* 367 (2006) 1066–1074.
- Knappe, F. Wu, M.R. Madlansacay, Q. Wu, Identification of domain structures in the propeptide of corin essential for the processing of proatrial natriuretic peptide, *J Biol Chem* 279 (2004) 34464–34471.
- Koshimizu, K. Nakamura, N. Egashira, M. Hiroyama, H. Nonoguchi, A. Tanoue, Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems, *Physiol Rev* 92 (2012) 1813–1864.
- Kusanovic, R. Romero, T. Chaiworapongsa, O. Erez, P. Mittal, E. Vaisbuch, et al., A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and antiangiogenic factors in early pregnancy and mid trimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia, *J Matern Fetal Neonatal Med* 22 (2009) 1021–1038.
- Land, G. Schütz, H. Schmale, D. Richter, Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor, *Nature* 295 (1982) 299–303.
- Landles C, Chalk S, Steel JH, Rosewell I, Spencer-Dene B, Lalani el N, Parker MG. The thyroid hormone receptor-associated protein TRAP220 is required at distinct embryonic stages in placental, cardiac, and hepatic development. *Mol Endocrinol* 2003; 17:2418–2435.
- Lee DC, Romero R, Kim JS, Tarca AL, Montenegro D, Pineles BL, Kim E, Lee J, Kim SY, Draghici S, Mittal P, Kusanovic JP, et al. miR-210 targets iron-sulfur cluster scaffold homologue in human trophoblast cell lines: siderosis of interstitial trophoblasts as a novel pathology of preterm preeclampsia and small-for-gestational-age pregnancies. *Am J Pathol* 2011; 179:590–602.

- Levine, C. Lam, C. Qian, K.F. Yu, S.E. Maynard, B.P. Sachs, et al., Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia, *N Engl J Med* 355 (2006) 992–1005.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., Chen, C., 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8, 166
- Lin SC, Wang CC, Wu MH, Yang SH, Li YH, Tsai SJ. Hypoxia-induced microRNA-20a expression increases ERK phosphorylation and angiogenic gene expression in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1515–23.
- Luo S-S, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, et al. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 2009;81(4):717–29.
- Maynard, S.A. Karumanchi, Angiogenic factors and preeclampsia, *Semin Nephrol* 31 (2011) 33–46.
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 2005; 15:2149–2155.
- Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K.I., et al., 2010. Identification of pregnancy-associated MicroRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.*
- Moore Simas, S.L. Crawford, M.J. Solitto, S.C. Frost, B.A. Meyer, S.E. Maynard, Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women, *Am J Obstet Gynecol* 197 (2007) 244.e1–e8..
- Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., Hatada, I., 2007. One Argonaute family member. Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89 (6), 687–696.
- Mouillet, J.F., Chu, T., Hubel, C.A., Nelson, D.M., Parks, W.T., Sadovsky, Y., 2010a. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta*.

- Mouillet, J.F., Chu, T., Hubel, C.A., Nelson, D.M., Parks, W.T., Sadovsky, Y., 2010a. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta*.
- Mouillet, J.F., Chu, T., Nelson, D.M., Mishima, T., Sadovsky, Y., 2010b. MiR- 205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts. *FASEB J*.
- Mouillet, J.F., Chu, T., Nelson, D.M., Mishima, T., Sadovsky, Y., 2010b. MiR- 205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts. *FASEB J*. 24 (6), 2030–2039.
- Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta* 2012;33:816e23.
- Odibo, C.C. Rada, A.G. Cahill, K.R. Goetzinger, M.G. Tuuli, L. Odibo, et al., Firsttrimester serum soluble fms-like tyrosine kinase-1, free vascular endothelial growth factor, placental growth factor and uterine artery Doppler in preeclampsia, *J Perinatol* 33 (2013) 670–674.
- One 4 (7), e6143.
- Pan Q, Chegini N. MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states. *SeminReprod Med* 2008;26: 479–93.
- Pan Q, Luo X, Chegini N. Differential expression of microRNAs in myometrium and leiomyomas and regulation by ovarian steroids. *J Cell Mol Med* 2008;12:227–40
- Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* 2007;13:797–806.
- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 2005;272:95–108.
- Park CB, DeMayo FJ, Lydon JP, Dufort D. NODAL in the uterus is necessary for proper placental development and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* 2012; 86:194.

- Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210—micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med* 2010; 16:230–237.
- Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y, Taylor HS. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1925–33.
- Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P, Hassan SS, Kim CJ. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:261.e1–6.
- Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:1608–1613.
- Poon, G. Karagiannis, A. Leal, X.C. Romero, K.H. Nicolaides, Hypertensive disorders in pregnancy: screening by uterine artery Doppler imaging and blood pressure at 11-13 weeks, *Ultrasound Obstet Gynecol* 34 (2009) 497–502.
- Qian, K., Hu, L., Chen, H., Li, H., Liu, N., Li, Y., et al., 2009. Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro.
- Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, Maltepe E, Okazaki K, Kochman R, Vo KC, Giudice L, Erlebacher A, et al. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest* 2006; 116:2643–2652.
- Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Caton JS. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol* 2005; 565:43–58
- Roberts, D.W. Cooper, Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia, *Lancet* 357 (2001) 53–56.
- Robinson, H. P. & Fleming, J. E. A critical evaluation of sonar “crown-rump length” measurements. *Br J Obstet Gynaecol* 82, 702–710 (1975).

- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer* 2010;10:389–402.
- Santillan, D.A. Santillan, S.M. Scroggins, J.Y. Min, J.A. Sandgren, N.A. Pearson, et al., Vasopressin in preeclampsia: a novel very early human pregnancy biomarker and clinically relevant mouse model, *Hypertension* 64 (2014) 852–859.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Terasawa, K. & Tsujimoto, G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* 4, e5540 (2009).
- Seligman, B.G.S. Seligman, P.J.Z. Teixeira, Comparing the accuracy of predictors of mortality in ventilator-associated pneumonia, *J Bras Pneumol* 37 (2011) 495–503.
- Shen LJ, He JL, Yang DH, Ding YB, Chen XM, Geng YQ, et al. Mmu-microRNA-200a overexpression leads to implantation defect by targeting phosphatase and tensin homolog in mouse uterus. *Reprod Sci* 2013;20:1518–28.
- Shin KH, Pucar A, Kim RH, Bae SD, Chen W, Kang MK, et al. Identification of senescence-inducing microRNAs in normal human keratinocytes. *Int J Oncol* 2011;39:1205e11.
- Srinivas, J. Larkin, M.D. Sammel, D. Appleby, J. Bastek, C.M. Andrela, et al., The use of angiogenic factors indiscriminating preeclampsia: are they ready for prime time? *J Matern Fetal Neonatal Med* 23 (2010) 1294–1300.
- St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, Bouchard L. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics* 2012; 7:1125–1132.
- Struck, N.G. Morgenthaler, A. Bergmann, Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients, *Peptides* 26 (2005) 2500–2504.
- Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, Bukulmez O, Chegini N. The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs. *Reprod Sci* 2008;15: 993–1001.

- Treschan, J. Peters, The vasopressin system: physiology and clinical strategies, *Anesthesiology* 105 (2006) 599–612.
- Tsai, K.W., Kao, H.W., Chen, H.C., Chen, S.J., Lin, W.C., 2009. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 4 (8), 587–592.
- Ura, G. Feriotto, L. Monasta, S. Bilel, M. Zweyer, C. Celeghini, Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia, *Taiwan J Obstet Gynecol* 53 (2014) 232–234.
- Urbich, C., Kuehbach, A. & Dimmeler, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79, 581–588 (2008).
- Veit, T.D., Chies, J.A., 2009. Tolerance versus immune response—microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl. Immunol.* 20 (4), 229–231.
- Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008; 132: 875–886.
- Viswanathan, S.R., Mermel, C.H., Lu, J., Lu, C.W., Golub, T.R., Daley, G.Q., 2009. microRNA expression during trophoblast specification. *PLoS*
- Vitoratos, N., Hassiakos, D. & Iavazzo, C. Molecular mechanisms of preeclampsia. *J Pregnancy* 2012, 298343 (2012).
- Wang Y, Fan H, Zhao G, Liu D, Du L, Wang Z, et al. miR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe preeclampsia. *FEBS J* 2012;279:4510e24.
- Wu W, Yang J, Feng X, Wang H, Ye S, Yang P, et al. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer* 2013;12:30.

- Wu, D. et al. MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. *Mol Med Rep* 8, 626–630 (2013).
- Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One* 2011;6:e25787.
- Xia, H.F., Jin, X.H., Song, P.P., Cui, Y., Liu, C.M., Ma, X., 2010b. Temporal and spatial regulation of miR-320 in the uterus during embryo implantation in the rat. *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2), 719–730.
- Yauk, C. L., Rowan-Carroll, A., Stead, J. D. H. & Williams, A. Cross-platform analysis of global microRNA expression technologies. *BMC Genomics* 11, 330 (2010).
- Zeng ZL, Li FJ, Gao F, Sun DS, Yao L. Upregulation of miR-650 is correlated with down-regulation of ING4 and progression of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2013;107:105e10.
- Zhang Y, Wang X, Xu B, Wang B, Wang Z, Liang Y, et al. Epigenetic silencing of miR-126 contributes to tumor invasion and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2013;30:1976e84.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., Anderson, T.A., 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* 302 (1), 1–12.
- Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Hahn, S., 2001. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 945, 138–140.
- Zhou, J. Jiang, Y. Cui, Q. Wu, Corin, atrial natriuretic peptide and hypertension, *Nephrol Dial Transplant* 24 (2009) 1071–1073.
- Zhu, X.M., Han, T., Wang, X.H., Li, Y.H., Yang, H.G., Luo, Y.N., et al., 2010. Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202 (6), e591–597.