



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ AGT ΚΑΙ AGT1R ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

ΤΑΣΤΑΝΗ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2017

[1]

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας

Μέλος : Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής

Μέλος : Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α:	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
A1.ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ : ΟΡΙΣΜΟΣ.....	9
A2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	10
A3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	11
A3.1 Ατελής Πλακουντοποίηση – Μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών	12
A3.2 Ισχαιμία του πλακούντα	14
A3.3 Οξειδωτικό στρες	14
A3.4 Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο.....	15
A3.5 Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου	16
A3.6 Αντι-αγγειογενείς παράγοντες στη προεκλαμψία	16
A3.7 Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τυπου-1 της αγγειοτενσίνης II.....	18
A3.8. Σύστημα ανοσίας και προεκλαμψία	18
A3.9 Γενετική προδιάθεση – προεκλαμψία.....	20
A4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ	20
A4.1 Αγγειογενετικοί βιοδείκτες.....	21
A4.2 Πρωτεΐνη A (PAPP-A).....	22
A4.3 Πρωτεΐνη PP13	23
A4.4 ΡΤΧ 3	24
A4.5 Κυστατίνη C.....	24
A4.6 Εμβρυική αιμοσφαιρίνη	24
A4.7 Ελεύθερο Εμβρυικό DNA	25
A4.8 Visfatin	26
A4.9 miRNAs προεκλαμψία	26
A.5 ΣΥΣΤΗΜΑ RENINΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ	28
A5.1 Αγγειοτενσινογόνο	30
A5.2 Υποδοχέας αγγειοτενσίνης (AT1R).....	32
A6. AGT – AGT1R & ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ	35
A7. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β :	38

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	38
B1. ΥΛΙΚΑ.....	39
B1.1 Χημικά Αντιδραστήρια.....	39
B1.2 Χρωστικές Ουσίες.....	39
B1.3 Όργανα – Συσκευές	39
B1.4 Αναλώσιμα	39
B2. ΜΕΘΟΔΟΙ	40
B2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα με QIAamp Mini Kit (QIAGEN)	40
B2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	41
B2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)	43
B2.3.1 Πρωτόκολλο PCR για AGT με HOTSTART	44
B2.3.2. Πρωτόκολλο PCR για AGT 1 R με HOTSTART	45
B2.4. Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες.....	46
B2.4.1 Πρωτόκολλο για πέψεις AGT.....	48
B2.4.2. Πρωτόκολλο για πέψεις για AGT1 R.....	49
B2.5 Μέθοδοι για Στατιστική Ανάλυση και Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Πολυμορφισμοί των γονιδίων AGT και AGT1R, και προεκλαμψία» πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επιστημονική επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Σάτρα (Ε.Δι.Π. Μοριακής Βιολογίας).

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, Δρ. Μ. Σάτρα, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Οι γνώσεις που μου μετέδωσε, σε συνδυασμό με τις συμβουλές και τις υποδείξεις της, αποδείχθηκαν πολύτιμες τόσο για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, όσο και για τη συνολική μου πορεία ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και βιολόγος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και την Επ. Καθηγήτρια κ. Μαρία Σαμαρά για τις συμβουλές τους καθώς επίσης και το διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε.

Τέλος, ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους καθηγητές και τη γραμματεία του μεταπτυχιακού προγράμματος και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προεκλαμψία αποτελεί μια πολυσυστημική διαταραχή που μέχρι και σήμερα εξακολουθεί να αποτελεί αιτία μητρικής θνητότητας και νοσηρότητας στις ανεπτυγμένες χώρες. Η εξέλιξη των γνώσεων μας σχετικά με τους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, έχει συμβάλει σημαντικά την ανάπτυξη νέων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και διαχείριση της νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν εμπλέξει το σύστημα της ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, μια και είναι ένα από τα κύρια συστήματα ελέγχου της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των υγρών. Σε αυτό το σύστημα περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων το αγγειοτενσινογόνο (AGT) και ένας από τους υποδοχείς του (AGT1R). Συγκεκριμένα, το AGT είναι πρόδρομος της βιολογικώς δραστηρής αγγειοτενσίνης II (Ang II) και ο υποδοχέας AGT1R προκαλεί ισχυρή αγγειοσυστολή όταν ενεργοποιείται από Ang II. Στην εργασία που ακολουθεί εξετάσαμε την συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων AGT (M235T) και AGT1R (A1166C) με την προεκλαμψία. Για το σκοπό αυτό απομονώσαμε DNA από το περιφερικό αίμα 26 γυναικών χωρίς προεκλαμψία και 26 γυναικών με προεκλαμψία. Τα γονίδια AGT και AGT1R πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών και στα προϊόντα PCR πραγματοποιήθηκε πέψη με την βοήθεια των ενζύμων SfaNI και Dde, αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει μια πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T του γονιδίου AGT και της προεκλαμψίας, ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A1166C του γονιδίου AGT1R και της προεκλαμψίας. Ο πολυμορφισμός M235T είναι μια παραλλαγή του γονιδίου AGT του ανθρώπου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση της μεθειονίνης από τη θρεονίνη στη θέση 235 του αγγειοτενσινογόνου, έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα AGT στο πλάσμα και με επακόλουθη υπέρταση. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, ωστόσο απαιτείται η διεξαγωγή ερευνών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

ABSTRACT

Preeclampsia is a multisystem disorder that still today is a cause of maternal mortality and morbidity in developed countries. The evolution of our knowledge of the pathogenetic mechanisms of the disease has significantly contributed to the development of new biomarkers for the early diagnosis and management of the disease. Several studies have implicated the renin-angiotensin system (RAS) in the pathophysiology of preeclampsia as it is one of the main systems for controlling blood pressure and fluid balance. This system includes angiotensinogen (AGT) and one of its receptors (AGT1R). Specifically, the AGT is a precursor of the biologically active angiotensin II (Ang II) and the receptor AGT1R cause strong vasoconstriction when activated by Ang II. In this study we examined the association of polymorphisms of the AGT (M235T) and AGT1R (A1166C) genes with pre-eclampsia. For this purpose we isolated DNA from the peripheral blood of 26 women without pre-eclampsia and 26 women with pre-eclampsia. The AGT and AGT1R genes were amplified with PCR using appropriate primers and PCR products digested with the enzymes SfaNI and Dde, respectively. Our results indicate that the polymorphism M235T of the AGT gene and preeclampsia it is possible association and we not found association between the polymorphism A1166C of AGT1R gene and preeclampsia. Polymorphism M235T polymorphism is a variant of the human AGT gene, which has as a result the substitution of methionine from threonine at position 235 of angiotensinogen, has been associated with elevated plasma AGT levels and subsequent hypertension. The results are consistent with the literature, however, it is necessary to conduct investigations with larger number of samples in order to reach on safe conclusions,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1.ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ : ΟΡΙΣΜΟΣ

Η εκλαμψία περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 2000 χρόνια, ως επιληπτική κρίση που σχετιζόταν με την εγκυμοσύνη και υποχωρούσε μετά τον τοκετό. (Chesley, 1978). Ο Ιπποκράτης ήταν από τους πρώτους που προσπάθησε να περιγράψει την διαταραχή. (Bell MJ ,2010) Είχε παρατηρήσει την ξαφνική και απροσδόκητη εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων στη μητέρα όταν η προεκλαμψία προχώρα σε εκλαμψία. (Mohler ,2006). Αργότερα με βάση την αιτιολογία και τα συμπτώματα, ονομάστηκε τοξαιμία της κύησης, υπέρταση επαγόμενη από την εγκυμοσύνη ή αλλιώς προεκλαμψία. Τελικά ο ορισμός, καθώς επίσης και η κατηγοριοποίηση των υπερτασικών διαταραχών της κύησης, καθιερώθηκε στο 12^ο Παγκόσμιο Συνέδριο της Διεθνούς Εταιρείας για τη Μελέτη της Υπέρτασης, (ISSHP) στο Παρίσι το 2000. (Brown, et al, 2001).

Η προεκλαμψία είναι μια ειδική κατάσταση στην εγκυμοσύνη που αυξάνει τη μητρική και την εμβρυϊκή νοσηρότητα και θνητότητα. (Shamsi et al.,2013). Διαγιγνώσκεται από ξαφνική αύξηση της αρτηριακής πίεσης, και πρωτεινουρία κατά τη διάρκεια το δευτέρου ή τρίτου τριμήνου. Τα κύρια χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας περιλαμβάνουν: συστολική πίεση ≥ 140 και διαστολική πίεση ≥ 90 καθώς και πρωτεινουρία (>300 mg / 24 h) μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης (Dadelszen.P et al, 2003). Αφορά το 2-8% των κυήσεων (Duley L, 2009) και αποτελεί μια επείγουσα κατάσταση, τόσο για το έμβρυο, όσο και για την ίδια την μητέρα (Βαμβακου και Συν ,2016). Υπολογίζεται ότι 50.000 γυναίκες σε όλο τον κόσμο πεθαίνουν ετησίως από προεκλαμψία. (Shamsi et al.,2013).

Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ετερογένεια όσον αφορά την κλινική της εικόνα ,και τις μακροπρόθεσμες συνέπειες της για τη μητέρα και το παιδί. (Ness, et al, 1996). Υπάρχουν δυο τύποι ανάλογα με το χρόνο εμφάνισης της νόσου, η πρώιμη που εμφανίζεται πριν την 34 εβδομάδα της κύησης και η όψιμη που εμφανίζεται μετά την 34 εβδομάδα. (Dadelszen, 2003). Η όψιμη μορφή της νόσου αφορά την πλειοψηφία των προεκλαμπτικών γυναικών.(Staff et al, 2013). Ωστόσο ο τύπος της πρώιμης εμφάνισης νόσου είναι υπεύθυνος για υψηλά ποσοστά μητρικής κι εμβρυϊκής θνητότητα και νοσηρότητας. Τόσο η πρώιμη όσο και η όψιμη μορφή φαίνεται να διαφέρουν όσον αφορά κάποιους επιβαρυντικούς παράγοντες και όσον αφορά την παθοφυσιολογία τους.(Sohlberg et al, 2014), (Valensise et al, 2008)

Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως μέχρι και σήμερα. Ωστόσο φαίνεται ότι, πιθανότατα η εμφάνιση της νόσου οφείλεται στη μη φυσιολογική διαμόρφωση του πλακούντα. (Maynard, 2011). Η προεκλαμψία αποτελεί μια πολυσυστηματική διαταραχή στην οποία εμπλέκονται πολλά όργανα όπως οι νεφροί, το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Οι συνέπειες αυτών των επιπλοκών επηρεάζουν τόσο την μητέρα όσο και το νεογνό. Στη μητέρα προκαλεί ηπατική/νεφρική ανεπάρκεια, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, πνευμονικό/εγκεφαλικό οίδημα και αιμορραγία. Άλλες κλινικές επιπλοκές της προεκλαμψίας είναι, η αποκόλληση πλακούντα, οι επιληπτικές κρίσεις, οι διαταραχές όρασης, και το σύνδρομο HELLP (Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count – αιμόλυση, αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων),(Lambert et al.,2014). Ενώ όσον αφορά το νεογνό είναι υπεύθυνη, για αυξημένο κίνδυνο αναπνευστικών παθήσεων, ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης(IUGR), και πρόωρη γέννηση.(Backes et al, 2011).

Η αναγνώριση της πρώιμης/όψιμης προεκλαμψίας έχει ιδιαίτερη σημασία. Καθώς συμβάλει στην πρόληψη και την διαχείριση της και μπορεί να καθυστερήσει ή να μειώσει την σοβαρότητα της νόσου. (Espinoza et al, 2007).

A2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες κίνδυνου που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση προεκλαμψίας. Οι παράγοντες αυτοί είναι : η ηλικία, το κάπνισμα, ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος, το ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη κύηση, ο πατρικός παράγοντας, ο τύπος της εγκυμοσύνης (μονήρης, πολύδυμη) οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη και υπέρταση. (Duckitt K, 2005) (Shamsi, 2013) Η εμφάνιση της εξαρτάται από την ατελή πλακουντοποίηση κατά κύριο λόγο και την μητρική πολυσυστημική αντίδραση. Η αλληλεπίδραση αυτών των δυο επηρεάζει διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου με αποτέλεσμα διαφορετικές εκδηλώσεις.(J.Roberts, 2000).

Η προεκλαμψία φαίνεται να εμφανίζεται κυρίως στις πρωτότοκες γυναίκες, που συνέλαβαν με τον ίδιο σύντροφο. Ωστόσο ο προστατευτικός μηχανισμός της πολυτοκίας φαίνεται να εκλείπει σε περίπτωση εγκυμοσύνης με διαφορετικό σύντροφο.(Li D, 2000). Η προστατευτική αυτή επίδραση σχετίζεται με το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των κυήσεων. Όσο μεγαλύτερο διάστημα μεσολαβεί τόσο

αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου. (F. English et, al 2015). Η διαπίστωση αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ανοσολογικού αιτιολογικού μηχανισμού, λόγω παρατεταμένης έκθεσης του οργανισμού σε εμβρυικά αντιγόνα από προηγούμενη εγκυμοσύνη με τον ίδιο σύντροφο. (Ι. Γραμματικάκης και Συν, 2010)

Επίσης, οι μέθοδοι αντισύλληψης που δεν επιτρέπουν την έκθεση στο σπέρμα όπως, το προφυλακτικό αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας, σε αντίθεση με αυτούς που επιτρέπουν την έκθεση σε σπέρμα. (Hernández,2000). Ισχυρός παράγοντας κινδύνου φαίνεται να είναι η ηλικία της εγκύου(<20 - >40).Οι έφηβοι έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε συγκριτικά με γυναίκες ηλικίας 25 έως 35, ενώ όταν πρόκειται για γυναίκες >40 ο κίνδυνος διπλασιάζεται. (Shamsi, 2013) Η ηλικία του άνδρα επίσης φαίνεται να είναι ακόμα παράγοντας κινδύνου, ο οποίος φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ηλικία του (45+). Οι "αλλαγές" που συμβαίνουν στο σπέρμα εξ αίτιας διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων (θερμοκρασία, ακτινοβολίες) και των γενετικών μεταλλάξεων καθώς μεγαλώνουν σε ηλικία, είναι μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου (Harlap et al, 2002).

Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η θρομβοφιλία, τα αντιφωσφορικά αντισώματα, και η αντίσταση στην ινσουλίνη(Ι. Γραμματικάκης και Συν, 2010). Τέλος υπάρχουν και κάποιοι εξωγενείς παράγοντες όπως το κάπνισμα και το στρες. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το κάπνισμα σε κάποιες περιπτώσεις ασκεί ένα προστατευτικό ρόλο έναντι της προεκλαμψίας, ακόμα και μετά την διακοπή του (Augustin et al, 1999). Αντίθετα το στρες και συγκεκριμένα το εργασιακό στρες μπορεί να αποτελέσει δυνητικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας(Klonoff-Cohen et al, 1996), (Duckitt K, 2005).

A3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

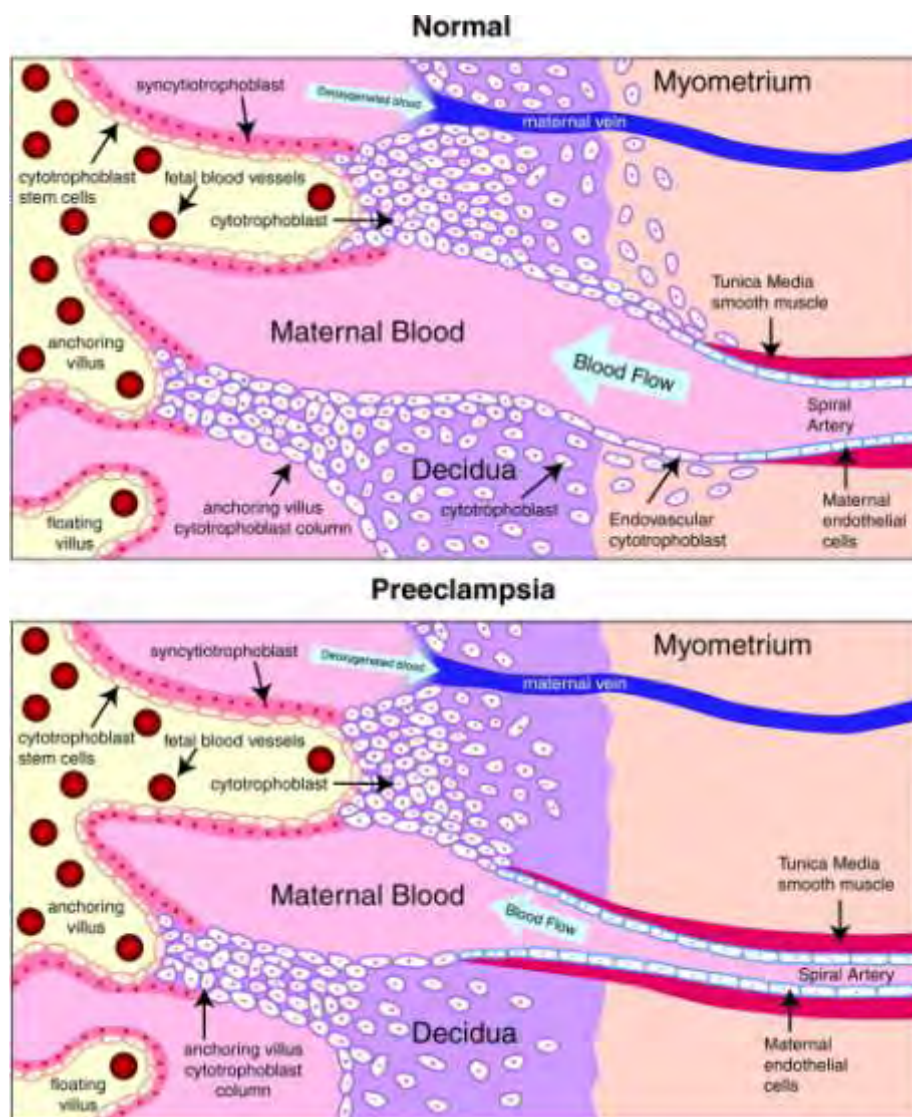
Η προεκλαμψία είναι μια σημαντική αιτία της μητρικής και εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως(Pennington, et al. 2012). Είναι εκπληκτικά διαδεδομένη στις αναπτυσσόμενες και ανεπτυγμένες χώρες. Σύμφωνα με τον Παγκόσμια Οργανισμό Υγείας, η υπέρταση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι η κύρια αιτία μητρικής θνησιμότητας στις βιομηχανικές χώρες σε ποσοστό 16% και έως 25% στις αναπτυσσόμενες χώρες (Polsani, et al. 2013). Ωστόσο οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της νόσου δεν έχουν διευκρινιστεί επαρκώς μέχρι και σήμερα (Valencia-Ortega J, et al. 2015). Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται στο δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης, άλλα οι αρχικοί παθογενετικοί μηχανισμοί προκύπτουν πολύ νωρίτερα (Lambert et al, 2002). Κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας

φαίνεται να κατέχει η ισχαιμία του πλακούντα, ως αποτέλεσμα ενός "ελαττωματικού πλακούντα" (Van Beek E, et al. 1997). Η υπόθεση που επικρατεί για την αίτια της νόσου υποστηρίζει ότι: η ισχαιμία/υποξία του πλακούντα λόγω ανεπαρκούς αναδιαμόρφωσης των στεροειδών αρτηριών, οδηγεί σε μειωμένη αιμάτωση της μητροπλακουντιακής κοιλότητας (Granger et al, 2002). Η μειωμένη μητροπλακουντιακή αιμάτωση σχετίζεται με ενδομήτριο περιορισμό του εμβρύου (Backes CH, et al. 2011). Οι παθογενετικοί μηχανισμοί που φαίνεται να εμπλέκονται στην προεκλαμψία είναι: η ατελής πλακουντοποίηση, το οξειδωτικό στρες, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα αυτόαντισώματα για τον υποδοχέα τύπου I της αγγιοτενσίνης II, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η παρουσία αντι-αγγιογενετικών συνθηκών (Chaiworarongsa et al. 2014). Τέλος η συστηματική ανοσοενεργοποίηση της μητέρας λόγω της επίμονης φλεγμονώδους αντίδρασης, θα μπορούσε να είναι ένας ακόμα αιτιολογικός παράγοντας (Saito S, et al. 2007). Βέβαια είναι ευρέως αποδεκτό ότι όλοι οι αιτιολογικοί παράγοντες συνδυάζονται με τη γενετική σύνθεση της μητέρας και του εμβρύου, καθώς επίσης και με κάποιους περιβαλλοντικούς παράγοντες (English F, et al. (2015).

A3.1 Ατελής Πλακουντοποίηση – Μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών

Ιδιαίτερα σημαντικό για να προχωρήσει φυσιολογικά μια εγκυμοσύνη είναι η πρώιμη βλαστοκύστη να εμφυτευθεί στο ενδομήτριο κατά τέτοιο τρόπο ούτως ώστε, να αιματώνεται επαρκώς (I. Γραμματικακης, και Συν, 2010). Η επαρκής αιμάτωση του πλακούντα είναι σημαντική καθώς θα εξασφαλίσει το κατάλληλο μεταβολικό υπόστρωμα, που είναι απαραίτητο για την υποστήριξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Reynolds LP, et al. 1995). Η αύξηση της αιματικής ροής επιτυγχάνεται με την μετατροπή των στεροειδών αρτηριών του πλακούντα, μια διαδικασία που ξεκινά στο πρώτο τρίμηνο, και ολοκληρώνεται στις 18 – 20 εβδομάδες της κύησης (Brosens et al. 1967, Gerretsen et al. 1981). Όταν η τροφοβλάστη εισβάλει στο αρτηριακό τοίχωμα της μητέρας τα αγγεία υφίστανται δραματικές αλλαγές. Οι σπειροειδείς αρτηρίες από μικρές μυϊκές αρτηρίες διαστέλλονται εντυπωσιακά στο τελικό άκρο τους. Τα διεσταλμένα τμήματα των αγγείων χάνουν το ενδοθήλιο τους, τις λείες μυϊκές ίνες και τα εσωτερικά ελαστικά ελάσματα (J.Roberts, et al. 2012). Αυτή η τροποποίηση επεκτείνεται στο εσωτερικό 1/3 του μυομητρίου, με αποτέλεσμα το τερματικό τμήμα των σπειροειδών αρτηριών να τροποποιείται σε αγγεία μεγάλης διαμέτρου, που είναι αδύνατον να συστέλλονται ως απάντηση στα χυμικά ή νευρικά σήματα (Pijnenborg et al. 2006). Αυτές οι αλλαγές δεν συμβαίνουν κανονικά στην προεκλαμψία. Ορισμένα αγγεία υφίστανται μέτρια αναδιαμόρφωση τμηματικά, αλλά

αυτή η αλλαγή δεν επεκτείνεται ποτέ μέχρι το μυομήτριο και μερικά αγγεία δεν αναδιαμορφώνονται (Robertson, et al. 1967). Αυτές οι μη μετασχηματισμένες αρτηρίες είναι ευαίσθητες σε αθηροσκλήρωση, χαρακτηρίζονται από την παρουσία φορτωμένων με λιπίδια μικροφάγων μέσα στον αυλό, περιαγγειακή διήθηση μονοπύρηνων και ινώδη νέκρωση. (Kaculini et, al. 2016)



Εικόνα1. Μη φυσιολογικός πλακούντας στην προεκλαμψία. Στην φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα, οι διηθητικοί κυτταροτροφοβλάστες εμβρυϊκής προέλευσης εισβάλλουν στις μητρικές σπειροειδείς αρτηρίες, μετασχηματίζοντάς τις από αγγεία ανθεκτικότητας μικρού διαμετρήματος σε δοχεία χωρητικότητας υψηλού διαμετρήματος ικανά να παρέχουν αιμάτωση πλακούντα επαρκή για τη διατήρηση του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Κατά τη διαδικασία της αγγειακής εισβολής, οι κυτταροτροφοβλάστες διαφοροποιούνται από έναν επιθηλιακό φαινότυπο σε έναν ενδοθηλιακό φαινότυπο, μια διαδικασία που αναφέρεται ως ψευδοαγγειογένεση ή αγγειακή μίμηση (άνω). Στην προεκλαμψία, οι κυτταροτροφοβλάστες αποτυγχάνουν να υιοθετήσουν έναν επεμβατικό ενδοθηλιακό φαινότυπο. Αντ 'αυτού, η εισβολή των σπειροειδών αρτηριών είναι ρηχή και παραμένουν αγγεία ανθεκτικότητας μικρού διαμετρήματος (κάτω)

Το κύριο χαρακτηριστικό στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, είναι η μη φυσιολογική διείσδυση της τροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες του φθαρτού και του μυομητρίου. Αυτό οδηγεί σε αποτυχία καθιέρωσης επαρκούς αιμάτωσης της μητροπλακουντιακής κοιλότητας. (Myatt L, 2002). Επομένως πιστεύεται ότι, μια ανώμαλη τροφοβλάστη μπορεί να είναι η αίτια της ατελούς πλακουντοποίησης, και του ανεπαρκούς μετασχηματισμού των σπειροειδών αρτηριών που τελικά οδηγούν σε προεκλαμψία. Ωστόσο η ισχαιμία του πλακούντα από μόνη της δεν επαρκεί για να προκαλέσει προεκλαμψία. Καθώς και ο ενδομήτριος περιορισμός ανάπτυξης ο οποίος επίσης χαρακτηρίζεται από αποτυχία φυσιολογικού μετασχηματισμού σπειροειδών αρτηριών και ανεπάρκειας του πλακούντα, δεν αφορά μονό εγκυμοσύνες που εμπλέκονται με προεκλαμψία. (Kaculini et, al. 2016)

A3.2 Ισχαιμία του πλακούντα

Η ισχαιμία του πλακούντα θεωρείται ο βασικός παράγοντας στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Η ανεπαρκής εισβολή τροφοβλάστης, που οδηγεί σε ατελή αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας, θεωρείται η πρωτογενής αιτία της ισχαιμίας του πλακούντα (Gilbert et al. 2008). Η ισχαιμία του πλακούντα πιστεύεται ότι οδηγεί σε εκτεταμένη ενεργοποίηση / δυσλειτουργία του μητρικού αγγειακού ενδοθηλίου (Granger et al. 2001). Το τελευταίο παράγει διαλυτούς παράγοντες οι οποίοι όταν απελευθερώνονται στη μητρική κυκλοφορία, ευθύνονται για τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Αυτοί οι διαλυτοί παράγοντες πιστεύεται ότι προκαλούν δυσλειτουργία ενδοθηλιακών κυττάρων, ενδοαγγειακή φλεγμονή και ενεργοποίηση του αιμοστατικού συστήματος γι αυτό και η προεκλαμψία θεωρείται ότι είναι κατά κύριο λόγο αγγειακή διαταραχή. (Chaiworarongsa, et al. 2014)

A3.3 Οξειδωτικό στρες

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εγκυμοσύνης, ο πλακούντας αναπτύσσεται σε ένα σχετικά υποξικό περιβάλλον το οποίο είναι απαραίτητο για την κατάλληλη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Caniggia, et al. 2000). Τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση της τροφοβλάστης μέχρι και τη 10 εβδομάδα της κύησης παρέχονται από τις εκκρίσεις των αδένων του ενδομητρίου (Burton, et al. 2002). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου σε αυτή την φάση ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την φυσιολογική εμφύτευση της τροφοβλάστης (Chaiworarongsa, et al. 2014). Έχει παρατηρηθεί ότι τη 12^η εβδομάδα τα επίπεδα οξυγόνου αυξάνονται απότομα. Αυτό συμπίπτει και με κάποιες

μορφολογικές αλλαγές στις μητρικές αρτηρίες οι οποίες επιτρέπουν την ελεύθερη ροή του μητρικού αίματος στον πλακούντα. Στην προεκλαμψία η αποτυχία των τροφοβλαστών να διεισδύσουν στα βαθύτερα στρωματά του ενδομήτριου, και να αναδιαμορφώσουν τις σπειροειδής αρτηρίες, οδηγεί σε μειωμένη διάχυση του πλακούντα (Jauniaux E et al. 2000). Η ισχαιμία του πλακούντα πιστεύεται ότι οδηγεί σε εκτεταμένη δυσλειτουργία του μητρικού αγγειακού ενδοθηλίου που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξυντικού στρες. (Granger, et al. 2001)

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και να συμβάλει στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, καθώς υπάρχουν ενδείξεις αυξημένου σχηματισμού οξειδωτικής δραστηριότητας με μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία στην προεκλαμψία (LaMarca, et al.2008). Σε πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση στις αυξημένες ρίζες οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε καρβοξυλίωση των πρωτεϊνών, υπεροξείδωση των λιπιδίων και οξείδωση του DNA (Burton et al. 2011). Επίσης ο υποξικός πλακούντας μπορεί να παράγει κυτοκίνες ικανές να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες (Roberts et al. 2001). Τέλος κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας, μπορεί να προκύψει οξειδωτικό στρες από αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μητρικής συνιστώσας, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν προϋπάρχουσες παθήσεις όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η υπερλιπιδαιμία ή το συστατικό του πλακούντα που μπορεί να περιλαμβάνει την έκκριση υπεροξειδίων λιπιδίων (LaMarca, et al.2008).

A3.4 Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό στρες είναι ένα παθοφυσιολογικό φαινόμενο που συνδέεται στενά με το οξειδωτικό στρες(Kaufman et al. 2012). Η μειωμένη παροχή οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει τόσο στο οξειδωτικό, όσο και στο ενδοπλασματικό στρες (Burton et al. 2011). Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Όταν η παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου δεν επαρκούν ο στόχος του είναι, η διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού οδηγώντας στην χαρακτηριστική απάντηση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης (unfolded protein response - UPR). (LaMarca, et al.2008). Η UPR σταμάτα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και φαίνεται να σχετίζεται με τον ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης του εμβρύου, ενώ σε σοβαρές καταστάσεις στρες μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό αποπτωτικό θάνατο. (LaMarca, et al.2008) Η απόπτωση της τροφοβλάστης απελευθερώνει στη μητρική

κυκλοφορία μικρά σωματίδια, τα οποία μπορεί να διεγείρουν την ενδοαγγειακή φλεγμονώδη απάντηση (Redman et al. 2007).

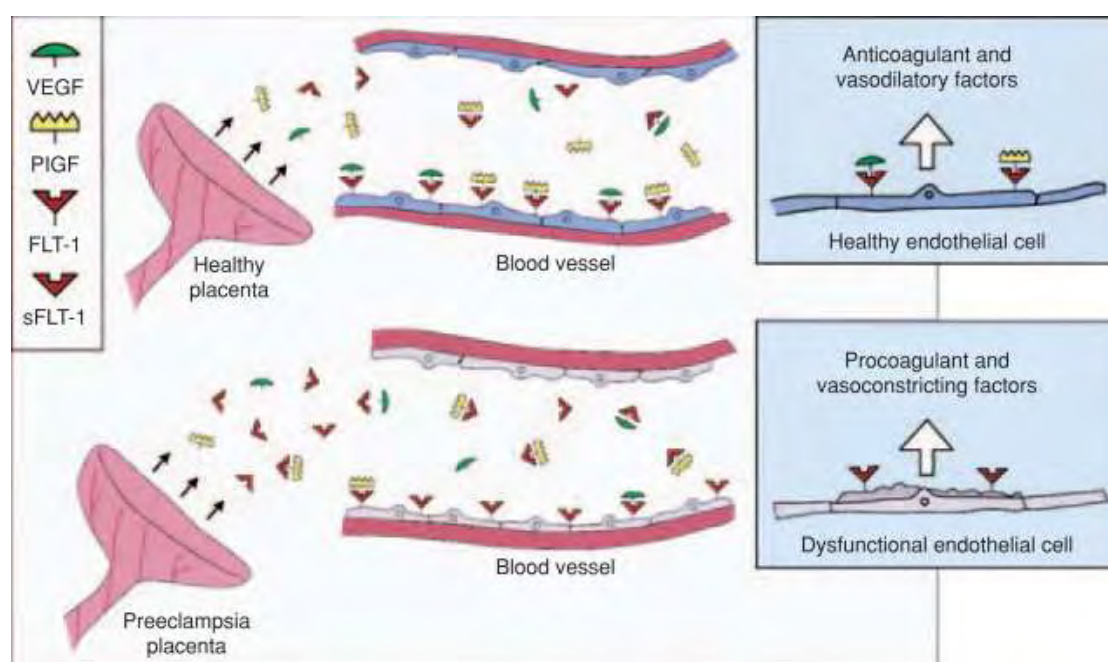
A3.5 Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

Το μητρικό αγγειακό ενδοθήλιο φαίνεται να είναι ένας σημαντικός στόχος των παραγόντων που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας (LaMarca 2012). Το κυριο χαρακτηριστικό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι ο αγγειοσπασμός. Η πρωτεΐνουρία μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως εκδήλωση βλάβης στο περιφερικό σπειραματικό ενδοθήλιο. (Von Dadelszen, et al. 2003). Υποστηρίζεται ότι τα παράγωγα του ισχαιμικού πλακούντα εισέρχονται στην κυκλοφορία της μητέρας και μεταβάλλουν την δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κύτταρων. Έτσι μεταβάλλεται η ευαισθησία των κυκλοφορούντων αγγειοσυσταλτικών μορίων, ενεργοποιούνται οι παράγοντες πήξης και μειώνεται η αγγειακή ακεραιότητα, με αποτέλεσμα τις παθοφυσιολογικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας (Roberts, 1989). Αξίζει να σημειωθεί ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μπορεί να προϋπάρχει της προεκλαμψίας (Roberts, 2013). Σε μια αλληλεπίδραση μειωμένης ροής του πλακούντα και μητρικών παραγόντων όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η υπέρταση, η προεκλαμψία είναι δευτερογενής αίτια εμφάνισης της διαταραχής (Roberts, 1989).

A3.6 Αντι-αγγειογενείς παράγοντες στη προεκλαμψία

Η αγγειογένεση, είναι η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από αγγεία που προϋπήρχαν και είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή κύηση. Η μη φυσιολογική αγγειογένεση είχε θεωρηθεί από παλιά ως μια ένδειξη για προεκλαμψία (Torrey et al. 1998). Η σχολαστική ερευνά έδειξε ότι μια αντιαγγειογενής κατάσταση εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Maynard et al. 2003). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PlGF), παίζουν βασικό ρόλο στην αγγειογένεση του πλακούντα. Οι δυο τους πιστεύεται ότι εκκρίνονται από τα κύτταρα τροφοβλαστών. Ο VEGF θεωρείται ότι είναι απαραίτητος για την ακεραιότητα των μητρικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Alon T, et al. 1995). Ο ρόλος του PlGF είναι λιγότερο κατανοητός από αυτόν του VEGF, αλλά ο PlGF φαίνεται να διεγείρει την αγγειογένεση υπό συνθήκες ισχαιμίας, φλεγμονής και επούλωσης τραύματος, ενώ μπορεί να συνεισφέρει και στην αθηροσκλήρωση (Luttun A, et al. 2002). Ωστόσο και οι δυο είναι σημαντικοί στη διατήρηση της σωστής λειτουργίας και υγείας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Wang, et al. 2009). Ο VEGF αλληλεπιδρά με δυο υψηλής συγγενείας υποδοχείς με

δραστικότητα κίνησης τυροσίνης, τους KDR και Flt-1, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (Dvorak, 2002). Ο PlGF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από τον ανθρώπινο πλακούντα ενώ τα ομοδιμερή του PlGF δεσμεύονται στον υποδοχέα Flt-1 με υψηλή συγγένεια (Powe, et al. 2011). Ο sFlt-1 είναι σε θέση να αποκλείσει τη δράση του VEGF και του PlGF παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς τους. Η εξουδετέρωση του VEGF και PlGF, και η περίσσεια sFlt-1 φαίνεται να συμβάλουν στην παθογένεση του μητρικού συνδρόμου της προεκλαμψίας (Lam, et al. 2005). Η χορήγηση sFlt1 σε εγκύους αρουραίους προκαλεί υπέρταση, πρωτεινουρία και σπειραματική ενδοθηλιοπάθεια, την κλασική βλάβη της προεκλαμψίας (Maynard et al 2003).



Εικόνα 2. Το διαλυτό Flt-1 (sFlt-1) προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με τον ανταγωνισμό του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του αυξητικού παράγοντα του πλακούντα (PlGF)

Ο δεύτερος αντί-αγγειογενετικός παράγοντας που σχετίζεται με την παθογένεση της προεκλαμψίας, είναι η διαλύτη ενδογλίνη (soluble endoglin – sEng) ένας συν-υποδοχέας των TGF-β1 και TGF-β3 που επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κύτταρων. Ο sEng παρεμποδίζει τη δέσμευση του TGF-β1 υποδοχείς του με αποτέλεσμα να αναστέλει το σχηματισμό τριχοειδών σωλήνων *in vitro*, ενώ *in vivo* προκαλεί αγγειακή διαπερατότητα και υπέρταση (Venkatesha et al. 2006). Η χορήγηση sEng σε πειραματόζωα έδειξε ότι ενισχύει την

αγγειακή βλάβη που προκαλεί ο sFlt-1 προκαλώντας ένα σύνδρομο παρόμοιο με σοβαρή προεκλαμψία (Levine et al. 2006).

A3.7 Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τυπου-1 της αγγειοτενσίνης II

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση της νεφρικής λειτουργίας και της αρτηριακής πίεσης κατά τη διάρκεια ποικίλων φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών συνθηκών. Κατά τη διάρκεια της κανονικής κύησης, η συγκέντρωση και η δραστικότητα της ρενίνης και αγγειοτενσίνης II (Ang II) είναι σε αυξημένα επίπεδα. Ωστόσο, η αγγειακή ανταπόκριση

στο Ang II φαίνεται να μειώνεται (Granger, et al. 2001). Στις γυναίκες με προεκλαμψία έχουμε αυξημένη ευαισθησία στις επιδράσεις της αγγειοτενσίνης II, μια ένδειξη που μπορεί να εντοπιστεί στις 24 εβδομάδες της κύησης (Gant et al. 1974). Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την φυσιολογική αντίσταση στην αγγειοτενσίνη II σε μια υγιή κύηση καθώς επίσης, και για την ενισχυμένη απόκριση σε αυτή στην προεκλαμψία περιλαμβάνουν: γενετική προδιάθεση, μη προσαρμοσμένες ανοσολογικές απαντήσεις και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Dachend et al. 2009). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η προεκλαμψία συσχετίζεται με την παρουσία μητρικών αυτοαντισωμάτων ικανών να δεσμεύονται και να ενεργοποιούν τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης (Ang) τύπου 1 (AT1). Τα αγωνιστικά αντισώματα AT1, σπάνια παρατηρούνται σε κανονικές έγκυες γυναίκες (Wallukat G ,et al. 1999). Ενεργοποιούν υποδοχείς AT1 σε καρδιακά μυοκύτταρα, κύτταρα τροφοβλαστών, ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσαγγειακά κύτταρα και μεταξύ άλλων κύτταρα αγγειακού λείου μυός (Xia, et al. 2007). Επίσης τα αυτοαντισώματα AT1 μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση οξειδάσης NADPH, ένα ένζυμο που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των δραστικών ριζών οξυγόνου, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες (Chaiworarongsa, et al. 2014). Τέλος μπορούν να διεγείρουν τον sFlt-1 και κατά συνέπεια να προκαλέσουν μια αντι-αγγειογενετική κατάσταση(Parrish et al. 2010).

A3.8. Σύστημα ανοσίας και προεκλαμψία

Η επιτυχής εγκυμοσύνη απαιτεί, το συντονισμό μεταξύ ενός δεκτικού ενδομητρίου και της βλαστοκύστης που πρόκειται να εμφυτευτεί. Η ανθρώπινη μήτρα είναι μια ανοσοποιημένη περιοχή που προστατεύει το εμφυτευμένο ημι-αλλογενές έμβρυο από μια επιθετική μητρική αντίδραση ανοσίας (Aluvihare, et al 2004). Ο τρόπος με τον οποίο συντονίζονται αυτοί οι μηχανισμοί παραμένει αδιευκρίνιστος. Μετά την

εμφύτευση, η ανοσολογική αναγνώριση του εμβρύου συμβαίνει κυρίως με τη "διεπαφή" μητέρας-εμβρύου κατά το πρώτο τρίμηνο. Καθώς η εμφύτευση της τροφοβλάστης λαμβάνει χώρα στο φθαρτό και στο εσω 1/3 του μυομητρίου (Warning, et al 2011).

Στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, το 30-40% του φθαρτού αποτελείται από μητρικά ανοσοκύτταρα, εκ των οποίων τα περισσότερα είναι κύτταρα φυσικοί φονείς dNK (70%), μακροφάγα (<30%), T κύτταρα (<20%) και δένδριτικά κύτταρα (<2%) (Loke, et al. 1995). Η ενεργώς δράση των κυττάρων αυτών ασκεί ένα προστατευτικό ρόλο κατά την διαδικασία της εμφύτευσης (Hanna, et al. 2006). Καθώς εκκρίνει σημαντικές κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, προωθώντας την αγγειακή αναδιαμόρφωση και την εισβολή της τροφοβλάστης εντός της μήτρας με ένα εξαιρετικά ρυθμιζόμενο τρόπο (Warning, et al 2011). Οι διαταραχές στην δράση ανοσολογικών παραγόντων που βρίσκονται στο φθαρτό οδηγούν σε μη φυσιολογική εμφύτευση τροφοβλάστης και κατά συνέπεια ατελή πλακουντοποίηση. Οι ενδείξεις αυτές υποδηλώνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να σχετίζεται με τους παθογενετικούς μηχανισμούς της προεκλαμψίας (Chang-Ching Yeh, et al. 2013).

Τα λευκοκύτταρα του μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος με τη δράση τους προάγουν την επιτυχή εμφύτευση, ωστόσο εμπλέκονται και σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις στην εγκυμοσύνη (Gomez-Lopez N, et al. 2010), (Abrahams, V, et al. 2005). Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα υπάρχουν στην κυκλοφορία του εμβρύου και του πλακούντα σε συνθήκες υποξίας, μπορούν να συμβάλλουν στην αυξημένη αγγειακή αντίσταση και νοσηρότητα του εμβρύου που παρατηρείται στην προεκλαμψία (Mellembakken, et al. 2001). Επιπροσθέτως τα μονοκύτταρα μπορεί να αποτελούν σημαντική πηγή προφλεγμονωδών κυτοκινών στην προεκλαμψία, εκκρίνοντας IL-1, IL-6 και IL-8 σε υψηλά επίπεδα. (Luppi P, et al. 2006). Μελέτες έχουν δείξει ότι κάποιες προφλεγμονώδης κταροκίνες όπως ο TNF, της IL-6 ή IL-17 είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ορισμένων χαρακτηριστικών της προεκλαμψίας, όπως η υπέρταση και το οξειδωτικό στρες (McCarthy et al. 2011), (Khalil RA, et al. 2002). Επομένως η υπερβολική ανοσοδιέγερση από νεκρωτικές τροφοβλάστες, η υποξική κατάσταση και η κακή αγγειογένεση μπορεί να υπερνικήσει το σύστημα ανοσορρυθμίσεως με αποτέλεσμα συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στην προεκλαμψία. (Saito et al. 2007)

A3.9 Γενετική προδιάθεση – προεκλαμψία

Παρά το γεγονός ότι ορισμένοι μοριακοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην εμφάνιση της διαταραχής έχουν ταχτοποιηθεί, οι παθογενετικοί μηχανισμοί της δεν έχει είναι πλήρως κατανοητοί. Φαίνεται ότι ένα σύνολο γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων δρουν σε συνδυασμό (Chelbi et al. 2008). Εξετάζοντας την πιθανότητα γενετικής προδιάθεσης φαίνεται ότι η συχνότητα και η σοβαρότητα της νόσου είναι σημαντικά αυξημένη σε γυναίκες με προϋπάρχουσα υπέρταση, διαβήτη, την προηγούμενη εμφάνιση προεκλαμψίας, προϋπάρχουσα θρομβοφιλία και το οικογενειακό ιστορικό της προεκλαμψίας (αδελφή / μητέρα που υπέφερε από προεκλαμψία) (Duckitt et al, 2005), (Marshall Graves, 1998). Ακόμα κάποιοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί πιθανόν να επηρεάζουν τη μητρική απόκριση στην προεκλαμψία, καθορίζοντας την έκταση των συμπτωμάτων. Οι πολυμορφισμοί αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στην θρομβοφιλία, αιμοδυναμική ρύθμιση, κυτοκίνες, οξειδωτικό στρες, το μεταβολισμό των λιπιδίων, αγγειογένεση και αγγειακή εισβολή (Chappell, et al. 2006).

Επιπλέον, πιστεύεται ότι τα πατρικά γονίδια διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της διαταραχής. Δεδομένου ότι η αποτύπωση του πατρικού γονιδιωματος, και όχι του μητρικού, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της φυσιολογικής τροφοβλάστης (Dekker, et al. 2011). Οι άνδρες που γεννιούνται από εγκυμοσύνη που είχε εμπλακεί με προεκλαμψία, διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμπτικής εγκυμοσύνης (Esplin, et al, 2001)

A4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Πλέον είναι ευρέως αποδεκτό πως ο παθογενετικός μηχανισμός της προεκλαμψίας είναι πιθανότατα πολυπαραγοντικός (Szpera-Gozdziwicz, et al. 2014). Ένα ευρύ φάσμα μοριακών παραγόντων εμπλέκεται στη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας (Haram et al. 2014). Καθώς οι γνώσεις μας για τη παθογένεση αυτής της νόσου εξελίσσονται, μας δίνεται η ευκαιρία να αναπτύξουμε καινούριους βιοδείκτες. Η συμβολή των οποίων θα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην έγκαιρη διάγνωση και στην πρόληψη ασθενειών (Polsani, et al. 2013). Δεδομένου ότι η προεκλαμψία αφορά σχεδόν αποκλειστικά τον άνθρωπο, και ο τοκετός εξακολουθεί να είναι η μόνη αποτελεσματική θεραπεία (Pennington, et al. 2012). Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση της προεκλαμψίας θα οδηγήσει σύντομα σε φιλόδοξους κλινικούς στόχους (Sahai, et al.2017). Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι δεν

υπάρχει ένας μόνο βιοδείκτης που να είναι κλινικά χρήσιμος για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας. Αντιθέτως, ο συνδυασμός βιοδεικτών και βιοφυσικών παραμέτρων (όπως η χρήση Doppler) φαίνονται πολλά υποσχόμενος. Βέβαια απαιτούνται περισσότερα δεδομένα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η χρήση τους στην κλινική πρακτική (Barton, et al. 2008). Παρακάτω θα αναπτύξουμε μερικούς από τους βιοδείκτες, που έχουν ταχτοποιηθεί και συσχετιστεί με την προεκλαμψία.

A4.1 Αγγειογενετικοί βιοδείκτες

Οι αγγενετικοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αγγειακής ανάπτυξης του πλακούντα. Οι πλέον μελετημένοι δείκτες που σχετίζονται με προεκλαμψία είναι ο VEGF, ο PlGF και οι ανταγωνιστές τους, δηλαδή ο sFlt-1 και η sEng (Robinson, et al. 2007). Ο μηχανισμός δράσης τους στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας έχει περιγράψει εκτενώς σε προηγούμενη ενότητα (βλ. A3.1)

Κατά τη διάρκεια της κανονικής κύησης, τα επίπεδα sFlt-1 είναι σταθερά, σε αντίθεση με τα επίπεδα του PlGF τα οποία μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της κύησης (Herraiz, et al. 2015). Ο sFlt-1 δεσμεύει και εξουδετερώνει τη δράση του PlGF διατηρώντας σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της νόσου (Sahai, et al. 2016) Στη προεκλαμψία τα επίπεδα της sFlt-1 στη μητρική κυκλοφορία παρουσιάζουν σημαντική αύξηση τουλάχιστον ένα μήνα νωρίτερα από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων (Levine, et al. 2004). Έτσι ο sFlt-1 είναι πιο ευαίσθητος στην ανίχνευση της πρώιμης προεκλαμψίας. Επίσης ο λόγος sFlt-1/PlGF είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης παρακολούθησης των ασθενών που πάσχουν από προεκλαμψία, καθώς παρέχει προγνωστικές πληροφορίες σχετικά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Verlohren, et al. 2014). Ακόμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην ταυτοποίηση ασθενών που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο καθώς, τα επίπεδα του sFlt-1 αντανακλούν την βαρύτητα της νόσου (Simas, et al. 2007). Η διαλυτή ενδογλίνη (sEng) είναι ένας ακόμα δείκτης που εντοπίζεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα σε ασθενείς που ανέπτυξαν προεκλαμψία. Τα αυξημένα επίπεδα αυτής στον ορό αντανακλούν, την σοβαρότητα των συμπτωμάτων (Stepan, et al. 2007). Φαίνεται να έχει υψηλή προγνωστική αξία, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η (sEng) είναι αυξημένη αρκετές εβδομάδες πριν από την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων της προεκλαμψίας. Η αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι όταν συνδυάζεται με τους sFlt-1 και PlGF, η προγνωστική της αξία όσον αφορά την ανίχνευση προεκλαμψίας αυξάνεται κατά πολύ (Verlohren, et al. 2014).

Ένας άλλος αντί – αγγειογενετικός παράγοντας είναι τα αυτοαντισώματα τα έναντι του εξωκυτταρικού υποδοχέα AT1 της αγγειοτενσίνης. Ασθενείς που ανέπτυξαν αργότερα προεκλαμψία είχαν εξημμένα επίπεδα AT1 στον ορό (Wallukat, et al. 1999). Σε μελετες που έχουν γίνει *in vitro* επιβεβαιώνεται ότι αυτά τα αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν μια πληθώρα αποκρίσεων που σχετίζονται με την υπερτασική διαταραχή στα αγγειακά κύτταρα ενώ μπορούν να μειώσουν τη μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων (Herse, et al. 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί μια πρόσφατη μελέτη η οποία έδειξε, μια σύνδεση μεταξύ αυτών των αυτοαντισωμάτων και της υπερπαραγωγή του sflt-1 σε ανθρώπινα τροφοβλαστικά κύτταρα ή πλακουντιακά εκφυτεύματα (Zhou, et al. 2008). Ενώ μια άλλη μελέτη επιβεβαίωσε ότι τα AT1 αυτοαντισώματα απαντώνται σε ασθενείς με προεκλαμψία και, ότι θα μπορούσαν να είναι ένας αντιπροσωπευτικός βιοδείκτης για της προεκλαμψίας όψιμης έναρξης (Herse, et al. 2009). Ωστόσο η χρήση τους στη κλινική πράξη χρίζει περαιτέρω διερεύνηση (Grill, et al. 2009).

Τέλος η Αδρενομεδουλλίνη έχει συσχετιστεί με διαταραχές του αγγειακού συστήματος (Kato, et al. 2005). Έχει βρεθεί ότι στη προεκλαμψία τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι υψηλότερα σε σύγκριση με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Senna, et al. 2008). Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με ενδείξεις για αυξημένα επίπεδα mRNA αδρενομεδουλινης στον ιστό του πλακούντα (Gratton, et al. 2003). Καθώς δρα ως αγγειοδιασταλτικό, τα αυξημένα επίπεδα της υποδεικνύουν την αντίδραση της έναντι των υπερτασικών διαταραχών της προεκλαμψίας (Grill, et al. 2009).

A4.2 Πρωτεΐνη A (PAPP-A)

Η πρωτεΐνη A (PAPP-A), είναι μια πρωτεάση του πλάσματος 1628 αμινοξέων, και σχετίζεται με τη εγκυμοσύνη αφού παράγεται κυρίως από τις τροφοβλάστες του πλακούντα (Grill S, et al. 2009). Η παρατήρηση της αυξημένης PAPP-A στον ορό γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία, έγινε για πρώτη φορά πριν από 30 χρόνια (Hughes et al., 1980). Είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση πρωτεϊνών δέσμησης αυξητικού παράγοντα (IGFBP-4), τύπου ινσουλίνης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Lapaire et al. 2010). Με τη χρήση της PAPP-A ως δείκτη, η μεταβολή της δραστηριότητα αυτών των αυξητικών παραγόντων του πλακούντα εντοπίζεται σε πολύ πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνη (Yliniemi, et al. 2015). Έχει αποδειχθεί ότι η δραση αυτων των IGF σχετίζεται με την απώλεια της εγκυμοσύνης, την υπέρταση, προεκλαμψία, την πρόωρο τοκετό, περιορισμό της

εμβρυικής ανάπτυξης, ακόμα και θάνατο του εμβρύου (Smith et al. 2002). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μειωμένα επίπεδα της PAPP-A στον ορό, στο πρώτο τρίμηνο σχετίζονται με προεκλαμψία, επίσης σε χαμηλά επίπεδα εντοπίζεται και σε άλλες επιπλοκές της εγκυμοσύνης (Yaron et al. 2002). Ανήκει σε μια ομάδα βιοδεικτών που προβλέπουν την μεταγενέστερη ανάπτυξη προεκλαμψίας, κυρίως προεκλαμψία πρώιμης εμφάνιση. Ωστόσο, θα πρέπει να συνδυαστεί με υπερηχογραφία Doppler της μήτρας (δείκτης παλμών) και άλλους βιοχημικούς και μητρικούς παράγοντες για να επιτευχθεί υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης με αποδεκτό ποσοστό ψευδούς θετικότητας (Kalousoná, et al. 2014).

A4.3 Πρωτεΐνη PP13

Η πρωτεΐνη πλακούντα 13 (PP13) είναι μία διμερής πρωτεΐνη των 32 kDa (Carty, et al. 2008). Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον πλακούντα και συγκεκριμένα από την συνκυτιοφοβλάστη το 1983 Bohn et al, (Lakshmi Tanuja Petla et al. 2013), (Bohn, et al. 1983). Είναι μέλος της υπερικογενείας της γαλεκτίνης, τα μέλη της οποίας είναι σημαντικά για την εμφύτευση του πλακούντα και την αναδιαμόρφωση των μητρικών αρτηριών (Nicolaidis, et al. 2006). Η PP13, παράγεται αποκλειστικά από τον ιστό του πλακούντα, διαθέτει διατηρημένη περιοχή δέσμησης υδατανθράκων, στην οποία δεσμεύονται δύο πρωτεΐνες η Annexin-II και η Actin-B. Αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πλακουντοποίηση και στην αναδιαμόρφωση της μητρικής αρτηρίας αντίστοιχα (Lakshmi Tanuja Petla et al. 2013). Τα επίπεδα του PP-13 στον ορό αυξάνονται σταδιακά κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης. Ωστόσο ασυνήθιστα χαμηλά επίπεδα PP-13 σε δείγματα ορού του πρώτου τριμήνου ανιχνεύτηκαν σε γυναίκες που στη συνέχεια εμφάνισαν ενδομήτριο περιορισμό εμβρυικής ανάπτυξης και προεκλαμψία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πρώιμης έναρξης (Burger, et al. 2004). Η PP 13 πριν από τον τοκετό φτάνει σε διπλάσιες και τριπλάσιες τιμές όταν πρόκειται για φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Ενώ, παρατηρηθεί ότι από τις 5-7 εβδομάδες της κύησης, τα επίπεδα της είναι πολύ χαμηλά σε γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία (Huppertz et al. 2008) Επομένως η μέτρηση του PP-13 στον ορό κατά το πρώτο τρίμηνο, μπορεί να είναι χρήσιμη για την έγκαιρη πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνιση προεκλαμψίας (Grill, et al. 2009). Μάλιστα μια μελέτη έδειξε ότι ο συνδυασμός των επιπέδων PP-13 στον ορό και, ο έλεγχος των μητριάων αρτηριών με Doppler φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα πρόβλεψης της σοβαρής προεκλαμψίας (Nicolaidis, et al. 2006).

A4.4 PTX 3

Η πεντραξίνη 3 (PTX3) είναι ένα πρόσφατα περιγραφόμενο φλεγμονώδες μόριο που ανήκει στην οικογένεια της γνωστής C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) (Sahai, et al. 2017). Η PTX3 διαφέρει από την CRP όσον αφορά, την κυτταρική προέλευση, και τους μοριακούς επαγωγείς της. Εκφράζεται από διαφορετικά κύτταρα όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και τους ινοβλάστες που εκτίθενται σε φλεγμονώδη ερεθίσματα (Garlanda, et al 2005). Επίσης εκφράζεται και σε ιστούς που υποβάλλονται σε κυτταρικό θάνατο (Grill S, et al. 2009). Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η (PTX3) εκφράζεται στο αμνιακό επιθήλιο, στο χοριοϊκό μεσόδερμα, στο περιαγγειακό στρώμα, στα κύτταρα του φθαρτού και στις τελικές λάχνες του πλακούντα (Akolekar, et al. 2009). Αυξημένα επίπεδα PTX3 στην προεκλαμψία αποδίδονται στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις της ασθένειας. Έχουν αναφερθεί υψηλές τιμές PTX3 μεταξύ 11^{ης} και 14^{ης} εβδομάδας σε περιπτώσεις, πρώιμης εκδήλωσης προεκλαμψίας (Sahai, et al. 2017). Επομένως η αυξημένη PTX3 στο μητρικό πλάσμα σε κατάσταση προεκλαμψίας μπορεί να είναι ένας δείκτης αλλαγής της ενδοθηλιακής λειτουργίας (Cetin, et al. 2006).

A4.5 Κυστατίνη C

Η κυστατίνη C είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης που χρησιμοποιείται ευρέως από τους κλινικούς ιατρούς ως ευαίσθητο δείκτη για τη νεφρική λειτουργία και για την εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα κυστατίνης C στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (Anderson, et al. 2012). Μεμελέτες έχουν δείξει ότι η κυστατίνης C είναι, αξιόπιστος διαγνωστικός δείκτης για προεκλαμψία (Strevens, et al. 2001). Η αύξηση των επιπέδων της κυστατίνης C φαίνεται να προκαλούνται είτε από εξασθενημένη νεφρική λειτουργία, είτε λόγω με αυξημένη σύνθεση από τον πλακούντα (Kristensen et al. 2007). Η κυστατίνη C προτάθηκε πρόσφατα ως δείκτης πρώτου τριμήνου πρόβλεψης της προεκλαμψίας (Thilaganathan et al.2009). Ωστόσο, η κυστατίνη C πιθανώς δεν είναι κλινικά χρήσιμη ως ένας μόνο δείκτης, αλλά θα μπορούσε να είναι χρήσιμη σε συνδυασμό με άλλους προγνωστικούς δείκτες (Thilaganathan et al. 2010).

A4.6 Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι η ελεύθερη, εξκυτταρική εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Anderson, et al. 2012). Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα mRNA HbF στον ιστό του πλακούντα και αυξημένα επίπεδα ελεύθερη HbF στον αγγειακό αυλό του πλακούντα

σε γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία (Centlow, et al. 2008). Η εξωκυτταρια αιμοσφαιρίνη είναι γενικά τοξική για ιστούς και όργανα (Schaer, et al. 2010). Οι μεταβολίτες της η αίμη και ο ελεύθερος σίδηρος είναι ιδιαίτερα αντιδραστικά μόρια, καθώς παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβη των κυττάρων και των ιστών, οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, και αγγειακή ενδοθηλιακή βλάβη (Anderson, et al. (2016). Η μικροσφαιρίνη (A1M) από την άλλη, είναι μια εξωαγγειακή πρωτεΐνη στο πλάσμα που παρέχει προστασία μέσω της ικανότητάς της να δεσμεύει και να εξουδετερώνει ελεύθερη αίμη και αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου (Olsson, et al.2012). Επιπλέον, η συγκέντρωση του A1M στον ορό έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικά αυξημένη στο μητρικό αίμα, το πρώτο τρίμηνο σε ασθενείς που ακολουθώντας ανέπτυξαν προεκλαμψία (Anderson, et al. 2016). Οι συγκεντρώσεις τους στον ορό ή στο πλάσμα της μητέρας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομοι βιοχημικοί δείκτες (Anderson, et al. 2012).

A4.7 Ελεύθερο Εμβρυικό DNA

Διάφορες μελέτες εξέτασαν τα επίπεδα του cff-DNA σε εγκυμοσύνες που σχετίζονται με προεκλαμψία, προσπαθώντας να εξηγήσουν το ρόλο του στην παθογένεια της νόσου. Σύμφωνα τα αποτελέσματα τα ποσοστά του ελευθέρου εμβρυικού DNA είναι αυξημένα πέντε φορές περισσότερο έναντι του φυσιολογικού (Grill, et al. 2009) Η κύρια πηγή cffDNA είναι κύτταρα του πλακούντα τα οποία αποπίπτουν ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου. Η αυξημένη ποσότητα cffDNA που παρατηρείται σε γυναίκες που αναπτύσσουν προεκλαμψία μπορεί έμμεσα να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση του πλακούντα (Martin et al. 2014). Η αύξηση των επιπέδων του cffDNA ξεκινάει πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου (Grill, et al. 2009). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε υποξία, οξειδωτικό στρες τα οποία, οδηγούν σε αυξημένη απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων του πλακούντα αντανακλώντας την δυσλειτουργία του πλακούντα σε γυναίκες που αναπτύσσουν προεκλαμψία σε πρώιμο στάδιο (Martin et al. 2014). Το cffDNA έχει δείξει κάποια προγνωστική αξία για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας πρώιμης έναρξης ωστόσο, συνδυάζοντας το με αρκετούς δείκτες θα μπορούσαμε να αυξήσουμε ακόμα περισσότερο την ειδικότητα και την ευαισθησία του (Grill, et al. 2009).

A4.8 Visfatin

Η Visfatin, είναι μια νέα αδιποκίνη που εκκρίνεται από λιπώδη ιστό και τα μακροφάγα και εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομοιοστασίας της γλυκόζης. Παρουσιάζει εκδηλώσεις που μιμούνται την ινσουλίνη μέσω της ενεργοποίησης ενός υποδοχέα ινσουλίνης (Zulfikaroglu, et al. 2009). Ενώ μεταβολές στα επίπεδα της στο πλάσμα συνδέονται με διάφορες διαταραχές, όπως τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, την παχυσαρκία, την καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου και τον σακχαρώδη διαβήτη κύησης (Frasshauer, et al. 2007). Εκφράζεται στον πλακούντα, τις εμβρυϊκές μεμβράνες και το μυομήτριο. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, στο δεύτερο ήμισυ των εγκυμοσύνων έχει διαπιστωθεί μια φυσιολογική αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία χαρακτηρίζεται από υπερινσουλιναίμια, δυσανεξία στη γλυκόζη και διαταραχές των λιπιδίων (Mazaki-Toni, et al. 2009). Δεδομένου ότι η δυσλειτουργία της βισφατίνης βρίσκεται στην αντίσταση στην ινσουλίνη, η visfatin μπορεί να είναι ένας παράγοντας προδιάθεσης στην προεκλαμψία (Jian WX, et al. 2006). Ο ρόλος της βισφατίνης στην προεκλαμψία διερευνήθηκε από διάφορες μελέτες (Marseglia, et al. 2015). Έχει βρεθεί ότι εγκυμοσύνες που σχετίζονται με σοβαρή προεκλαμψία παρουσιάζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων της visfatin σε σύγκριση με τις φυσιολογικές. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να υποδηλώνουν ένα πιθανό ρόλο της visfatin στην παθογένεση της σοβαρής προεκλαμψίας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Tavana, et al. 2010). Ωστόσο, μια άλλη μελέτη ανέφερε ότι τα επίπεδα της στο πλάσμα της μητέρας ήταν σημαντικά μειωμένα στις γυναίκες με προεκλαμψία (Hu, et al. 2008). Συνεπώς, απαιτούνται μελέτες μεγάλης κλίμακας για την αξιολόγηση του ρόλου της visfatin ως πιθανού δείκτη για την προεκλαμψία (Manisha, et al. 2014).

A4.9 miRNAs προεκλαμψία

Τα MicroRNAs (miRs ή miRNAs) εκφράζονται ενδογενώς, είναι μικρά μη κωδικοποιούμενα RNAs που ρυθμίζουν την έκφραση διαφορετικών γονιδίων μέσω μετα-μεταγραφικής καταστολής (Czech, et al. (2011). Στην γυναικεία αναπαραγωγική ιατρική ενθαρρύνεται η δυνατότητα χρήσης, miRNA βιοδεικτών για την αξιολόγηση της λειτουργίας, των ωοθηκών και του πλακούντα, την δεκτικότητα της μήτρας, την ανίχνευση εγκυμοσύνης, την εμβρυϊκής ανάπτυξη και εξέλιξη / τυχόν επιπλοκές της εγκυμοσύνης (Cretoiu, et al. (2016). Τα τελευταία χρόνια, τα miRNA και ο ρόλος του στην παθογένεια διαφόρων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης και της προεκλαμψίας αποτελεί φλέγον ερευνητικό θέματα στη βιολογία (Dong-bao Chen, et al. 2013). Πρόσφατες ερευνες έδειξαν ότι τα miRNAs πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της προεκλαμψίας (Munaut, et al. 2016). Καθώς ο

πλακούντας διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει το προφίλ έκφρασης των miRNAs σε ιστούς του πλακούντα (Zhao, et al. 2013). Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί τουλάχιστον 500 διαφορετικά είδη miRNAs που εκφράζεται στον πλακούντα και τους τροφοβλάστες, όμως η βιολογική σημασία των περισσότερων από αυτά είναι άγνωστη (Mouillet, et al. 2015). Μελέτες συγκρίνοντας την έκφραση των miRNA ανάμεσα, σε πλακούντες φυσιολογικής εγκυμοσύνης και σε πλακούντες που σχετίζονταν με ήπια ή σοβαρή προεκλαμψία, κατέληξαν στην αναγνώριση συγκεκριμένων miRNA που εμπλέκονται στην προεκλαμψία (Tsochandaridis, et al. 2015). Το miR-144 παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη έκφραση τόσο σε σοβαρή, όσο και σε ήπια προεκλαμψία σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες. Το miR-144 αποτελεί ένας σημαντικός ρυθμιστής της ισχαιμίας και της υποξίας (Li, et al. 2013). Αντίθετα από το miR-144 το miR-210, έχει βρεθεί ότι αυξάνει σημαντικά στο πλάσμα των γυναικών που πάσχουν από προεκλαμψία. Το miR-210 υπερεκφράζεται σε συνθήκες υποξίας ενώ η έκτοπη έκφραση του ανέστειλε την ικανότητα μετανάστευσης και εισβολής των τροφοβλαστικών κυττάρων. (Zhang, et al. (2012). Φαίνεται ότι το miR-144 και το miR-210 παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας και ότι μπορεί να είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για τη διάγνωση της προεκλαμψίας (Tsochandaridis, et al. 2015).

Επίσης τα miRNA φαίνεται να σχετίζονται και με τον ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης (IUGR), ωστόσο ο ρόλος των miRNAs στο IUGR δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-141 συμβάλλει στον IUGR με τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου (PLAG1). Το επίπεδο έκφρασης του miR-141 στον πλακούντα των κυήσεων με IUGR είναι 3 με 4 φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με φυσιολογικούς πλακούντες. (Tang, et al. 2013). Το miR-424 επίσης έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα σε πλακούντες που σχετίζονταν με IUGR. (Tsochandaridis, et al. 2015).

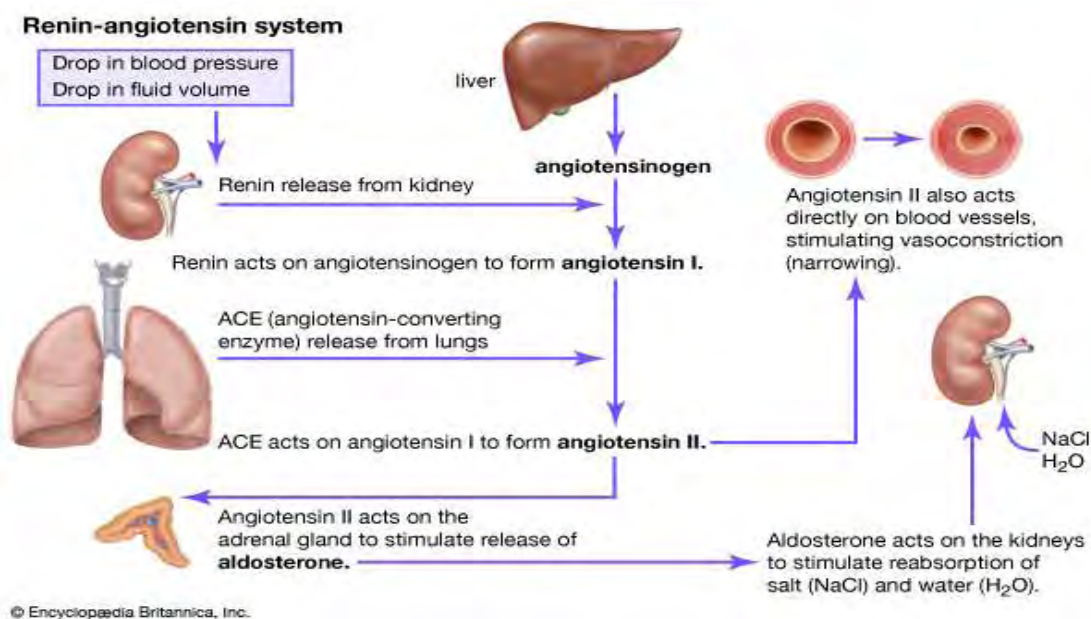
Επιπροσθέτως κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της έκτοπης κύησης και των αυτόματων αποβολών. Το miR-323-3p έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένο σε περιπτώσεις αυτόματων αποβολών και έκτοπης κύησης (Zhao, et al. 2012). Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία θα μπορούσε να αποτελέσει ένα υποψήφιο βιοδείκτη που θα συμβάλει στη διάγνωση της έκτοπης κύησης. Ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να διασαφηνιστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί με τους οποίους τα

miRNAs προκαλούν τις κλινικές εκδηλώσεις της έκτοπης κύησης (Cretoiu, et al. 2016).

Η μελλοντική ερευνά για τη δράση των miRNA θα ενισχύσει την περαιτέρω κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της προεκλαμψίας. Ενώ θα συμβάλει στην προσπάθεια ανάπτυξης νέων βιοδεικτών στην κλινική πράξη (Munaut, et al. 2016).

A.5 ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ-ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) είναι ένα από τα κύρια συστήματα ελέγχου της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των υγρών. Η κύρια βιολογικά δραστική ορμόνη που παράγεται από αυτό το σύστημα, είναι η αγγειοτενσίνη (Ang) II, η οποία παράγεται με διαδοχική διάσπαση πεπτιδίων προερχόμενων από το μόριο υποστρώματος το αγγειοτενσινογόνο (AGT) (Sparks, et al. (2014). Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) είναι πρόδρομος της βιολογικώς δραστικής αγγειοτενσίνης II (Ang II). (Brand, et al. 2000). Η Ang II δεσμεύεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς, προκαλώντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων που επηρεάζουν ουσιαστικά κάθε σύστημα στο σώμα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της καρδιάς, των νεφρών, των αγγείων και του ανοσοποιητικού συστήματος (Sparks, et al. 2014). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) εκκρινόμενο στην κυκλοφορία λειτουργεί τόσο ως ενδοκρινικό όσο και ως παρακρτικό σύστημα στους ιστούς. Ως αγγειακό πεπτίδιο, η αγγειοτενσίνη (Ang) II επιδρά σημαντικά ως ένας σημαντικός ρυθμιστής διατήρησης της ισορροπίας της συστηματικής αρτηριακής πίεσης και της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών των νεφρών (Engeli et al. 2000). Ενώ, ως τοπικά σχηματιζόμενο παρακρικό πεπτίδιο εμπλέκεται στη ρύθμιση της περιφερειακής αιματώσεως και αναδιαμόρφωσης του ιστού, στη ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, και στην ανάπτυξη και τη μεταφορά ιόντων (Komlosi, et al. 2003). Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του RAS μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της υπέρτασης, της καρδιακής υπερτροφίας και της καρδιακής ανεπάρκειας (Sparks, et al. 2014).



Εικόνα 3. Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιεί η αγγειοτενσίνη II.

Τα τελευταία χρόνια η κλασική έννοια του (RAS) υφίσταται σημαντικές εννοιολογικές αλλαγές, μια από αυτές τις εννοιολογικές αλλαγές στην κατανόησή μας για το RAS ήταν η ανακάλυψη τοπικών ή ιστών (RAS) (Paul, et. 2006). Το τοπικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης έχει βρεθεί εκτός από τη καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεφρά, και στα επινεφρίδια, το πάγκρεας, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα, τον λεμφικό και λιπώδη ιστό. Αυτά τα τοπικά συστήματα φαίνεται να ρυθμίζονται ανεξάρτητα από το κυκλοφορικό σύστημα RAS, ωστόσο μπορούν και να αλληλεπιδράσουν με τον τελευταίο. Με αυτό τον τρόπο, τα τοπικά αποτελέσματα του RAS θα μπορούσαν να εμφανιστούν στο κύτταρο που παράγει τα πεπτιδία, σε γειτονικά κύτταρα (παρακρινή λειτουργία) ή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό (ενδοκρινική λειτουργία) (Oliveira, et al. 2008).

Το υπόστρωμα του συστήματος RAS, είναι το αγγειοτασινογόνο, μια α-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία απελευθερώνεται από το ήπαρ. Διασπάται στην κυκλοφορία από τη ρενίνη που εκκρίνεται από νεφρο, για να σχηματιστεί η δεκαπεπτιδική αγγειοτενσίνη (ANG I) (Hall, 2003). Η ANG I στη συνέχεια μετατρέπεται στο οκταπεπτιδίο ANG II από το μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης (ACE), μια συνδεδεμένη με μεμβράνη μεταλλοπρωτεΐνάση, η οποία εκφράζεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κύτταρων στην πνευμονική η αλλιώς μικρή κυκλοφορία (Corvol et al. 1995). Η ANG II, που θεωρείται

το κύριο πεπτίδιο τελεστή του RAS, που επιδρά σε συγκεκριμένους υποδοχείς, για να επάγει αγγειοσυστολή αλληλεπιδρώντας με υποδοχείς ANG σε αγγειακά κύτταρα λείων μυών ή διεγείροντας την απελευθέρωση αλδοστερόνης από τον φλοιό των επινεφριδίων (Hall, 2003).

Πρόσφατα ευρήματα που αύξησαν ακόμα περισσότερο την πολυπλοκότητα του συστήματος. Καθώς έχουν βρεθεί διαφορετικοί υποδοχείς ANG (AT1, AT2, AT4) οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν διαφορετικούς οδούς μεταγωγής σήματος (Paul, et. 2006).

A5.1 Αγγειοτενσινογόνο

Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Wu , et al. 2011). Το γονίδιο AGT σε ανθρώπους και τρωκτικά κλωνοποιήθηκε, χαρτογραφήθηκε και χαρακτηρίστηκε τη δεκαετία του 1980. (Ohkubo, et al. 1983). Το AGT είναι γονίδιο ενός αντιγράφου, και βρίσκεται μακρύ βραχίονα στο χρωμόσωμα 1(1q42.2) (Wu , et al. 2011). Παράγεται στο ήπαρ καθώς και σε άλλους ιστούς (συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, των αγγείων, των νεφρών και του λιπώδους ιστού). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η ανεξάρτητη ρύθμιση των επιπέδων AGT σε μεμονωμένα τμήματα ιστού, το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει τη βάση τοπικού ή ιστικού RAS που λειτουργεί ανεξάρτητα από το κυκλοφορικό RAS (Campbell, et al. 1986). Ενώ το μεγαλύτερο μέρος του AGT mRNA βρίσκεται στο ενήλικο ήπαρ, σε εμβρυϊκό στάδιο μπορεί να υπάρχει στους λιπώδεις ιστούς, στον εγκέφαλο και στα νεφρά. Μάλιστα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η παραγωγή AGT αυξάνεται σημαντικά μετά τη γέννηση και φτάνοντας σε επίπεδο ενήλικου εντός 24 ωρών. (Gomez, et al. 1988). Ο χρόνος ημιζωής του AGT στο πλάσμα από τις μελέτες που έγιναν με τη χρήση ιωδιούχου ιχνηθέτη εκτιμάται ότι είναι 5 ώρες (Hilgenfeldt. 1988).

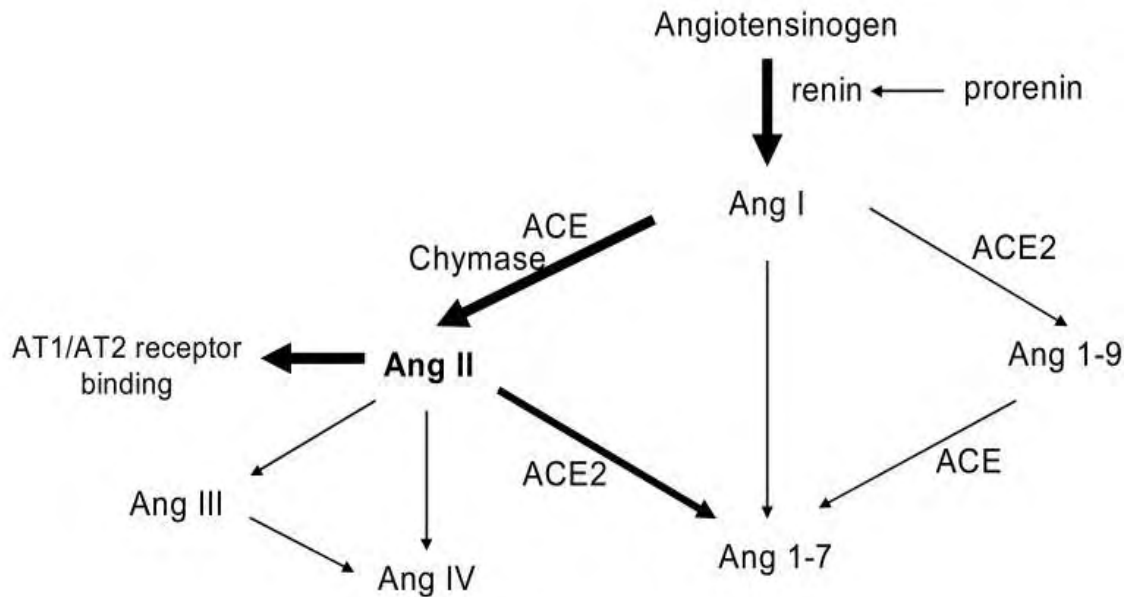
Στη κυκλοφορία απαντάται ως αδρανές βιολογικό πεπτίδιο, ωστόσο μέσω της δράσης της ρενίνης, μετατρέπεται σε Ang I, το πρόδρομο πεπτίδιο της κλασικής οδού διάσπασης του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης (Weber, et al. 2001). Υπάρχουν αδιαμφισβήτητα στοιχεία ότι η νεφρική ρενίνη εκκρίνεται στο πλάσμα για να διασπάσει την AGT που απελευθερώνεται από το ήπαρ. Επομένως, αυτό αποτελεί μια συστηματική οδός για τη δημιουργία πεπτιδίων αγγειοτενσίνης (Danser. 2003). Έτσι το αγγειοτενσινογόνο (AGT) διασπά ένα πεπτίδιο 10 αμινοξέων από το N-τελικό ακρο της αγγειοτενσίνης I (Ang I), το οποίο ακολούθως διασπάται από ενζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE) για να σχηματίσει αγγειοτενσίνη Ang II, το

κύριο βιολογικά ενεργό πεπτιδίο που παράγεται από το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης (RAS) (Wu , et al. 2011).

Γενικά είναι αποδεκτό ότι η κυρίαρχη ρύθμιση της AGT συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο, αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις μετα-μεταγραφικής ρύθμισης. Έχει αποδειχθεί ότι η AngII ενισχύει τη σταθερότητα του mRNA της AGT και ασκεί θετική ανατροφοδότηση του μηχανισμού παραγωγή πρωτεΐνης AGT. (Klett, et al. 1988). Επίσης η AngII ρυθμίζει την αφθονία του mRNA του AGT σε ηπατοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης πυρηνικού παράγοντα-kappaB (Brasier, et al. 2000) ενώ αυξάνει την πρωτεΐνη AGT πλάσματος μέσω δράση του μεταγωγέα σήματος (Wu , et al. 2011). Επιπροσθέτως τα οιστρογόνα επάγουν μεταγραφή γονιδίου AGT στο ήπαρ (Lynch KR, et al. 1991). Τα επίπεδα AGT στο πλάσμα αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της χορήγησης συνθετικών οιστρογόνων από του στόματος όπως αντισυλληπτικά χάπια (Deschepper. 1994).

Η συσχέτιση του γονιδίου AGT με ανθρώπινες ασθένειες έχει ερευνηθεί κυρίως μέσω της μελέτης των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (Wu , et al. 2011). Ο πολυμορφισμός (M235T) είναι μια παραλλαγή του γονιδίου AGT του ανθρώπου η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση μεθειονίνης αντι για τη θρεονίνη στη θέση 235. Αυτός ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα Agt στο πλάσμα και με ανάπτυξη υπέρτασης (Jeunemaitre, et al. 1992). Εκτός από το M235T, μερικές μελέτες έχουν επίσης αναφέρει ότι το T174M, ένας άλλος πολυμορφισμός στο εξόνιο 2 του γονιδίου AGT, σχετίζεται με παράγοντες κινδύνου ή επικράτηση της στεφανιαίας νόσου (Gardemann, et al. 1999).

Παρόλο που δεν υπάρχουν άμεσα στοιχεία, μελέτες σε ζώα και πειράματα in vitro δείχνουν ότι η AGT μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παχυσαρκία στους ανθρώπους. Οι έρευνες των κοινών πολυμορφισμών AGT έδειξαν σημαντική συσχέτιση του M235T με την παχυσαρκία σε γυναίκες με υπέρταση σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Prat-Larquemin, et al. 2004)



Εικόνα 4 Η Κλασικές και εναλλακτικές οδούς του μετατροπής αγγειοτενσινογόνου σε αγγειοτενσίνη II στο σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης.

A5.2 Υποδοχέας αγγειοτενσίνης (AT1R)

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα AT1 εντοπίζεται στη ζώνη q22 στο χρωμόσωμα 3 (Curnow, et al.1992) Οι βιολογικές δράσεις της Ang II επάγονται από υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας που ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των 7 διαμεμβρανικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς της αγγειοτενσίνης μπορούν να χωριστούν σε δύο φαρμακολογικές κατηγορίες AT1 και AT2 (Timmermans, et al. 1993). Μελέτες με ειδικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές έδειξαν ότι οι υποδοχείς AT1 μεσολαβούν στις περισσότερες δράσεις του RAS συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της σπειραματικής ανατροφοδότησης των σωληναρίων, της διέγερσης της επαναρρόφησης του νατρίου, της απελευθέρωσης αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια της σπειραματικής οδού, της συστολής των αγγειακών λείων μυών και της διέγερσης των αισθητήρων δίψας του υποθαλάμου (Crowley, et al. 2004). Οι υποδοχείς AT1 ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συνδεδεμένες με Gαq που περιλαμβάνουν φωσφολιπάση C, τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) και αυξήσεις στο ενδοκυτταρικό Ca²⁺ (Gasparo, et al. 2000). Ο υποδοχέας AT1 έχει συνδεθεί με την κινάση Janus μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή μεταγραφικής δραστηριότητας, καθώς επίσης με εξαρτώμενες από β-αρρεστίνη οδούς μεταγωγής σήματος που συνδέονται με εξωκυττάρια κινάσης ενεργοποίησης (Shenoy, et al. 2005). Άλλες

μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας AT1 έχει την ικανότητα να διεγείρει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Eguchi, et al. 1998). Αυτή η οδός μπορεί να συμβάλει στη χρόνια νεφρική βλάβη και στην υπερτροφία των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων (Lautrette, et al. 2005).

Μελέτες που έχουν γίνει σε τρωκτικά έδειξαν ότι υπάρχουν δύο ισόμορφες υποδοχέα AT1, AT1A και AT1B. (Crowley, et al. 2004). Ο υποδοχέας AT1A ποντικού θεωρείται ότι είναι το πλησιέστερο ομόλογο σε αυτόν τον απλό ανθρώπινο υποδοχέα. Τα πειράματα που χρησιμοποιούν τη σήμανση γονιδίων έχουν δώσει πληροφορίες για τις διακριτές λειτουργίες των δύο γονιδίων του υποδοχέα AT1 (Sparks, et al. 2014). Οι υποδοχείς AT1A έχουν κυρίαρχο ρόλο στον προσδιορισμό της στάθμης της αρτηριακής πίεσης και στη διαμεσολάβηση των αγγειοσυσταλτικών αποκρίσεων. Ο φαινότυπος της σημαντικά μειωμένης πίεσης αίματος και της αυξημένης ευαισθησίας του νατρίου σε ποντίκια που στερούνται του υποδοχέα AT1A υποδεικνύουν τη σημασία του στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (Ito, et al. 1995). Η υπερέκφραση του υποδοχέα AT1A σε πειράματα τιποδοότησης γονιδίων οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της αρτηριακής πίεσης η οποία είναι ανάλογη με τον αριθμό των γονιδιακών αντίγραφων (Kim, et al. (1995). Ενώ η ιδιόσυστατη ενεργοποίηση του υποδοχέα AT1A οδηγεί σε υπέρταση και καρδιακή και νεφρική ίνωση (Billet, et al. 2007).

Οι υποδοχείς AT1A εκφράζονται σε όλα τα συστήματα βασικών οργάνων που εμπλέκονται στο συντονισμό του επιπέδου της πίεσης του αίματος, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού, των αγγείων, των επινεφριδίων, της καρδιάς και των κεντρικών και περιφερικών νευρικών συστημάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μελέτης που έγινε σε ποντίκια φαίνεται ότι οι υποδοχείς AT1 εντός και εκτός νεφρών δρουν ταυτόχρονα για τη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης, οι υποδοχείς AT1 με τη δράση τους μεσολαβούν στην άμεση διέγερση επαναρρόφησης νατρίου από νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης και στη διέγερση της παραγωγής αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια. (Crowley, et al. 2005).

Οι υποδοχείς AT1 εκφράζονται ευρέως σε αγγειακούς ιστούς και όταν ενεργοποιούνται από Ang II προκαλούν ισχυρή αγγειοσυστολή. Η διέγερση των υποδοχέων AT1 στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων ξεκινά έναν καταρράκτη σηματοδότησης που περιλαμβάνει αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} και μεταβολές στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας συστολή με επακόλουθη αύξηση της αγγειακής αντίστασης (Griendling et al. 1997). Σύμφωνα με μελέτες αυτή η

απόκριση απουσιάζει σε ποντίκια με ανεπάρκεια στις ισομορφές του υποδοχέα AT1A και στο AT1B, επιβεβαιώνοντας τη σημασία των AT1 υποδοχέων σε αυτή την απόκριση (Oliverio, et al. 1998).

Εκτός του νεφρικού ιστού, ο ρόλος των αγγειακών υποδοχέων AT1 στην προαγωγή της άμεσης αγγειακής βλάβης είναι πολύπλοκος. Μαζί με τις επιδράσεις τους στον αγγειακό τόνο, οι υποδοχείς AT1 μπορούν επίσης να διεγείρουν την ανάπτυξη και την υπερτροφία των λειών μυϊκών κύτταρων (Geisterfer, et al. 1988) συμβάλλοντας έτσι άμεσα στην αγγειακή αναδιαμόρφωση στην υπέρταση (Sparks, et al. 2014). Έχει προταθεί ότι οι μη αιμοδυναμικές δράσεις των υποδοχέων AT1, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης δημιουργίας αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), μπορούν να προάγουν αλλαγές στην αγγειακή δομή που προάγουν την ανάπτυξη της υπέρτασης (Intengan, et al. 2001). Επιπροσθετως οι αναστολές των υποδοχέων αγγειοτενσίνης μεταβάλλουν την αγγειακή αναδιαμόρφωση σε ασθενείς με υπέρταση υποδηλώνοντας τον άμεσο ρόλο των αγγειακών υποδοχέων AT1 σε αυτή τη διαδικασία (Schiffrin, et al. 2000).

Τα κέντρα καρδιαγγειακού ελέγχου του κεντρικού νευρικού συστήματος έχουν ισχυρή ικανότητα να επηρεάζουν την αρτηριακή πίεση και την ομοιόσταση των υγρών μέσω της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Στο εσωτερικό του ΚΝΣ, οι υποδοχείς AT1A μεσολαβούν στις συστημικές επιδράσεις του Ang II, ενώ η ενεργοποίηση των υποδοχέων AT1B διεγείρει το αίσθημα της δίψας και ρυθμίζοντας έτσι την ισορροπία του νερού μέσω ενός κεντρικού νευρογενούς μηχανισμού (Davisson, et al. 2000). Ενώ η στοχευμένη έκφραση και / ή η διέγερση των υποδοχέων AT1A απευθείας εντός του φυλλικού κοιλιακού μυελού μπορεί να αυξήσει την αρτηριακή πίεση ανεξάρτητα από άλλους συστηματικούς ή νεφρούς υποδοχείς AT1 (Allen, et al. 2006)

Η Ang II προκαλεί βλάβη στην καρδιά και στους νεφρούς εν μέρει με διέγερση φλεγμονωδών αποκρίσεων (Muller et al. 2000). Επιπλέον η ενεργοποίηση πληθυσμών T λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της χρόνιας έγχυσης Ang II έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη χρόνια υπερτασική ανταπόκριση (Barhoumi, et al. 2011). Αν και η Ang II μπορεί να αυξήσει άμεσα τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων *in vitro* (Hoch, et al. 2009), πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει δυνητικά ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις των υποδοχέων AT1 σε μονοκύτταρα στη ρύθμιση της υπέρτασης (Crowley, et al. 2011). Ωστόσο, το αν η Ang II ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της άμεσης διέγερσης των υποδοχέων AT1 στα

φλεγμονώδη κύτταρα παραμένει αμφιλεγόμενο. Οι εναλλακτικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η Ang II προάγει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μπορεί να σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα AT 1 στο ΚΝΣ ή στο ενδοθήλιο. (Henke, et al. 2007).

Στο αναπαραγωγικό σύστημα, τόσο ο Ang II όσο και οι τύποι υποδοχέα AT1 και AT2 του βρίσκονται στο ενδομήτριο και παρουσιάζουν κυκλικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου με μέγιστη μεταβολή την πρώιμη εκκριτική φάση (Ahmed et al., 1995). Οι υποδοχείς AT1 εκφράζονται στους αδένες και τα αιμοφόρα αγγεία του ενδομητρίου και μπορούν να συμμετέχουν στη ρύθμιση της αγγειακής αγγειακής μήτρας και στην αναγέννηση του ενδομητρίου μετά την εμμηνόρροια. Επίσης ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει τον υποδοχέα AT1 και όλα τα άλλα συστατικά του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Ενώ οι υποδοχείς είναι παρόντες καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης σε συνκυτιοφοβλάστη και κυτταροτρόφοβλαστη, καθώς επίσης και στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του εμβρύου (Cooper et al., 1999). Τα μεταγραφήματα mRNA του υποδοχέα AT1 και η πρωτεΐνη υποδοχέα αυξάνουν σταδιακά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και φθάνουν στο μέγιστο επίπεδο τους στον όρο πλακούντα (Petit et al., 1996).

A6. AGT – AGT1R & ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) είναι σημαντικό για τη ρύθμιση των καρδιαγγειακών και νεφρικών αλλαγών που εμφανίζονται στην εγκυμοσύνη. Αρκετές μελέτες έχουν εμπλέξει το RAS στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Εύλογα λοιπόν τα γονίδια του RAS θεωρούνται ύποπτα για την εμφάνιση προεκλαμψίας (Williams, et al. 2011). Όσον αφορά το τις αλλαγές που συμβαίνουν στο τοπικό μητροπλακουντιακό RAS, γυναικών που σχετίζονται με προεκλαμψία οι απόψεις δίστανται. Μια μελέτη ισχυρίστηκε ότι η υπερβολική έκφραση του υποδοχέα AT1R στο φθαρτό είναι η μόνη μεταβολή που παρατηρείται σε γυναίκες με προεκλαμψία χωρίς οποιαδήποτε αύξηση στην παραγωγή ρενίνης στο φθαρτό των ασθενών Herse, et al. (2007). Αντίθετα μια άλλη έδειξε αύξηση του επιπέδου της ρενίνης στο φθαρτό προεκλαμπτικών γυναικών (Shah, et al. 2000).

Στην προεκλαμψία η μειωμένη ροή αίματος της μητέρας μπορεί να σχετίζεται με τα μεταγενέστερα συμβάντα σηματοδότησης του πεπτιδίου της αγγειοτενσίνης II του RAS. Οι δύο κύριοι υποδοχείς που μεσολαβούν στις δράσεις της αγγειοτενσίνης II είναι ο AT1R και ο AT2R. Η ισορροπία μεταξύ του AT1R και του AT2R είναι σημαντική στη διαδικασία διαμόρφωσης του πλακούντα καθώς είναι ιδιαίτερα

χρήσιμη τόσο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όσο και για την απόπτωση. (Alfakih, K., et al., 2005). Τόσο το AT1R όσο και το AT2R εμπλέκονται στον έλεγχο της υπέρτασης. Οι πολυμορφισμοί των υποδοχέων που σχετίζονται με την προεκλαμψία είναι οι εξής AT1R 1166C και AT2R -1332 G. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σημαντικός κίνδυνος πρόκλησης ήπιας προεκλαμψίας παρουσία αμφότερων των αλληλόμορφων των AT1R 1166C και AT2R -1332 G. (Rahimi et al. 2014). Οι μεταβολές στην ισορροπία των δυο υποδοχέων με συνακόλουθες μεταβολές και στον αιμοδυναμικό έλεγχο της αρτηριακής πίεσης πιθανόν ευθύνονται για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Rahimi et al. 2014).

Το AGT είναι ένας από τους βασικούς τελεστές στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της προεκλαμψίας παραμένει ασαφής, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η AGT διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξή της. (Shanshan, et al. 2012). Δύο από τους σημαντικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου AGT που πιθανώς σχετίζονται με προεκλαμψία είναι το Met235Thr και Thr174Met και οι δύο βρίσκονται στο εξόνιο 2 στο χρωμόσωμα 1 (Levesque, et al. 2004). Αναλυτικότερα, μία παραλλαγή του γονιδίου AGT του ανθρώπου που έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση μεθειονίνης αντί της θρεονίνης στη θέση 235 (M235T) έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα AGT στο πλάσμα και με ανάπτυξη υπέρτασης (Jeunemaitre, et al. 1992). Επιπλέον η έκφραση AGT 235T ήταν αυξημένη στις σπειροειδείς αρτηρίες του φθαρτού. Ενώ το αλληλόμορφο T έχει συσχετιστεί με μη φυσιολογική αναμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας επαγόμενη από, εγκυμοσύνη που προκάλεσε αθηρωματικές αλλοιώσεις οι οποίες προωθούν ένα "καταρράκτη" γεγονότων που οδηγούν στην εμφάνιση προεκλαμψίας (Morgan, et al. 1997). Επίσης, μια μελέτη έδειξε ότι οι μεταλλαγμένοι γονότυποι AGT Met235Thr, AGT Thr174Met σχετίζονται πρόωρο τοκετό και το χαμηλό βάρος γέννησης. (Procopciuc, et al. 2011).

Οι Procopciuc et al, πρώτοι ανέλυσαν την αλληλεπίδραση επτά γονότυπων RAS μητέρας και νεογέννητου καθώς επίσης και τη σύνδεσή τους με τον κίνδυνο προεκλαμψίας. Έδειξαν ότι ανεξάρτητα από τον μητρικό γονότυπο, οι νεογνικοί πολυμορφισμοί Thr174Met AGT και A1166C AT1R αντίστοιχα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας κατά 1,53 και 1,22 φορές. Μάλιστα ο κίνδυνος αύξανε σημαντικά εάν τόσο η μητέρα όσο και το νεογέννητο υπέφεραν από έναν από τους πολυμορφισμούς Met235Th AGT, I / D ACE, A1166C AT1R και 83A / G REN. Επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι τα μεταλλαγμένα γονίδια RAS του νεογνού και της μητέρας αλληλεπιδρούν, συμβάλλοντας σημαντικά στην παθογένεση

της προεκλαμψίας στις μητέρες καθώς και στον ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης.
(Procopciuc et al., 2011)

A7. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η καταγραφή πολυμορφισμών του γονιδίου της αγγειοτενσίνης AGT M235T και του υποδοχέα της AGT1R A1166C αναγνωρισμένης κλινικής αξίας σε ομάδα γυναικών από την Κεντρική Ελλάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκαν 26 γυναίκες που εμφάνισαν συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και / η διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg και ποσότητα πρωτεΐνης > 300 mg σε ουρα εικοσιτετράωρου πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και 26 γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη ως ομάδα έλεγχου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β :

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

- Πρωτεΐνάση K, QIAGEN
- Διάλυμα λύσης AL, QIAGEN
- Αιθανόλη 100%
- Διάλυμα έκλυσης AW1, QIAGEN
- Διάλυμα έκλυσης AW2, QIAGEN
- Διάλυμα έκλυσης και επαναδιάλυσης του DNA AE, QIAGEN
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (100mM Tris-βορικό, 2mM Na₂ EDTA), gibco®
- Αγαρόζη UltraPure™ Agarose, Invitrogen
- DNA ladder 50bp (DNA "μαρτηρας"), New England Biolabs
- HotStartTaq® Master Mix (Taq Πολυμεράση), QIAGEN
- Εκκινήτες για τα γονίδια AGT & AGT1 R (Forward & Reverse), Invitrogen
- RNAase free H₂O, QIAGEN

B1.2 Χρωστικές Ουσίες

- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/mL, Invitrogen
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/15% Ficoll Type 400 σε ddH₂O), QIAGEN & New England Biolabs

B1.3 Όργανα – Συσκευές

- Συσκευή Voltex, VELP SCIENTIFICA
- Υδατόλουτρο BIOLine
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5415 R
- Ηλεκτρονικός ζυγός, DHAUS
- Αποστακτήρας νερού, Heal Force®
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης, Thermo EC
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με ενσωματωμένη κάμερα OVItec
- Θερμικός κυκλοποιήτης PCR,PCT 200 MJ RESEARCH
- Μικροπιπέτες διαφόρων όγκων (τυπου Gilson)

B1.4 Αναλώσιμα

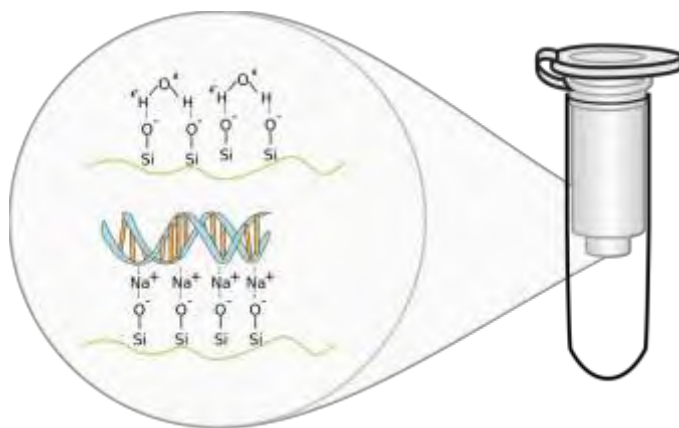
- Σωληνάρια eppendorf των 1,5mL & 0,2mL
- QIAamp Mini spin columns & σωληνάρια συλλογής των 2mL

- Ρύγχη για πιπέτες τύπου Gilson
- Σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό ADTA

B2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα με QIAamp Mini Kit (QIAGEN)

Η μέθοδος βασίζεται στη χρησιμοποίηση στηλών που φέρουν φίλτρα/ μεμβράνες από πηκτή σιλικόνη (silica membrane gel), η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή σε πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την DNA πολυμερώς κατά τη αντίδραση PCR. Αρχικά γίνεται κατακρήμνιση του DNA σε υδατικό διάλυμα με την προσθήκη αιθανόλης υπό την παρουσία αλάτων (Birnboim et al. 1979) δημιουργώντας ένα διάλυμα δέσμευσης (binding solution), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται σε στήλη (spin column) και φυγοκεντρείται. Με την φυγοκέντρωση το διάλυμα δέσμευσης περνά μέσα από τη στήλη όπου εάν το pH και η συγκέντρωση αλάτων είναι βέλτιστες, τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται στη μεμβράνη σιλικόνης. Με διαδοχικές εκπλύσεις απομακρύνονται όλες οι πιθανές προσμίξεις, προκειμένου στη στήλη να μείνει μόνο το DNA, το οποίο με την προσθήκη ενός διαλύματος έκλουσης και φυγοκέντρωση, θα αποδεσμευτεί από την μεμβράνη και θα συλλεχθεί στο σωληνάριο (Matson, 2008, Kumar, 2006).

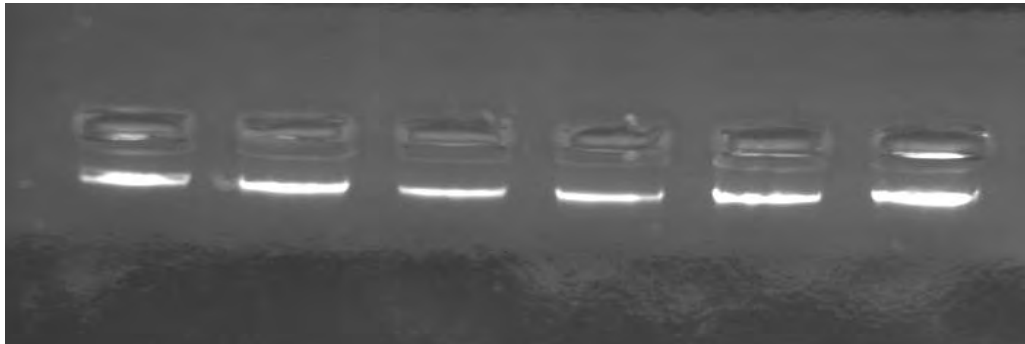


Εικόνα 5 . Στη μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού και μόρια DNA παρουσία διαλύματος υψηλής αλατότητας (Wikimedia Commons).

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής :

- Μετάγγιση 200 μ L αίματος από σωληνάριο αιμοληψίας σε Eppendorf
- Προσθήκη 20 μ L πρωτεΐνασης K.
- Προσθήκη 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης AL.
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 56° C για 15 min

- Προσθήκη 200 μL αιθανόλη 100%
- Επώαση σε υδατολουτρο στους 70°C για 15 min
- Μετάγγιση του διαλύματος σε στήλη (QIAamp Mini spin column) μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2 μL .
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος εκπλυσης AW2
- Φυγοκεντρηση στις 1200 rpm για 3 min
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL
- Φυγοκεντρηση στις 12000 rpm για 1 min
- Μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL
- Προσθήκη 60 – 70 μL διαλύματος εκλουσης και επαναδιαλυσης του DNA AE.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 3 min
- Μετάγγιση του DNA από το σωληνάριο συλλογής των 2 mL σε καθαρό eppendorf 1,5 mL το οποίο φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από απόμικρωση DNA.

B2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων, DNA με βάση το μέγεθος τους. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικές οπές (wells) στο πήκτωμα αγαρόζης και υπό την επίδραση σταθερού ηλεκτρικού πεδίου κινούνται διάμεσου του πηκτώματος προς το θετικό ηλεκτρόδιο, καθώς το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο.

[41]

Τα μεγαλύτερα τμήματα μεταναστεύουν βραδύτερα και το αντίστροφο και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός (Alberts et al. 2004)

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα :

Αρχικά για την παρασκευή 1,5% πηκτώματος αγαρόζης:

- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 1,5g αγαρόζης και 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE
- Γίνεται ανακίνηση και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5min, μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει)
- Προστίθεται έπειτα βρωμιούχο αιθίδιο 5 μL από διάλυμα με συγκέντρωση 10mg/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φθορίζουσα χρωστική που περιβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και βοηθά στον άμεσο προσδιορισμό της θέσης του DNA στο πήκτωμα με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στους 60° C το διάλυμα μεταφέρεται στη συσκευή αγαρόζης, αφού προηγουμένως έχει τοποθετηθεί κάθετα στην κατάλληλη θέση και απόσταση 0.5 mm από την επιφάνεια της πλάκας η "χτένας" που θα δημιουργήσει θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη.
- Όταν πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται προσεκτικά η χτένα και το πήκτωμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.
- Στη συνέχεια για την ηλεκτροφόρηση του DNA :
- Το πήκτωμα αγαρόζης βυθίζεται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πηκτώματος (1xTBE).
- Γίνεται ανάμιξη 5 μL κάθε δείγματος με 3μL από το διάλυμα χρωστικής μπλε της βρομοφαινόλης και φόρτωση των δειγμάτων στις θέσεις του πηκτώματος. Αν το δείγμα είναι προϊόν PCR, φορτώνεται και μια θέση με 4 μL DNA μάρτυρα (φέρει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους) και 3 μL από το διάλυμα χρωστικής, προκειμένου να γίνει έμμεσος προσδιορισμός του μεγέθους του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (15min συνήθως), με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός γίνεται παρατήρηση της θέσης των τμημάτων DNA στο πήκτωμα και ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος σε ειδική συσκευή με ενσωματωμένη κάμερα.



Εικόνα 7 Συσκευή ηλεκτροφόρισης με πήκτωμα αγαρόζης

B2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR (Mullis *et al.*, 1987) βασίζεται στον *in vitro* ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές – ολιγονουκλεοτίδια (primers). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι Ταq πολυμεράση, μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: αποδιάταξη του εκμαγείου - DNA (denaturation), σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες (primer annealing), επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'- 3' (extension). Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από η κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2ⁿ δίκλινα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που οριοθετείται από τους εκκινητές (Σάτρα, 2015).

Για τη σύνθεση με PCR των περιοχών που περιλαμβάνουν τους υπό διερεύνηση πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών

5'-GATGCGCACAAGGTCCTG-3' και 5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC-3' για την σύνθεση κωδικής περιοχής μήκους 303 bp του γονιδίου AGT

και το ζεύγος 5'- TTG AGG TTG AGT GAC ATG TTC GA -3' και 5'- CGG TTC AGT CCA CAT AAT GCA -3' για την σύνθεση περιοχής μήκους 151bp του γονοδίου AGT1R

Τα πρωτόκολλα που ακολουθηθήκαν είναι:

B2.3.1 Πρωτόκολλο PCR για AGT με HOTSTART

Σε κάθε eppendorf 0.2 ml προσθέτουμε 7μl DNA, 23μl MIX με τελικό όγκο 30μl.

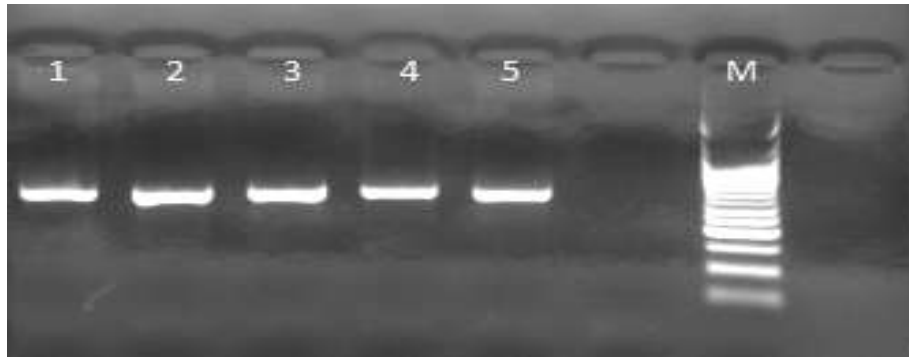
Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

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

Το πρόγραμμα του PCR (ANG) είναι το ακόλουθο:

- 94°C 5min
- **40 cycles of:** 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min
- 72°C 10min
- 18°C for ever

Τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μήκος 303 bp



Εικόνα 8 Προϊόν PCR για γονίδιο ANG, μήκους 303 bp.

B2.3.2. Πρωτόκολλο PCR για AGT 1 R με HOTSTART

Σε κάθε erpendorf 0.2 ml προσθέτουμε 7μl DNA, 23μl MIX με τελικό όγκο 30μl.

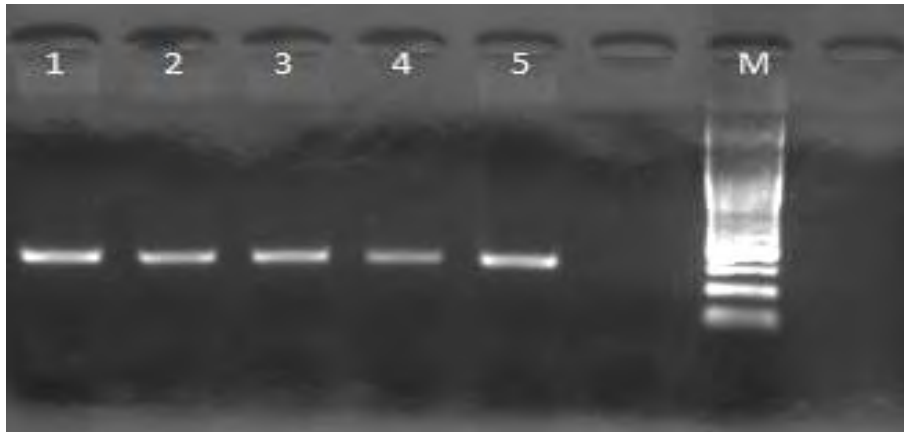
Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

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

Το πρόγραμμα του PCR (AGT1 R) είναι το ακολουθο:

- 94°C 5min
- **40 cycles of:** 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min
- 72°C 10min
- 18°C for ever

Τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μήκος 151bp



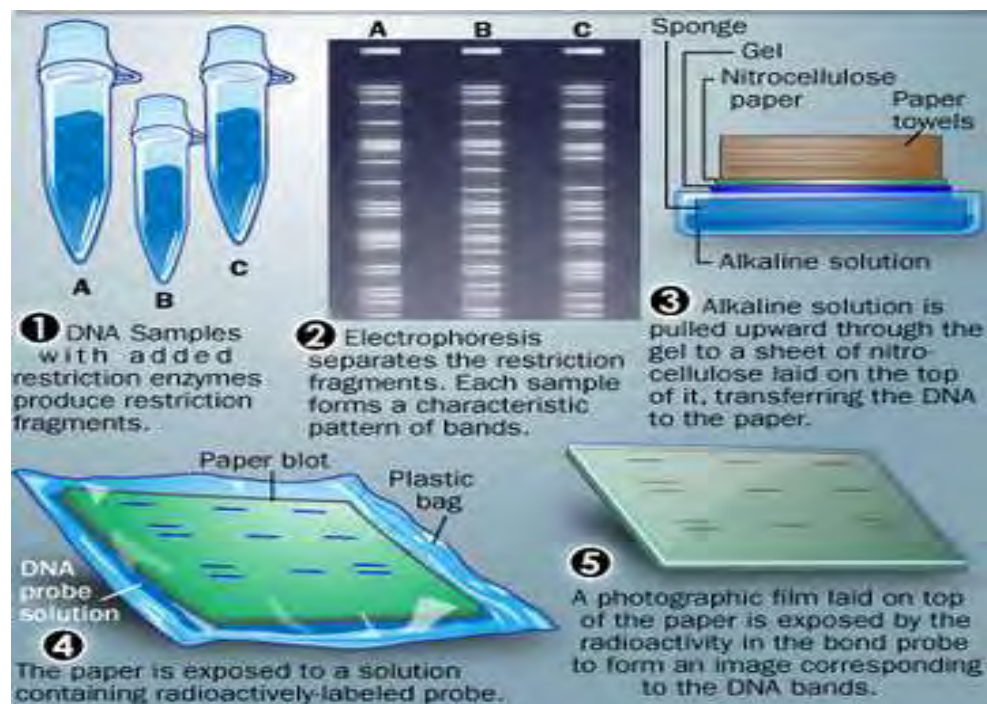
Εικόνα 9 Προϊόν PCR για γονίδιο AGT1R , μήκους 151 bp.

B2.4.Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν ένα βασικό εργαλείο της μοριακής βιολογίας. Καθώς έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν σύντομες ακολουθίες DNA και να διασπούν με ειδικό τρόπο την διπλή έλικα του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Η ανακάλυψη των ενδονουκλεασών άρχισε τη δεκαετία του 1960 και οδήγησε στην εμπορική διαθεσιμότητα αυτών στις αρχές της δεκαετίας του '70. Μέχρι και σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περίπου 3500 ένζυμα που αναγνωρίζουν 259 διαφορετικές ακολουθίες DNA. Ανευρίσκονται κυρίως σε βακτηριακά γονοδιώματα, ωστόσο έχουν απομονωθεί και από ιούς, τα αρχαιοβακτήρια και τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού ονομάστηκαν έτσι λόγω της ικανότητάς τους να περιορίζουν την ανάπτυξη του φάγου σε ένα βακτηριακό κύτταρο ξενιστή διασπώντας εισβάλλον DNA. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να λειτουργούν ως συστήματα βακτηριακής προστασίας. (Williams, 2003). Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την κοπή DNA σε θραύσματα με τρόπους που διευκολύνουν τη μελέτη και, ειδικότερα τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό των γονιδίων (Pray, 2008). Οι Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) είναι μια τεχνική όπου το DNA επωάζεται με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού τα οποία κόβουν το DNA όταν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων (κάθε ένζυμο περιορισμού θα κοπεί σε μία μοναδική θέση περιορισμού). Δημιουργείται έτσι ένα αριθμό θραυσμάτων του DNA με διαφορετικά μήκη. Η μεθοδολογία που ακολουθείται, απαιτεί αρχικά ενίσχυση της περιοχής με PCR γύρω από τον πολυμορφισμό ή την μετάλλαξη που θέλουμε να μελετήσουμε. Έπειτα γίνεται πέψη τμήματος των προϊόντων PCR με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, στην οποία η θέση αναγνώρισης της θα βρίσκεται και θα επηρεάζεται από το πολυμορφικό σημείο. Στη συνέχεια το μήκος των θραυσμάτων

[46]

των ακολουθιών προσδιορίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης με ταυτόχρονη χρήση δείκτη τμημάτων με διαφορετικό μέγεθος. Συγκρίνοντας το δείκτη με τις ζώνες των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά την πέψη καθορίζεται αν υπάρχει η μετάλλαξη στο γονίδιο που μελετούμε (Πλαγεράς, 2011).



Εικόνα 10 Ανάλυση DNA με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων

B2.4.1 Πρωτόκολλο για πέψεις AGT

Ενζυμο SfaNI (2000u) : για πολυμορφισμό M235T (rs699, T to C)

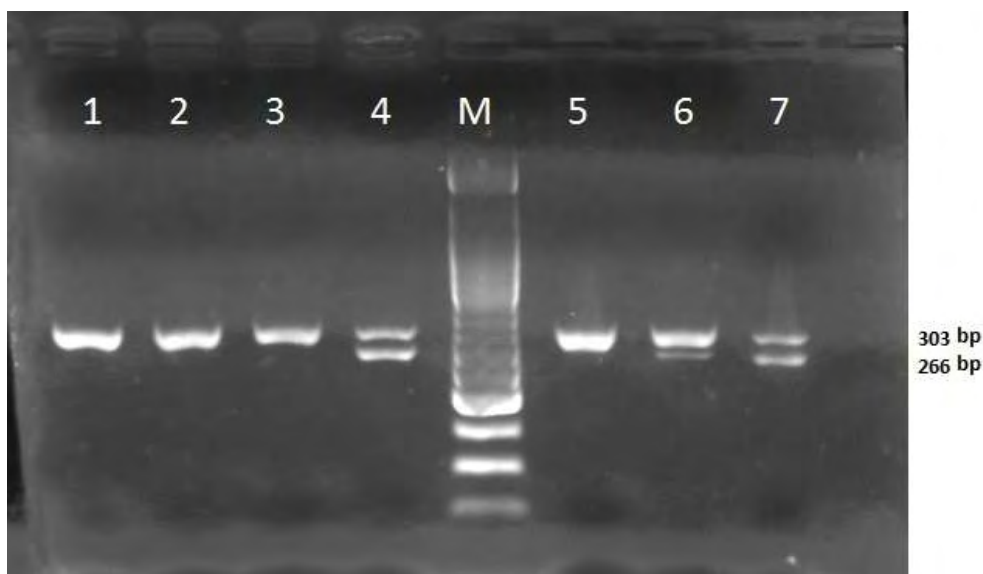
Σε κάθε erpendorf προσθέτουμε 10 μL PCR product και 20 μL από το mix με τελικό όγκο 30μL.

Το mix παρασκευάζεται ως εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανα δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
Ενζυμο	6		
Buffer	3		
H2O	11		

- Επώαση overnight στους 37° C σε υδατόλουτρο
- Τρέχω σε gel 20 μl
- Τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μήκος μια ζωνη266 ή μια ζωνη303 η δυο ζώνες 266bp/303bp

AGT M235T (rs699, T to C)	PCR product 303bp	
Met/Met-TT	0	266bp
Met/Thr-TC	1	266bp/303bp
Thr/Thr-CC	2	303bp



Εικόνα 11 Προϊόν PCR μετά από επώαση με περιοριστικό ένζυμο SfaNI

B2.4.2.Πρωτόκολλο για πέψεις για AGT1 R

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

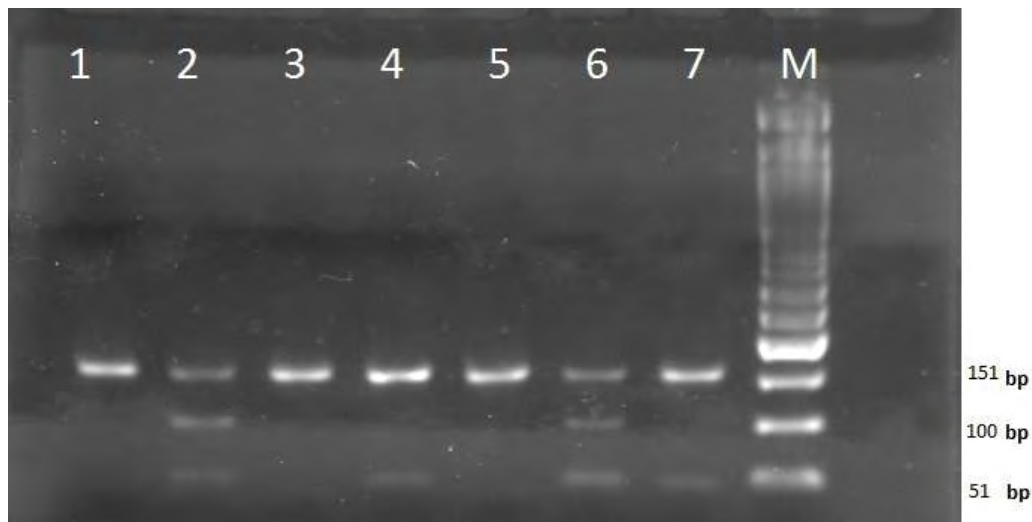
Σε κάθε erpendorf προσθέτουμε 10 μL PCR product και 20 μL από το mix με τελικό όγκο 30μL.

Το mix παρασκευάζεται ως εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανα δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
Ενζυμο	1,5		
Buffer	3		
H2O	15.5		

- Επώαση overnight στους 37° C σε υδατόλουτρο
- Τρέχω σε gel 20 μl
- Τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μια ή μια ζώνη 151bp ή τρεις ζώνες 151bp/100/ 51 bp ή δυο ζώνες 100/ 51bp

AGT1R A1166C (rs 5186 A to C)	PCR product 151bp	
AA	0	151bp
AC	1	151bp/100/ 51
CC	2	100/ 51bp



Εικόνα 12 Προϊόν PCR μετά από επώαση μετά από επώαση με Dde I

B2.5 Μέθοδοι για Στατιστική Ανάλυση και Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα μετά στην δράση των περιοριστικών ένζυμων και οι γονότυποι τόσο της ομάδας έλεγχου όσο και της πειραματικής ομάδας (προεκλαμψία) παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν. Σημειώνεται ότι τοID είναι ο κωδικός αριθμός κάθε δείγματος στο εργαστήριο και στο AGT αντιστοιχεί ο πολυμορφισμός M235T ενώ στο AGT1 R αντιστοιχεί ο πολυμορφισμός A1166C. Οι γονότυποι AGT αντιστοιχούν σε ένα αριθμό που υποδηλώνει τον αντίστοιχο πολυμορφισμό, ο Met/Met-TT αντιστοιχεί στον αριθμό 0, ο Met/Thr-TC αντιστοιχεί στον αριθμό 1 ενώ ο Thr/Thr-CC στον αριθμό 2. Αντίστοιχα οι γονότυποι AGT1R αντιστοιχούν σε έναν αριθμό που υποδηλώνει τον αντίστοιχο πολυμορφισμό, ο A/A αντιστοιχεί στον αριθμό 0, ο AC στον αριθμό 1, ενώ ο CC στον αριθμό 2.

A/A	ID	AGT (SfaNI)	AGT1 R (Dde)
CONTROL GROUP		M235T T/C	A1166C A/C
1	1	1	1
2	2	1	1
3	7	1	0
4	10	1	1
5	11	0	0
6	28	0	0
7	29	1	0
8	30	1	1
9	31	1	1
10	32	1	1
11	33	1	0
12	35	1	1
13	39	1	1
14	40	1	2
15	41a	1	1
16	42	0	0
17	43	1	1
18	44	0	0
19	46	0	1
20	47	0	2
21	48	1	1
22	49	0	0
23	52	0	0
24	54	1	1
25	55	0	1
26	65	0	0

Πίνακας 1 Γονότυποι της ομάδας control ως προς τους πολυμορφισμούς των γονιδίων AGT και AGT1R

A/A	ID	AGT (SfaNI)	AGTI R(Dde)
PREECLAMPSIA	GROUP	M235T T/C	A1166C A/C
1	13	2	1
2	14	1	0
3	15	2	0
4	16	1	1
5	17	1	0
6	18	2	0
7	19	1	2
8	20	1	1
9	21	1	1
10	22	1	0
11	23	1	1
12	24	0	0
13	25	1	0
14	26	1	1
15	27	1	0
16	37	1	0
17	38	2	0
18	45	0	1
19	50	0	0
20	56	0	1
21	57	1	1
22	58	1	0
23	59	0	0
24	63	1	0
25	64	0	1
26	66	1	2

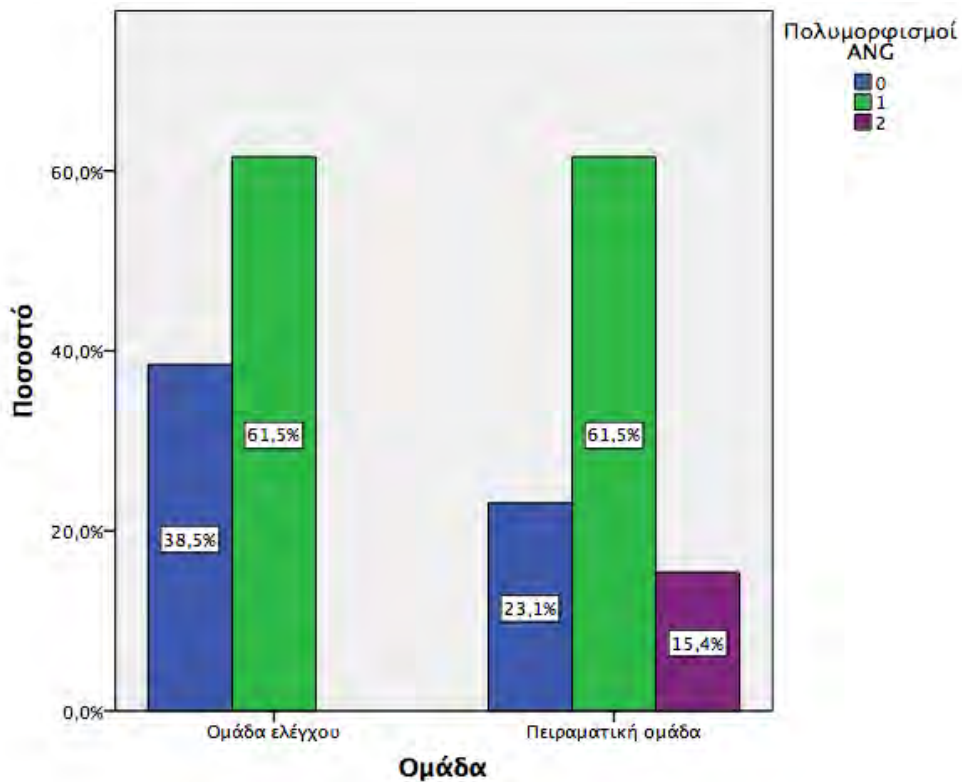
Πίνακας 2 Γονότυποι της πειραματικής ομάδας(προεκλαμψία) ως προς τους πολυμορφισμούς των γονιδίων AGT και AGT1R

Αποτελέσματα για τους δύο πολυμορφισμούς και έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το είδος πολυμορφισμού σε κάθε ομάδα τόσο για το AGT. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 προκύπτει ότι για το AGT τόσο στην ομάδα ελέγχου (n=16, 61.5%) όσο και στην πειραματική ομάδα (προεκλαμψία) (n=16, 61.5%) η πλειοψηφία του δείγματος είχε πολυμορφισμό τύπου 1. Επιπλέον, προκύπτει ότι στην πειραματική ομάδα (προεκλαμψία) ένα μικρό ποσοστό ασθενών (n=4, 15.4%) είχε πολυμορφισμό τύπου 2 ενώ αντίθετα στην ομάδα ελέγχου κανένα άτομο δεν παρουσίαζε αυτού του τύπου πολυμορφισμό. Για να εξετάσουμε κατά πόσο η παρατηρούμενη διαφοροποίηση είναι στατιστικά σημαντική χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 (chi-square test) από όπου και προέκυψε ότι ο τύπος πολυμορφισμού στο AGT είναι ανεξάρτητος από την ομάδα ($\chi^2(2)=5$, $p=0.082>0.05$), γεγονός που οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων που είχε η κάθε ομάδα. Διαγραμματικά η κατανομή του τύπου πολυμορφισμού για το AGT δίνεται στο Γράφημα 1.

		Ομάδα			
		Ομάδα ελέγχου		Πειραματική ομάδα (προεκλαμψία)	
		n	%	n	%
AGT	0	10	38,5%	6	23,1%
	1	16	61,5%	16	61,5%
	2	0	0,0%	4	15,4%

Πίνακας 3. Περιγραφικά αποτελέσματα για AGT στις δύο ομάδες



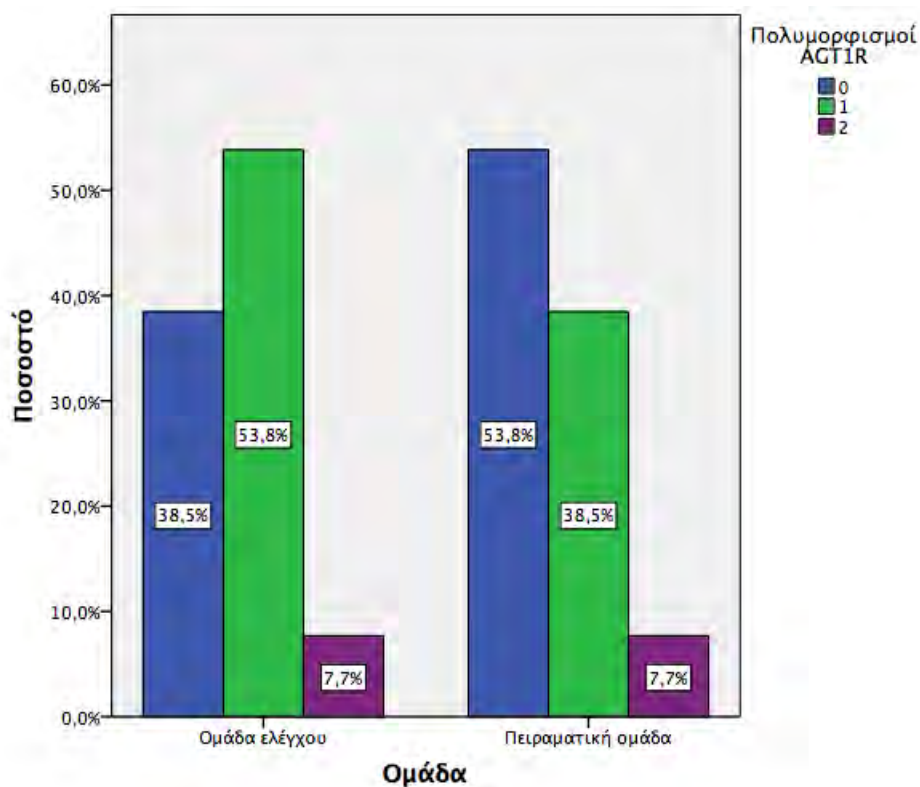
Γράφημα 1. Διαγραμματική απεικόνιση τύπου πολυμορφισμού για το AGT στις δύο ομάδες.

Παρόμοια, από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 προκύπτει ότι για το AGT1R στην ομάδα ελέγχου (n=14, 53.8%) η πλειοψηφία των ατόμων είχε πολυμορφισμό τύπου 1 ενώ στην πειραματική ομάδα (n=14, 53.8%) η πλειοψηφία των ασθενών είχε πολυμορφισμό τύπου 0. Επιπλέον, προκύπτει ότι τόσο στην πειραματική ομάδα (n=2, 7.7%) όσο και στην ομάδα ελέγχου (n=2, 7.7%) ένα μικρό ποσοστό ασθενών είχε πολυμορφισμό τύπου 2. Για να εξετάσουμε κατά πόσο η παρατηρούμενη διαφοροποίηση είναι στατιστικά σημαντική χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 (chi-square test) από όπου και προέκυψε ότι ο τύπος πολυμορφισμού στο AGT1R είναι ανεξάρτητος από την ομάδα ($\chi^2(2)=1.333$, $p=0.513 > 0.05$). Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι τα ευρήματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων για το AGT1R και μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο τύπος πολυμορφισμού για το AGT1R κατανέμεται ομοιόμορφα στις δύο ομάδες.

	AGT1R	Ομάδα			
		Ομάδα ελέγχου		Πειραματική ομάδα (προεκλαμψία)	
		n	%	n	%
	0	10	38,5%	14	53,8%
	1	14	53,8%	10	38,5%
	2	2	7,7%	2	7,7%

Πίνακας 4. Περιγραφικά αποτελέσματα για AGT1R στις δύο ομάδες

Διαγραμματικά η κατανομή του τύπου πολυμορφισμού για το AGT1R δίνεται στο Γράφημα 2.



Γράφημα 2. Διαγραμματική απεικόνιση τύπου πολυμορφισμού για το AGT1R στις δύο ομάδες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ :

ΣΥΖΗΤΗΣΗ -

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) κατέχει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση, των καρδιαγγειακών, και νεφρικών αλλαγών που συμβαίνουν την περίοδο της εγκυμοσύνης. Αρκετές μελέτες έχουν εμπλέξει το RAS στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας καθώς επίσης και τα γονίδια που εμπλέκονται στις δράσεις του (AGT, ACE, AGTR1, AGTR2) (Williams, et al. 2011). Το AGT πρόδρομος της ANG II και ένας από τους βασικούς τελεστές στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης ενώ οι δράσεις της εξυπηρετούνται υποδοχείς AT1 (AGT1R) και AT2 (AGT2R) (Brand, et al. 2000). Οι AT1 μεσολαβούν στις περισσότερες δράσεις του RAS συμπεριλαμβανόμενης της ρύθμισης της σπειραματικής αναδιαμόρφωσης των σωληναρίων προκαλώντας υπερτροφία των λειών μυϊκών κύτταρων συμβάλλοντας έτσι στην αγγειακή αναδιαμόρφωση της υπέρτασης (Sparks, et al. 2014). Η διέγερση της Ang II από την άλλη προκαλεί βλάβη στην καρδιά και στους νεφρούς εν μέρει με διέγερση φλεγμονωδών αποκρίσεων (Muller et al. 2000). Τα μεταγενέστερα γεγονότα σηματοδότησης της αγγειοτενσίνης II του RAS σε γυναίκες με προεκλαμψία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μειωμένης αιματικής ροής της μητέρας. Ενώ μεταβολές στην ισορροπία των δυο υποδοχέων οι οποίες συνεπάγονται και αλλαγές στον αιμοδυναμικό έλεγχο της αρτηριακής πίεσης πιθανόν να συμβάλουν στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Rahimi et al. 2014).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ένα ποσοστό των γυναικών με προεκλαμψία (πειραματική ομάδα) εμφανίζει ένα συγκεκριμένο πολυμορφισμό στο γονίδιο AGT (M235T), ενώ ο πολυμορφισμός αυτός δεν εντοπίζεται καθόλου στην ομάδα έλεγχου. Είναι γεγονός ότι είναι αμφιλεγόμενα τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για το αν τελικά οι πολυμορφισμοί του AGT1R σχετίζονται με την προεκλαμψία. Οι Kusnierska-Urban et al (2015) έδειξαν ότι ο γονότυπος Thr/Thr (CC) του AGT1R αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης της κύησης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με την μελέτη των Bouba et al (2003) οι οποίοι βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού AGT (M235T) και της προεκλαμψίας. Στην ίδια μελέτη εξέτασαν και την αλληλεπίδραση μεταξύ του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) και του πολυμορφισμού AGT (M235T). Διαπίστωσαν μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του AGT και του πολυμορφισμού του γονιδίου ACE σχετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας. Επίσης για να προσδιοριστεί ο γενετικός κίνδυνος στην προεκλαμψία δοκίμασαν την αλληλεπίδραση του γονότυπου CC του γονιδίου AT1R και του γονότυπου TT του γονιδίου AGT. Βρήκαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψία σε

γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο C του γονιδίου AT1R και τον γονότυπο TT του γονιδίου AGT (Bouba, et al. 2003).

Όσον αφορά το γονίδιο AGT1R (A1166C) δεν παρατηρήθηκε κάποια διάφορα μεταξύ των πολυμορφισμών της πειραματικής ομάδας (προεκλαμψία) και της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών σχετικά με τη συσχέτιση του γονιδιακού πολυμορφισμού A1166C (rs5186) του υποδοχέα (AT1R) της αγγειοτασίνης II και του κινδύνου εμφάνισης υπερτασικών διαταραχών της κύησης είναι επίσης αντικρουόμενα. Οι Procorciuc et al, έδειξαν ότι ο A1166C AT1R πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας. Μάλιστα έδειξαν ότι ανεξάρτητα από τον μητρικό γονότυπο, και κάποιοι νεογνικοί πολυμορφισμοί μεταξύ των όποιων και ο A1166C AT1R, σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Procorciuc et al., 2011). Οι Rahimi et al., εμπλουτίζοντας ακόμα περισσότερο τις γνώσεις μας για την προεκλαμψία παρατήρησαν σημαντικό κίνδυνο πρόκλησης ήπιας προεκλαμψίας παρουσία αμφότερων των αλληλομόρφων των AT1R 1166C και AT2R -1332 G. Τονίζοντας ότι οι μεταβολές στην ισορροπία μεταξύ AT1R και AT2R παρουσία των αλληλομόρφων AT1R C και AT2R G έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του αιμοδυναμικού ελέγχου της αρτηριακής πίεσης συμβάλλοντας στον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Rahimi et al.,2014)

Από την άλλη μια πιο πρόσφατη ανασκοπική μελέτη συγκρίνοντας τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τους πολυμορφισμούς AT1R και AT2R υποδεικνύει ότι δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A1166C και των υπερτασικών διαταραχών της κύησης ή της προεκλαμψίας (Li, et al. 2015), γεγονός που επίσης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Οι Procorciuc et al, με βάση την μαιευτική έκβαση της κύησης διαπίστωσαν ότι το μεταλλαγμένο Met235Thr (AGT) και κάποιοι άλλοι πολυμορφισμοί (Thr174Met (AGT), και I/D (ACE)) σχετίζονταν ιδιαίτερα με την ηλικία κύησης και το βάρος γέννησης. Ωστόσο, τα δεδομένα όσον αφορά τη συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών μεταξύ της υπέρτασης και της προεκλαμψία είναι αντικρουόμενα. Οι μελέτες που πραγματοποίησε ο Kauret al. Kobashiet al. και Zafarmand et al. αποκάλυψε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών Met235Thr (AGT) και I/D (ACE) και της υπέρτασης στην προεκλαμψία (Kaur, et al. (2005), (Zafarmand et al.(2008). Ωστόσο οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Bashford et al.

και Galao et al. ανέφερε ασθενή ή καθόλου συσχέτιση των παραπάνω πολυμορφισμών με την προεκλαμψία (Procopciuc et al., 2011).

Βεβαια οι Kusmierska-Urban et al, με πρόσφατη μελέτη τους το 2015 επιβεβαίωσαν ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου AGT M235T και συγκεκριμένα ο γονότυπος CC του πολυμορφισμού αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης της κύησης (Kusmierska-Urban et al. 2015)

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τα εμβρυϊκά γενετικά αποτελέσματα των γονιδίων RAS αναφορικά με τον κίνδυνο εμφάνισης μητρικής προεκλαμψίας. Ο πλακουντας είναι ιστός που λαμβάνεται από το έμβρυο, ο οποίος συμμετέχει στην έκκριση και ρύθμιση των παραγόντων RAS, και είναι πιθανό να συμβάλλει στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Zhang, et al, διερεύνησε της αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών του RAS, μητρικής και εμβρυϊκής προέλευσης σε σχέση με την προεκλαμψία. Συγκρίνοντας επτά εμβρυϊκά γονίδια μεταξύ των όποιων AGT M235T και AT1R A1166C έδειξε ότι συσχετίζονται σημαντικά με την ανάπτυξη προεκλαμψίας. Μάλιστα στην ίδια μελέτη εξέτασαν τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου και κάποιων περιβαλλοντικών παραγόντων αποκαλύπτοντας ότι ένα BMI >24 προ της εγκυμοσύνης ήταν πιθανό να αλληλεπιδράσει με τον AGT M235T και AGT T174M πολυμορφισμό στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Zhang et al. 2017).

Οι γενετικές μελέτες είναι πολύπλοκες, ειδικά όταν πολυσυστηματική ασθένειες, όπως η προεκλαμψία βρίσκονται υπό ανάλυση. Η επιστάση, η τροποποίηση της έκφρασης σε ένα ή περισσότερα γονίδια, πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός γενετικός παράγοντας που συμβάλλει σε σύνθετες ασθένειες, όπως η προεκλαμψία. Παρόλο που η εξέταση των επιστατικών αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητη για την κατανόηση της γενετικής βάσης της προεκλαμψίας, παρουσιάζει σημαντικές στατιστικές προκλήσεις, ιδιαίτερα στην ανάλυση των δεδομένων που αφορούν το γονιδίωμα, λόγω του μεγάλου αριθμού πιθανών αλληλεπιδράσεων. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων, ο κλινικός φαινότυπος των προσβεβλημένων ατόμων επηρεάζεται επίσης από αλληλεπιδράσεις γονιδίων και του περιβάλλοντος. Η έλλειψη πλήρους συμφωνίας για την προεκλαμψία σε πανομοιότυπα δίδυμα αποτελεί σαφή ένδειξη της επίδρασης που μπορούν να παίξουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (κάπνισμα, παχυσαρκία κλπ) στον προσδιορισμό του κλινικού φαινοτύπου. Αυτοί μπορούν να μεταβάλλουν τον ρυθμό μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων, μεταβαλλόντας τον κίνδυνο της νόσου. Επιπλέον θα είναι επωφελείς οι μελέτες να μπορούν να διασαφηνίσουν τη

συμμετοχή και αλληλεπίδραση των γονότυπων της μητέρας και του εμβρύου, στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (Williams, et al. 2011).

Η ταυτοποίηση των γυναικών που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας θα συμβάλει θετικά στην πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική διαχείριση της νόσου. Η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης (πριν από τη 12^η εβδομάδα της κύησης) όπως επίσης και η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου (≥ 1 g / ημέρα) σε γυναίκες υψηλού κίνδυνου μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας. Βέβαια παρά τις πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση της αιτιολογίας της προεκλαμψίας, δεν υπάρχει ακόμη κάποια κλινική εξέταση που να είναι σε θέση να προβλέψει την προεκλαμψία. Η ετερογενής φύση της καθιστά απίθανο ότι ένας μεμονωμένος βιοδείκτης στην αρχή της εγκυμοσύνης θα μπορεί να προβλέψει της γυναίκες που ενδέχεται να αναπτύξουν προεκλαμψία (English, et al.2015).

Έτσι το πεδίο της έρευνας έχει στραφεί στην μελέτη υποψήφιων γονιδίων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα γονίδια εμπλέκονται στην προεκλαμψία θα επιτρέψει τον προσδιορισμό των γυναικών που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο στοχεύοντας έτσι στην εξειδικευμένη προγεννητική φροντίδα αυτής της ομάδας (Williams, et al. 2011).

Είναι αναγκαίο στο μέλλον να πραγματοποιηθούν πολυκεντρικές μελέτες με μεγάλο αριθμό περιπτώσεων. Αυτές οι μελέτες με τη χρήση τελευταίων της τεχνολογιών, όπως η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση και η μαζική παράλληλη αλληλούχιση, θα συμβάλουν στην αναγνώριση των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν σε όλο το γονιδίωμα των γυναικών που ανέπτυξαν προεκλαμψία. Οι μικροσυστοιχίες με μεγάλο αριθμό μονονουκλεοτιδίων πολυμοφισμών (SNP) επίσης φαίνονται πολλά υποσχόμενες. Ωστόσο η χρήση ελεύθερων νουκλεϊνικών οξέων βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες που θα εφαρμόσουν μετρήσεις DNA, RNA και miRNA. Είναι πιθανό ότι μια μαζική παράλληλη αλληλούχιση θα συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας (Haram et al. 2014).

Καταλήγοντας, ενώ τα αποτελέσματα μας είναι ενθαρρυντικά, καθώς φάνηκε να υπάρχει τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού A1166C στο γονίδιο AGT1R και της προεκλαμψίας. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι για να εξαρθούν ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει να εξεταστεί μεγαλύτερος αριθμός τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών δειγμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Chesley, LC. (1978) Hypertensive Disorders in Pregnancy. Appleton-Century-Crofts, New York, NY.
- 2) Bell MJ. (2010) A historical overview of preeclampsia–eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* ;39(5):510–518.
- 3) Emile R. Mohler (2006). *Advanced Therapy in Hypertension and Vascular Disease*, PMPH-USA. Σελ. 407–408.
- 4) Βαμβακου Γ.Δ & Συν. (2016). Προεκλαμψία και μελλοντικός καρδιαγγειακός κίνδυνος σε γυναίκες. *Αρτηριακή Υπέρταση*, Τόμος 25, Τεύχος 1, σσ 21 – 25.
- 5) Duley L. (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* Jun ; 33(3):130-7.
- 6) Brown MA, et al. (2001) 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(1):IX–XIV.
- 7) Uzma Shamsi, et al. (2013) Epidemiology and risk factors of preeclampsia; an overview of observational studies. *Al Ameen J Med Sci*; Volume 6, No.4
- 8) Dadelszen P, et al. (2003) Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 22 (2) 143-8.
- 9) Baha M. Sibai, et al. (2004) Preeclampsia: An inflammatory syndrome? *American Journal Gynecology Obstetrics* . Volume 191, Issue 4, Pages 1061–1062
- 10) Maynard S et al. (2011) Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol.* Jan;31(1):33-46.
- 11) Backes CH, et al. (2011) Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. *J Pregnancy.* 2011 ,page 7.
- 12) Staff Anne Cathrine, et al. (2013) Redefining Preeclampsia Using Placenta-Derived Biomarkers. *Hypertension.* 2013 61:932-942.Originally published April 17,
- 13) Espinoza J, et al. (2007) Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* Volume 196, Issue 4, , Pages 326.e1-326.e13
- 14) Ness RB, et al. (1996) Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol.*(1996) 175:1365–1370.

- 15) Sohlberg S, et al. (2014) Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. *Placenta* ;35(3):202–206.
- 16) Lambert et al. (2014). Preeclampsia : an update. *Acta Anaesth. Berg.*(65) σς.137-149.
- 17) J. Roberts.(2000).Preeclampsia: What we know and what we do not know. *Semin Perinatol* ;24(1):24-8.
- 18) Valensise H, et al. (2008) Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension* ;52(5):873–880.
- 19) Li D, et al.(2000).Changing paternity and the risk of preeclampsia in the subsequent pregnancy. *Am J Epidemiol* 151:57-62
- 20) English F, et al.(2015) Risk factor end effective management of preeclampsia. *Integrated Blood Press Control*. 2015; 8: 7–12.
- 21) Ι. Γραμματικακης, και Συν. (2010) Προεκλαμψία : Παθογενετικοί μηχανισμοί σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. *Θέματα Μαιευτικής – Γυναικολογίας*, τ,1.
- 22) Hernández M, et al. (2000). Barrier family planning methods as risk factor which predisposes to preeclampsia *Ginecologia y Obstetricia de Mexico* . Aug 2000, 68:333-338
- 23) Shamsi. U, et al.(2013).Epidemiology and risk factors of preeclampsia; an overview of observational studies. *Al Ameen J Med Sci*, Volume6, No.4
- 24) Harlap, et al. (2002) Paternal Age and Preeclampsia. *Epidemiology*: November, Volume 13 - Issue 6 - pp 660-667
- 25) Augustin Conde-Angelo et al. (1999).Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: A systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 181: 10026-35
- 26) Klonoff-Cohen HS, et al. (1996) Job stress and preeclampsia.(1996) *Epidemiology* 7 (3):245-9.
- 27) Duckitt K, et al. (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005 Mar 12; 330(7491): 565.
- 28) Lambert et al. (2014) Preeclampsia: an update. *Acta Anaesthesiol Belg*. 65(4):137-49.
- 29) Granger et al. (2002) Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* ;9(3):147-60.
- 30) Van Beek E, et al. (1997) The pathogenesis of preeclampsia. *Ned Tijdschr Geneeskd*. Jul 12;141(28):1379-84.

- 31) Ayuk PT et al. (2006) Placental ischaemia is a consequence rather than a cause of pre-eclampsia. *Med Hypotheses*. 2006; 67(4):792-5.
- 32) Chaiworapongsa T, et al. (2014) Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol*. ;10(8):466-80.
- 33) Valencia-Ortega J, et al. (2015) Clinical implications of basic research in preeclampsia: immunological tolerance. *Ginecol Obstet Mex*. 2015 Aug;83(8):505-14.
- 34) Saito S, et al. (2007) The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. ;28(2):192-209.
- 35) Reynolds LP et al. (1995) Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*. 73(6):1839-51.
- 36) Brosens et al. (1967) The physiological response of vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J. Pathol. Bacteriol*. 93, σς. 569 – 579
- 37) Grretsen et al. (1981) Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *BJOG* 88, σς 876 – 881.
- 38) James M. Roberts et al. (2012) The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012 Apr 1; 2(2): 72–83.
- 39) Pijnenborg R, et al. (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: Facts and controversies. *Placenta*. Sep-Oct; 27(9–10):939–58
- 40) Robertson WB, et al. (1967) The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *Journal of Pathology & Bacteriology*. 93 (2):581–92
- 41) Myatt L. (2002) Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 19(1):103-11.
- 42) Enton Kaculini et, al. (2016) Preeclampsia: from Pathophysiology to Treatment. *BANTAO Journal* 14(2):53-59
- 43) Gilbert J, et al. (2008) Placental ischemia and cardiovascular dysfunction in preeclampsia and beyond: making the connections. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 6(10): 1367–1377.
- 44) Caniggia I, et al. (2000) Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 21 Suppl A: S25-30.
- 45) Burton, et al. (2002) Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87 , 2954–2959

- 46) Jauniaux E et al. (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 157(6) :2111-22.
- 47) Granger, et al. (2001) Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. *Hypertension.* 2001;38[part 2]:718-722.
- 48) Burton et al. (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, σς.287-299
- 49) LaMarca, et al. (2008) Recent Progress Toward the Understanding of the Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia. *Hypertension.* 51(4): 982–988.
- 50) Roberts J. et al. (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 357: 53–56
- 51) Kaufman RJ. (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* ;197(7):857–67.
- 52) Burton et al. (2011) Oxidative stress. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 25(3):287–99
- 53) Redman et al. (2007) Microparticles and immunomodulation in pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 76, σς. 61-67
- 54) LaMarca. (2012) Endothelial dysfunction; an important mediator in the Pathophysiology of Hypertension during Preeclampsia. *Minerva Ginecol.* 64(4): 309–320.
- 55) Von Dadelszen, et al. (2003). Subclassification of preeclampsia. *Hypertens.Pregnancy* 22, 143–148 (2003)
- 56) Roberts J. (1989) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16(1):5-15.
- 57) Roberts. (2013) If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *J Reprod Immunol.* 99(0): 1–9.
- 58) Ferrara. et al. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442
- 59) Maynard et al. (2011) Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol* 31 (1), σς 33-46
- 60) Alon T, et al. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.* ;1(10):1024–1028.

- 61) Wang, et al. (2009) Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* ;24:147–58.
- 62) Luttun A, et al. (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* ;8:831–840.
- 63) Dvorak. (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no 21, σς 4368-4380.
- 64) Powe , et al. (2011). Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 21; 123(24)
- 65) Lam et al. (2005). Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.*; 46 (5) :1077-85
- 66) Maynard et al. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.*; 111 (5): 649–658.
- 67) Ventresha et al. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, page. 642-649
- 68) Levine et al. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre-eclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, σς.992-1005
- 69) August P, and Lindheimer MD. Pathophysiology of preeclampsia. In:Laragh JL, Brenner BM, eds.*Hypertension* 2nd ed. New York, NY:Raven Press; 1995: 2407–2426.
- 70) Gant, et al. (1974). The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet. Gynecol.*43, 854
- 71) Dechend, R. et al. (2009) In *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy* (eds Lindheimer, M. D., Roberts, J. M. & Cunningham, G. C.) Elsevier 287–296
- 72) Wallukat G ,et al. (1999) Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* ;103: 945–952.
- 73) Xia et al. (2007) Potential Roles of Angiotensin Receptor–Activating Autoantibody in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Hypertension.* 50(2): 269–275.
- 74) Parrish, et al. (2010). The Effect of Immune Factors, Tumor Necrosis Factor- α , and Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type I Receptor on Soluble fms-Like Tyrosine-1 and Soluble Endoglin Production in Response to

- Hypertension During Pregnancy. *American Journal of Hypertension*, Volume 23, Issue 8, Pages 911–916.
- 75) Aluvihare VR, et al. (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 5 (3):266–271
 - 76) Warning, et al. (2011). A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction.* 141 (6):715-24.
 - 77) Loke Y.W, et al. (1995). Decidua in human implantation. *Human Reproduction*, Volume 10, Issue suppl_2, , Pages 14–21,
 - 78) Hanna, et al. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine* 12, 1065 – 1074
 - 79) Chang-Ching Yeh, et al. (2013). Innate Immunity, Decidual Cells, and Preeclampsia. *Reprod Sci.* 20 (4): 339–353
 - 80) Gomez-Lopez, N. et al. (2010) Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J. Leukoc.Biol.* 88, 625–633
 - 81) Abrahams, V, et al. (2005). A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J. Immunol.*175, 8096 –8104.
 - 82) Mellembakken, et al. (2001) Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension* 38, 394 –398.
 - 83) Luppi P, et al. (2006) Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin. Immunol.*118, 268 –275.
 - 84) McCarthy et al. (2011). Animal models of preeclampsia: uses and limitations. *Placenta* 32, σς 413-419.
 - 85) Khalil RA, et al. (2002). Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* ;283 (1) 29-45.
 - 86) Saito et al. (2007). The role of the immune system in preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine* 28 192–209
 - 87) Chelbi, et al. (2008). Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia. *Mol Cell Endocrinol.* ;282 (1-2):120-9.
 - 88) Marshall Graves. (1998). “Genomic imprinting, development and disease—is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene?” *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 10, no. 1, pp. 23–29,
 - 89) Chappell, et al. (2006). Searching for genetic clues to the causes of preeclampsia. *Clin. Sci.* 110, 443–458.

- 90) Esplin, et al. (2001) "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia," *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 12, pp. 867–872
- 91) Dekker et al. (2011). The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J Reprod Immunol.* 89(2):126-32.
- 92) Pennington, et al. (2012). Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech.* 5 (1):9-18.
- 93) Polsani, et al. (2013). Emerging new biomarkers of preeclampsia. *Adv Chronic Kidney Dis.* ;20(3):271-9.
- 94) Szpera-Gozdziwicz et al. (2014). Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Front Biosci (Landmark Ed)* ;19:734-46.
- 95) Sahai, et al. (2017). Pre-eclampsia: Molecular events to biomarkers. *Medical Journal Armed Forces India* Volume 73, Issue 2, Pages 167-174
- 96) Barton, et al. (2008). Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol.* ;112(2 Pt 1):359-72.
- 97) Haram, et al. (2014). Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. Volume 2014 , 13 pages.
- 98) Grill S, et al. (2009). Potential markers of preeclampsia - a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 7:70–84
- 99) Lapaire et al. (2010). The preeclampsia biomarkers soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor: current knowledge, clinical implications and future application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 151: 122–9
- 100) Yliniemi, et al. (2015). Combination of PAPP_A, fhCG β , AFP, PIGF, sTNFR1, and Maternal Characteristics in Prediction of Early-onset Preeclampsia. *Clin Med Insights Reprod Health.* 9: 13–20.
- 101) Smith et al. (2002). Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab.*;87: 1762–1767.
- 102) Hughes et al. (1980). A. Assay of a placental protein to determine fetal risk. *BMJ.* ;280: 671–673
- 103) Yaron, et al. (2002). Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* ;22: 778–782.
- 104) Kalousová et al. (2014). Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and preeclampsia. *Adv Clin Chem.* 63: 169-209.
- 105) Lakshmi Tanuja Petla et al. (2013) Biomarkers for the management of pre-eclampsia in pregnant women. *Indian J Med Res.* 138(1): 60–67.

- 106) Carty, et al. (2008). Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia. *Trends Cardiovasc Med.* (5-24): 186–194.
- 107) Bohn, et al. (1983). Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17). *Oncodev Biol Med.* 1983, 4: 343-350
- 108) Nicolaides, et al. (2006). A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.*;27: 13–7.
- 109) Burger, et al. (2004). Placental protein 13 (PP-13): Effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 25 :608–622.
- 110) Huppertz et al. (2008) Longitudinal Determination of Serum Placental Protein 13 during Development of Preeclampsia. *Fetal Diagn Ther*;24: 230–236
- 111) Grill, et al. (2009). Potential markers of preeclampsia - a review. *Reprod Biol Endocrinol.*7: 70–84.
- 112) Garlanda ,et al.(2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol*;23: 337-66.
- 113) Akolekar, et al. (2009). Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn.* 29(10) :934–938
- 114) Cetin, et al. (2006) Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.*;194 (5) :1347-53.
- 115) Robinson, et al. (2007). Soluble endoglin as a second-trimester marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 197(2): 174.e1–5.
- 116) Levine, et al. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.*; 350: 672–83.
- 117) Herraiz, et al. (2015). Angiogenesis-Related Biomarkers (sFlt-1/PLGF) in the Prediction and Diagnosis of Placental Dysfunction: An Approach for Clinical Integration. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug; 16(8) : 19009–19026.
- 118) Verlohren, et al. (2014). New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension.*63: 346–352.

- 119) Verlohren, et al. (2012). The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*;206: 58.e1–58.e8.
- 120) Simas, et al. (2007). Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J Obstet Gynecol.* 197(3): 244.e1-8.
- 121) Stepan, et al. (2007). Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 2831-2834.
- 122) Wallukat, et al. (1999). Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 103: 945–952.
- 123) Herse, et al. (2008) AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia. *J Mol Med.*;86: 697–703.
- 124) Zhou, et al. (2008). Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* ;51: 1010–1019
- 125) Herse, et al. (2009). Prevalence of agonistic autoantibodies against the angiotensin II type 1 receptor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 in a gestational age-matched case study. *Hypertension.*;53 :393–398
- 126) Grill, et al. (2009). Potential markers of preeclampsia – a review. *Reprod Biol Endocrinol.*;2009 7: 70.
- 127) Kato, et al. (2005). Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*25: 2480–2487.
- 128) Senna, et al. (2008). Study of plasma adrenomedullin level in normal pregnancy and preclampsia. *Medscape J Med.* 10:29.
- 129) Gratton, et al. (2003). Adrenomedullin messenger ribonucleic acid expression in the placenta of normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* ;88: 6048–6055
- 130) Anderson, et al. (2012). Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta.* 33 Suppl: S 42-7.
- 131) Strevens, et al. (2001). Serum cystatin C is a better marker for preeclampsia than serum creatinine or serum urate. *Scand J Clin Lab Invest.* ; 61(7):575 – 80.
- 132) Kristensen et al. (2007). Temporal changes of the plasma levels of cystatin C, beta-trace protein, beta2-microglobulin, urate and creatinine during pregnancy

- indicate continuous alterations in the renal filtration process. *Scand J Clin Lab Invest* ;67(6):612-8.
- 133) Thilaganathan et al. (2009). Raised maternal serum cystatin C: an early pregnancy marker for preeclampsia. *Reprod Sci*;16 (8):788- 93.
 - 134) Thilaganathan et al. (2010). Early-pregnancy multiple serum markers and second-trimester uterine artery Doppler in predicting preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2010 Jun;115(6):1233 -8
 - 135) Olsson, et al.(2012) Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for alpha(1)-microglobulin, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (5) 813–846
 - 136) Schaer, et al. (2010). Clearance and control mechanisms of hemoglobin from cradle to grave, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2) 181–184.
 - 137) Anderson, et al. (2016). Fetal hemoglobin, α 1-microglobulin and hemopexin are potential predictive first trimester biomarkers for preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.*;6 (2):103-9.
 - 138) Centlow, et al, (2008). Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertil Steril* 90 (5): 1834- 43.
 - 139) Zulfikaroglu, et al. (2009). Plasma visfatin levels in preeclamptic and normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* ;281(6) :995-8.
 - 140) Frasshauep, et al. (2007). Differential regulation of visfatin and adiponectin in pregnancies with normal and abnormal placental function. *Clin Endocrinol.* ;66 :434–9.
 - 141) Mazaki-Tovi, et al. (2009). Maternal visfatin concentration in normal pregnancy *J Perinat Med* 37 :206–217
 - 142) Jian WX,et al. (2006). The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med* 23(9):967–973
 - 143) Marseglia, et al. (2015). The Role of Visfatin in Pregnancy, Complications and Procreation. *J Pediatr Biochem* 05 (01): 002-007
 - 144) Manisha, et al. (2014). Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *J Clin Diagn Res.*; 8 (4)
 - 145) Tavana, et al. (2010). The Relationship Between Maternal Serum Visfatin Level And Hypertensive Disorders of Pregnancy. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics.* Volume 15 Number 1
 - 146) Hu, et al. (2008). Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynaecol Scand.*87 :413–8.

- 147) Czech, et al. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for argonautes. *Nature Reviews Genetics*.;12(1) :19–31.
- 148) Cretoiu, et al. (2016). Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers in Pathophysiological Evolution of Pregnancy. *Disease Markers*. Volume 2016, pages 7
- 149) Dong-bao Chen, et al. (2013). Human Placental MicroRNAs and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*, Volume 88, Issue 5, page, 130, 1-11,
- 150) Munaut, et al. (2016). Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia. *Biomed Rep*. 5 (6): 686–692.
- 151) Tsochandaridis, et al. (2015). Circulating MicroRNAs as Clinical Biomarkers in the Predictions of Pregnancy Complications. *BioMed Research International* Volume 2015 page 8.
- 152) Li, et al. (2013). “Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies,” *BioMed Research International*, vol. 2013, pages, 9.
- 153) Tang, et al. (2013). “miR-141 contributes to fetal growth restriction by regulating PLAG1 expression,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, Article
- 154) Zhang, et al. (2012). Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med*. 16 (2) :249-59.
- 155) Zhao, et al. (2013). Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clinical Biochemistry*. Volume 46, Issues 10–11, Pages 953-960
- 156) Mouillet, et al. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol*. 213 (4 Suppl) :S163-72.
- 157) Zhao, et al. (2012). Circulating miR-323-3p as a Biomarker of Ectopic Pregnancy. *Clin Chem*. 58 (5): 896–905.
- 158) Brand, et al. (2000). Role of the angiotensinogen gene for essential hypertension. *Herz*. 25(1) :15-25.
- 159) Sparks, et al. (2014). Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Compr Physiol*. 4 (3): 1201–1228.
- 160) Komlosi, et al. (2003). Angiotensin I Conversion to Angiotensin II Stimulates Cortical Collecting Duct Sodium Transport. Volume 42, Issue 2 pp 195-199
- 161) Engeli et al. (2000). Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System , Volume 35, Issue 6 page 1270-1277
- 162) Oliveira, et al. (2008). The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vasc Health Risk Manag*. 4 (4): 787–803.

- 163) Paul, et. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86 (3) 747-803.
- 164) Hall. (2003). Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 24 (1) :27-39.
- 165) Corvol et al. (1995). Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl.* 13 (3): S3-10.
- 166) Wu , et al. (2011). Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: A mini review. *N Am J Med Sci (Boston)* 4 (4) :183–190.
- 167) Ohkubo, et al. (1983). Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;80 (8) 2196–2200.
- 168) Weber, et al. (2001). Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 345: (23) 1689–97
- 169) Hilgenfeldt. (1988). Half-life of rat angiotensinogen: Influence of nephrectomy and lipopolysaccharide stimulation. *Mol Cell Endocrinol.*56 (1-2) :91–98.
- 170) Campbell, et al. (1986). Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest.* 78: 31–39.
- 171) Jeunemaitre, et al. (1992). Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell.*;71 (1) :169–180
- 172) Lynch KR, et al. (1991). Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension.* 1991;17 (3) :263–269.
- 173) Deschepper. (1994). Angiotensinogen: Hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int.* 46: 1561–1563
- 174) Klett, et al. (1988). Hellmann W, Muller F, et al. Angiotensin II controls angiotensinogen secretion at a pretranslational level. *J Hypertens Suppl.* 6 (4): S442–S445.
- 175) Brasier, et al. (2000). Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem.* 212 (1-2) :155–169.
- 176) Gomez, et al. (1988). Fetal expression of the angiotensinogen gene. *Endocrinology.* 123 (5): 2298–2302.
- 177) Danser. (2003). Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol.* 35 (6) :759–778
- 178) Gardemann, et al. (1999). Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 145 (2) :309–314.

- 179) Prat-Larquemin, et al. (2004). Adipose angiotensinogen secretion, blood pressure, and AGT M235T polymorphism in obese patients. *Obes Res.*;12 (2) :556–561
- 180) Timmermans, et al. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45 (2) :205–251.
- 181) Crowley, et al. (2004). Exploring type I angiotensin (AT1) receptor functions through gene targeting. *Acta Physiol Scand.*181 (4): 561-70.
- 182) Gasparo, et al. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52 (2):415–472.
- 183) Marrero, et al. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature.* 375 :247–250.
- 184) Shenoy, et al. (2005). Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin. *Sci STKE.*2005 (311)
- 185) Eguchi, et al. (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*;273 (15) :8890–8896.
- 186) Lautrette, et al. (2005). Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: A new therapeutic approach. *Nat Med.* 11 (8) :867–874
- 187) Ito, et al. (1995). Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92 (8) :3521–3525.
- 188) Kim, et al. (1995). Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (7) :2735–2739.
- 189) Billet, et al. (2007). Gain-of-function mutant of angiotensin II receptor, type 1A, causes hypertension and cardiovascular fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117 (7) :1914–1925
- 190) Crowley, et al. (2005). Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 115 :1092–1099
- 191) Griendling et al. (1997). Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension.* 29 (1 Pt 2) :366-73.
- 192) Oliverio, et al. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A.*95 (26) :15496–15501.

- 193) Geisterfer, et al. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 62 (4) :749–756
- 194) Intengan, et al. (2001). Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.*;38 (3 Pt 2):581–587.
- 195) Schiffrin, et al. (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 101 (14) :1653–1659
- 196) Davisson, et al. (2000). Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest.* 106 (1) :103–106
- 197) Allen, et al. (2006). Expression of constitutively active angiotensin receptors in the rostral ventrolateral medulla increases blood pressure. *Hypertension.* 47 (6):1054–1061.
- 198) Muller et al. (2000). NF-kappa B Inhibition Ameliorates Angiotensin II-Induced Inflammatory Damage in Rats. *Hypertension.* 35 (1 Pt 2) :193–201.
- 199) Barhoumi, et al. (2011). T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension.* 57 (3) :469–476.
- 200) Crowley, et al. (2011). Role of AT1 receptor-mediated salt retention in angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.*301 (5) :1124–1130.
- 201) Hoch, et al. (2009). Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296 (2) :208–216
- 202) Henke, et al. (2007). Vascular endothelial cell-Specific NF-κB suppression attenuates hypertension-induced renal damage. *Circ Res.*101 (3) :268–276.
- 203) Curnow, et al. (1992). Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 6 :1113–1118.
- 204) Ahmed et al. (1995). Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. *J Clin Invest* 96 :848–857
- 205) Cooper et al. (1999). The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 20 :467–474.
- 206) Petit, et al. (1996). Expression of angiotensin II type-I receptor and phospholipase C-linked G alpha q/11 protein in the human placenta. *J Soc Gynecol Investig* 3:316–321.
- 207) Williams, et al. (2011). The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25 (4-4): 405–417

- 208) Herse, et al. (2007). Dysregulation of the circulating and tissue-based renin–angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension* 49 604–611.
- 209) Shah, et al. (2000) Reproductive tissue renin gene expression in preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* 19 341–351.
- 210) Alfakih, K., et al., (2005).The clinical significance of a common, functional, X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (–1332G/A) in a cohort of 509 families with premature coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 26, 584–589.
- 211) Rahimi et al. (2014). AT2R -1332 G:A polymorphism and its interaction with AT1R 1166 A:C, ACE I/D and MMP-9 -1562 C:T polymorphisms: risk factors for susceptibility to preeclampsia. *Gene.* 538(1):176-81
- 212) Shanshan, et al. (2012). AGT M235T polymorphism contributes to risk of preeclampsia: evidence from a meta-analysis. *Journal of the Renin – Angiotensin – Aldosterone System* 13 (3) 379–386
- 213) Jeunemaitre, et al. (1992). Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell.* 71 (1) :169–180.
- 214) Morgan, et al. (1997). Angiotensinogen T235 expression is elevated in decidual spiral arteries. *J Clin Invest* 1997; 100: 1406–1415
- 215) Levesque, et al. (2004). Implication of an AGT haplotype in a multigene association study with pregnancy hypertension. *Hypertension* 43: 71–78.
- 216) Morgan, et al. (1999). Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in firsttrimester decidua. *Am J Obstet Gynecol* 180: 95–102.
- 217) Procopciuc, et al. (2011). Maternal/newborn genotype contribution of the renin-angiotensin system (Met235Thr, Thr174Met, I/D-ACE, A2350G-ACE, A1166C-AT2R1, C3123A- AT2R2, 83A/G-REN) to the risk of pre-eclampsia: a Romanian study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 12(4):539-48.
- 218) Williams. (2003). Restriction Endonucleases: Classification, Properties, and Applications. *Mol Biotechnol* Volume 23 Issue (3), 225-243
- 219) Pray. (2008). Restriction enzymes. *Nature Education* 1(1) :38
- 220) Πλαγεράς Π., Γεροβασίλη Α., Παπαϊωάννου Α. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ. Εκδόσεις Πασχαλίδη, 2011
- 221) Birnboim et al. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6), σσ. 1513-1523.
- 222) Matson. (2008). *Microarray Methods and Protocols*. Florida: Boca Raton.

- 223) Σάτρα. (2015). *Εργαστηριακός Οδηγός: Διαγνωστική Μεθοδολογία Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας*. Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 224) Bouba, et al. (2003). Interaction between the polymorphisms of the renin-angiotensin system in preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Volume 110, Issue 1, pages 8-11
- 225) Li, et al. (2015). The effects of gene polymorphisms in angiotensin II receptors on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Hypertens Pregnancy*. 34 (2): 241-60.
- 226) Kaur, et al. (2005) Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with pregnancy-induced hypertension. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 929–933.
- 227) Zafarmand et al.(2008) The M235T variant of the angiotensinogen gene is related to development of selfreported hypertension during pregnancy: The Prospect-EPIC Cohort Study. *Hypertens Res* 31: 1299–1305.
- 228) Kusmierska-Urban et al. (2015). Associations of ACE I/D and AGT M235T Gene Polymorphisms with the Gestational Hypertension and the Fetal. *Obstetrics & Gynecology International Journal*. Volume 2 Issue 1
- 229) Zhang et al. (2017) The Gene Variants of Maternal/Fetal Renin-Angiotensin System in Preeclampsia: A Hybrid Case-Parent/Mother-Control Study. *Sci Rep.*; 7: 5087.

Εικόνες

- 1) <http://circ.ahajournals.org/content/123/24/2856>
- 2) [http://www.kidneyinternational-online.com/article/S0085-2538\(15\)50699-6/fulltext](http://www.kidneyinternational-online.com/article/S0085-2538(15)50699-6/fulltext)
- 3) <https://www.britannica.com/science/renin-angiotensin-system>
- 4) <http://www.dnaprofilng.com.my/dna-process/>
- 5) https://www.researchgate.net/figure/259883761_fig1_Classic-and-alternative-pathways-of-the-renin-angiotensin-system-RAS-Angiotensin