



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ :Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Συσχέτιση δυο πολυμορφισμών του γονιδίου AGT (M235T, rs699 και T174M, rs4762)
με την προεκλαμψία

ΤΣΑΚΙΡΑΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2018

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1ος Εξεταστής: Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας

(Επιβλέπων)

2ος Εξεταστής: Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής

3ος Εξεταστής: Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α:ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
A1.ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ:ΟΡΙΣΜΟΣ	5
A2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	7
A3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	8
A4. Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	9
A4.1. 1ο Στάδιο-Ατελής Πλακουντοποίηση	11
A4.2. 2ο Στάδιο-φλεγμονώδης ανοσολογική απόκριση	13
A4.3. Προκαλιτονίνη (PCT) και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)	14
A5. ANTI-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ	16
A5.1. VEGF	17
A5.2. PlGF	18
A5.3. sEng	18
A6. ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΟΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ	19
A7. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	21
A7.1. Μελέτη υποψήφιων γονιδίων	22
A7.1.1. Γονίδια αγγειοδιαστολής	22
A7.1.2. Γονίδια θρομβοφιλίας	24
A7.1.3. Γονίδια οξειδωτικού στρες	24
A7.1.4. Γονίδια μεταβολισμού των λιπιδίων	25
A7.1.5. Γονίδια ενδοθηλιακής λειτουργίας	26
A7.1.6. Γονίδια ανοσολογικής απόκρισης	27
A7.2. Φλεγμονώδεις παράγοντες	28
A8. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ (RAS)	29
A8.1. Σύστημα RAS και προεκκλαμψία	32
A8.2. Αγγειοτενσινογόνο	34

A8.3. Συσχέτιση πολυμορφισμών του AGT γονιδίου με παθοφυσιολογικές λειτουργίες	36
A8.3.1. Πολυμορφισμός M235T	36
A8.3.2. Πολυμορφισμός T174M	40
A8.3.3. Μελέτες και με τους δυο πολυμορφισμούς: AGTM235T και AGTT174M	41
A8.4. M235T, T174M & Προεκλαμψία	43
A9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β:ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	46
B1. ΥΛΙΚΑ	47
B1.1. Δείγματα	47
B1.2. Χημικά Αντιδραστήρια	47
B1.3. Χρωστικές Ουσίες	48
B1.4.Όργανα – Συσκευές	48
B1.5. Αναλώσιμα	48
B2. ΜΕΘΟΔΟΙ	49
B2.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα με QIAamp Mini Kit (QIAGEN)	49
B2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	51
B2.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (Polymerase Chain Reaction)	54
B2.3.1. Πρωτόκολλο PCR για AGT με HOTSTART	58
B2.4. Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες	59
B2.4.1. Πρωτόκολλο πέψης με NcoI (2000u) για πολυμορφισμό T174M (rs 4762)	61
B2.4.2. Πρωτόκολλο πέψης με SfaNI (10u/μl) για πολυμορφισμό M235T (rs 699, CtoT)	62
B2.5. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ:ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Σάτρα (Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας). Το αντικείμενο μελέτης της είναι η συσχέτιση δυο πολυμορφισμών του γονιδίου AGT (M235T, rs699 και T174M, rs4762) με την προεκλαμψία.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής Δρ. Μαρία Σάτρα, για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, όσο και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η συνεργασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα την απόκτηση πολύτιμων γνώσεων, σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο, στο γνωστικό αντικείμενο της βιολογίας. Ακόμη, οι συμβουλές που μου υπόδειξε αποδείχθηκαν χρήσιμες όχι μόνο για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και για τη συνολική μου πορεία ως βιολόγος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και το διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, τόσο για τη βοήθειά του στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, όσο και για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Σαμαρά για τις συμβουλές και τη βοήθειά τους σε γνωστικό και υλικό επίπεδο προκειμένου να διεκπεραιωθεί το πείραμα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους καθηγητές και τη γραμματεία του μεταπτυχιακού προγράμματος << Βιολογία της Αναπαραγωγής>> και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τσακινάκη Χριστίνα
Λάρισα 2017-2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προεκλαμψία είναι μία πολυσυστηματική νόσος η οποία εμφανίζεται μόνο στην εγκυμοσύνη και αποτελεί την κύρια αιτία μητρικής και εμβρυικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Ευθύνεται για περίπου 50 - 60.000 μητρικούς θανάτους και ακόμα για 500.000 περιγεννητικούς νεογνικούς θανάτους ετησίως, παγκοσμίως. Η ακριβής παθογένεια της νόσου παραμένει ασαφής και έχει οδηγήσει σε πολλαπλές υποθέσεις σχετικά με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς. Η παθοφυσιολογία της έχει πλέον επισημοποιηθεί σε ένα μοντέλο δύο σταδίων που οριοθετεί την εξέλιξη από την ατελή πλακουντοποίηση στο μητρικό κλινικό σύνδρομο. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη γενετικού υπόβαθρου της νόσου, γεγονός που έχει οδηγήσει στη μελέτη πολλών υποψήφιων γονιδίων. Ορισμένα από αυτά αποτελούν μέλη του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS), το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Σε αυτό το σύστημα περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων το αγγειοτενσινογόνο (AGT), το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος RAS. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συσχέτιση των πολυμορφισμών M235T και T174M του AGT γονιδίου με την προεκλαμψία.

Για το λόγο αυτό απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα 42 γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία και 42 γυναικών που είχαν μια φυσιολογική εγκυμοσύνη. Το γονίδιο AGT πολλαπλασιάστηκε στη συνέχεια με την τεχνική PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινήτων και στα προϊόντα PCR πραγματοποιήθηκε πέψη με την βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων SfaNI και NcoI.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει μια πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T του γονιδίου AGT και της προεκλαμψίας, ενώ δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού T174M και της νόσου. 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 και η οποία έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την υπέρταση. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, ωστόσο απαιτείται η διεξαγωγή ερευνών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

ABSTRACT

Pre-eclampsia is a multi-systemic disease which occurs only in pregnancy and is the main cause of maternal and fetal morbidity and mortality. It is responsible for about 50-60,000 maternal deaths and even for 500,000 perinatal and neonatal deaths per year worldwide. The exact pathogenicity of the disease remains unclear and has led to multiple hypotheses about the mechanisms involved. Her pathophysiology has now been formalized in a two-stage model that delineates progression from incomplete placentation to maternal clinical syndrome. Numerous studies have demonstrated the existence of a genetic background of the disease, which has led to the study of many candidate genes. Among these are genes which take part in the renin-angiotensin system (RAS). RAS participates in the control of blood pressure and electrolyte balance. This system includes the angiotensinogen (AGT), the sole substrate of the RAS system. The purpose of this diploma is to correlate the M235T and T174M polymorphisms of the AGT gene with pre-eclampsia.

For this reason, DNA was isolated from the peripheral blood of 42 women who had preeclampsia and 42 women who had a normal pregnancy. The AGT genes were multiplied by the PCR technique using appropriate primers and PCR products were digested with the restriction enzymes SfaNI and NcoI.

From the results, there seems to be a possible correlation of the M235T polymorphism of the AGT gene and preeclampsia, and no statistically significant correlation was found between the T174M polymorphism and the disease. The M235T polymorphism is a variant of the human AGT gene which results in the substitution of methionine by threonine at position 235 and which has been shown to be associated with hypertension. The results are in line with international literature, however, more research is needed to obtain a safe conclusion.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. Ορισμός

Το 2000 στο 12^ο Παγκόσμιο Συνέδριο της Διεθνούς Εταιρείας για τη Μελέτη της Υπέρτασης (ISSHP) στο Παρίσι, καθιερώθηκε ο ορισμός και η κατηγοριοποίηση των υπερτασικών διαταραχών της κύησης.

Ως προεκλαμψία ορίζεται η εμφάνιση υπέρτασης μετά την 20η εβδομάδα κύησης η οποία συνυπάρχει με μια από τις παρακάτω νεοεμφανιζόμενες καταστάσεις (Brown, et al, 2001):

1. Πρωτεϊνουρία [πρωτεΐνη στα ούρα / κρεατινίνη ≥ 30 mg / mmol (0,3 mg / mg) ή ≥ 300 mg / ημέρα ή τουλάχιστον 1 g / L («2 +») σε δοκιμαστική ταινία]
2. Άλλες δυσλειτουργίες μητρικών οργάνων:
 - νεφρική ανεπάρκεια (κρεατινίνη ≥ 90 μ mol / L ή 1,02 mg /dL)
 - ηπατική συμμετοχή (αυξημένες τρανσαμινάσες – τουλάχιστον δύο φορές πάνω από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια \pm άλγος στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλίας ή στο επιγάστριο)
 - νευρολογικές επιπλοκές (όπως εκλαμψία, μεταβολή της νοητικής κατάστασης, τύφλωση, εγκεφαλικό επεισόδιο ή πιο συχνά, αύξηση των αντανακλαστικών-όταν συνοδεύονται από κλώνο, σοβαρές κεφαλαλγίες-που συνοδεύονται από αύξηση των αντανακλαστικών, επίμονα οπτικά σκοτώματα)
 - αιματολογικές επιπλοκές (θρομβοκυτταροπενία - αριθμός αιμοπεταλίων κάτω από 150.000 / dL, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, αιμόλυση)

Η προεκλαμψία είναι μία πολυσυστηματική νόσος, η οποία εμφανίζεται μόνο στην εγκυμοσύνη και αποτελεί την κύρια αιτία μητρικής και εμβρυικής/νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας (Carl H. Backes et al., 2011).

Υπάρχουν δυο τύποι προεκλαμψίας ανάλογα με το χρόνο εμφάνισής της, η πρόωμη που εμφανίζεται πριν την 34^η εβδομάδα της κύησης και είναι υπεύθυνη για υψηλά ποσοστά μητρικής και εμβρυικής νοσηρότητας και θνητότητας, ενώ, η όψιμη που εμφανίζεται μετά την 34^η εβδομάδα αποτελεί την πλειοψηφία των προεκλαπτικών γυναικών (Dadelszen, 2003), (Staff et al, 2013). Τόσο η πρόωμη 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). Η αναγνώριση της πρόωμης/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).

Ακόμα και σήμερα οι παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου δεν είναι γνωστοί, ενώ, φαίνεται ότι η πιθανότητα εμφάνισής της οφείλεται στη μη φυσιολογική διαμόρφωση του πλακούντα. (Maynard, 2011)

Πέρα από τα προβλήματα στα διάφορα συστήματα οργάνων της μητέρας που παρουσιάστηκαν παραπάνω, είναι υπεύθυνο, για αυξημένο κίνδυνο αναπνευστικών παθήσεων, ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης (IUGR), και πρόωρη γέννηση του νεογνού. (Backes et al, 2011).

Η προεκλαμψία επηρεάζει περίπου το 5-8% των κυήσεων παγκοσμίως. Περίπου επτά εκατομμύρια γυναίκες ετησίως εμφανίζουν προεκλαμψία παγκοσμίως. Αποτελεί τη δεύτερη κύρια άμεση αιτία μητρικού θανάτου με το 99% των θανάτων σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, όπως η Νότια Ασία και η Αφρική. Ευθύνεται για περίπου 50 - 60.000 μητρικούς θανάτους και ακόμα για 500.000 περιγεννητικούς νεογνικούς θανάτους ετησίως, παγκοσμίως.

A2. Ιστορία της νόσου

Παρά τις ελλιπείς γνώσεις και την έλλειψη κατανόησης του μηχανισμού δράσης τους, η προεκλαμψία και η εκλαμψία έχουν αναγνωρισθεί και έχουν γίνει προσπάθειες περιγραφής τους εδώ και πολλούς αιώνες. Η εκλαμψία αναγνωρίστηκε αρχικά ως σπασμωδική διαταραχή της εγκυμοσύνης. Το όνομά της προέρχεται από την ελληνική λέξη eklampsis (που σημαίνει αστραπή), αντανακλώντας την ξαφνική εμφάνιση σπασμών σε έγκυες γυναίκες.

Ο Ιπποκράτης παρατήρησε ότι οι πονοκέφαλοι, οι σπασμοί και η υπνηλία, είναι ενδείξεις που σχετίζονται με δυσκολίες κατά της εγκυμοσύνη, ενώ, ο Varandeous, καθιέρωσε τον όρο εκλαμψία το 1619.

Υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι αρχαίοι πολιτισμοί της Κίνας, της Αιγύπτου και της Ινδίας, είχαν αναγνωρίσει και περιγράψει αυτή τη νόσο, η οποία ευθυνόταν για πολυάριθμους μητρικούς και νεογνικούς θανάτους.

Η πρωτεϊνουρία αναφέρθηκε σε ασθενείς με εκλαμψία το 1840 και περίπου 50 χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκε και η παρουσία υπέρτασης σε αυτούς τους ασθενείς. Ο όρος προεκλαμψία εισήχθη στη συνέχεια για να περιγράψει την κατάσταση που προηγείται της εκλαμψίας. Στις αρχές του 20ου αιώνα, η διαφοροποίηση μεταξύ σπειραματονεφρίτιδας (τότε γνωστή ως ασθένεια Bright) και προεκλαμψίας σε έγκυες γυναίκες ήταν πρόκληση, που σχετιζόταν με την υπέρταση και την πρωτεϊνουρία. Η πρόληψη της εκλαμψίας προτάθηκε ως κύριος στόχος της προγεννητικής φροντίδας το 1901, γεγονός που οδήγησε άμεσα στην έμφαση που δίνεται σήμερα στην ανίχνευση πρώιμων σημείων προεκλαμψίας.

A3. Παράγοντες κινδύνου

Λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως τα αίτια που ευθύνονται για την εμφάνισή της, ωστόσο έχει ενοχοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων.

Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται: η ηλικία, το κάπνισμα (σε ορισμένες περιπτώσεις ασκεί ένα προστατευτικό ρόλο έναντι της προεκλαμψίας, ακόμα και μετά την διακοπή του) (Augustin et al, 1999), ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος, το ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη κύηση, ο πατρικός παράγοντας, ο τύπος της εγκυμοσύνης (μονήρης, πολύδυμη), το οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη και υπέρτασης (Duckitt K, 2005),(Shamsi, 2013), η θρομβοφιλία και τα αντιφωσφολικά αντισώματα (Ι. Γραμματικάκης και Συν, 2010).

Ακόμη, το στρες και συγκεκριμένα το εργασιακό στρες φαίνεται πως συμβάλει στην εμφάνιση της νόσου, (Klonoff-Cohen et al, 1996), (Duckitt K, 2005), όπως και η ανώμαλη πλακουντοποίηση και τροφοβλαστική διείσδυση στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας, η διαταραγμένη ανοσολογική ανοχή στους μητρικούς, πατρικούς και εμβρυικούς ιστούς, η δυσπροσαρμοστικότητα του μητρικού οργανισμού στις καρδιαγγειακές και φλεγμονώδεις αλλαγές της κύησης, οι μέθοδοι αντισύλληψης που δεν επιτρέπουν την έκθεση στο σπέρμα, καθώς, και γενετικοί παράγοντες. (Hernández,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).

A4. Η παθοφυσιολογία της νόσου

Η παθογένεια της προεκλαμψίας αποδόθηκε αρχικά στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία παίζει επίσης κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Στην πραγματικότητα, η προεκλαμψία μοιράζεται πολλούς παράγοντες κινδύνου με καρδιαγγειακές παθήσεις όπως: η παχυσαρκία, η υπέρταση, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η δυσλιπιδαιμία.

Πιστεύεται ότι οι δυσμενείς ανοσολογικές αντιδράσεις προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που μπορεί να οδηγήσει σε υπέρταση σε έγκυες γυναίκες. Η εγκυμοσύνη επιβάλλει την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης, δεδομένου ότι η άμεση επαφή των κυκλοφορούντων κυττάρων του ανοσοποιητικού της μήτρας με ιστό του πλακούντα απαιτεί προσαρμογές από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα για να διατηρηθεί η ανοχή στο έμβρυο.

Η ακριβής παθογένεια της προεκλαμψίας είναι, ωστόσο, ασαφής και έχει οδηγήσει σε πολλαπλές υποθέσεις σχετικά με τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς.

Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας έχει πλέον επισημοποιηθεί σε ένα μοντέλο δύο σταδίων που οριοθετεί την εξέλιξη από την ατελή πλακουντοποίηση στο μητρικό κλινικό σύνδρομο.

Το πρώτο στάδιο οφείλεται στον πλακούντα, μετατρέποντάς τον σε ισχαιμικό (υποξικό), ενώ, το δεύτερο αποτελείται από μεταβολές του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας. Παρόλο που η ανοσοκαταστολή παίζει ουσιαστικό ρόλο και στους δύο τύπους, αυτοί χαρακτηρίζονται από διαφορετικές αιτιολογίες και φαινότυπους.

Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της προεκλαμψίας, ο ατελής διαμορφωμένος πλακούντας εμφανίζεται χωρίς κλινικά χαρακτηριστικά, ακολουθούμενος από ένα δεύτερο στάδιο που περιλαμβάνει ένα μητρικό κλινικό σύνδρομο με καρδιαγγειακές και άλλες εκδηλώσεις.

Οι μηχανισμοί που φαίνεται να εμπλέκονται στην έναρξη της προεκλαμψίας συμπεριλαμβάνουν τη μη φυσιολογική τροφοβλαστική διείσδυση, την ισχαιμία, το οξειδωτικό στρες, την απορρύθμιση των αγγειογενετικών παραγόντων, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα αυτόαντισώματα για τον υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II και τη φλεγμονή. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μεταξύ των άλλων οδηγεί σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, σε αύξηση των επιπέδων θρομβοξάνης και στην ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού.

Ακόμη, είναι ευρέως αποδεχτό, ότι οι παραπάνω παράγοντες συνδυάζονται με το γενετικό υπόβαθρό της μητέρας και του εμβρύου, καθώς, και με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες (English F, et al. (2015)).

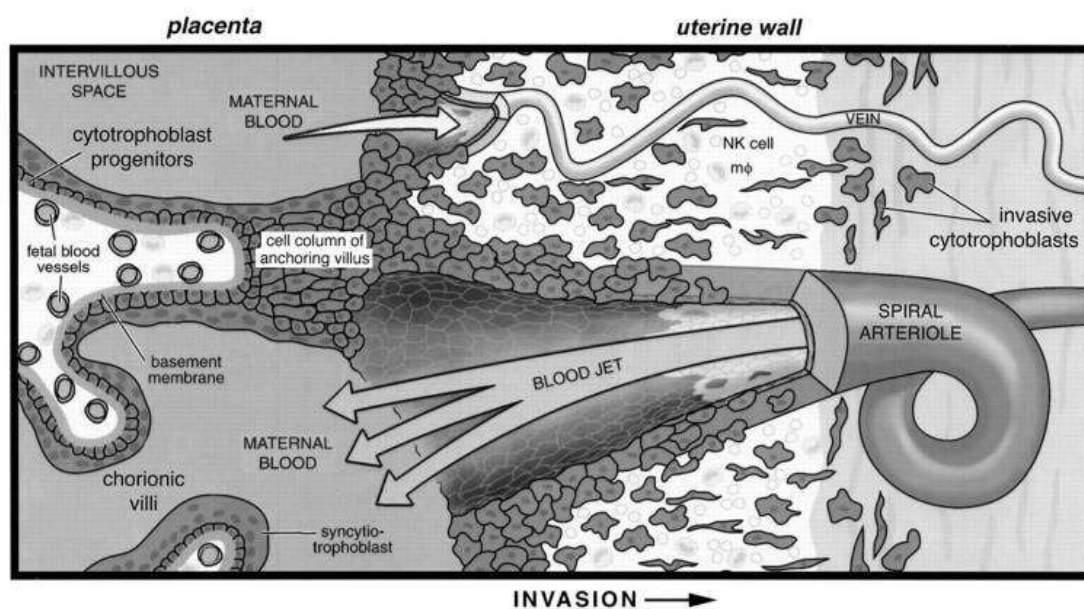
A4.1. 1^ο Στάδιο-Ατελής Πλακουντοποίηση

Περίπου πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο εισέρχεται στην κοιλότητα της μήτρας και αρχίζει το στάδιο ανάπτυξης της βλαστοκύστης. Στο στάδιο αυτό, τα βλαστομερίδια τοποθετούνται σε δύο στοιβάδες. Η πρώτη στοιβάδα είναι η περιφερική και ονομάζεται τροφοβλάστη από την οποία θα σχηματιστούν ο πλακούντας και οι εμβρυϊκές μεμβράνες, καθώς είναι ο ιστός ο οποίος έρχεται σε άμεση επαφή με το ενδομήτριο. Η δεύτερη είναι η εσωτερική και σχηματίζει την έσω κυτταρική μάζα από την οποία θα προκύψει το έμβρυο. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η τροφοβλάστη χωρίζεται σε κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Ακολουθεί το στάδιο της εμφύτευσης, όπου η βλαστοκύστη έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αιματώνεται επαρκώς. Η σωστή εμφύτευση και κατ'επέκταση η επαρκής αιμάτωση του πλακούντα, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κατάλληλου μεταβολικού υποστρώματος και την εξασφάλιση της ανταλλαγής θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Στα πλαίσια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης, κατά τη διάρκεια της 8^{ης} έως την 18^η εβδομάδα, οι κυτταροτροφοβλάστες εισβάλλουν στο αρτηριακό τοίχωμα της μητέρας, προκαλώντας αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας. Οι σπειροειδείς αρτηρίες από μικρές μυϊκές αρτηρίες διαστέλλονται εντυπωσιακά στο τελικό τους άκρο. 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 (Pijnenborg et al. 2006).

Στα αρχικά στάδια της προεκλαμψίας τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, αποτυγχάνουν να διεισδύσουν στο αρτηριακό τοίχωμα της μητέρας με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται ατελής τροποποίηση των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας.

Αυτές οι ατελής αναδιαμορφωμένες 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).

Η ανώμαλη τροφοβλάστη, επομένως, μπορεί να είναι μια αιτία ατελούς πλακουντιοποίησης, έχοντας ως αποτέλεσμα τον ανεπαρκή μετασχηματισμό των μητρικών σπειροειδών αρτηριών, οδηγώντας σε μια κατάσταση που ονομάζεται ισχαιμία/ υποξία του πλακούντα. Υπό αυτές τις συνθήκες ο ισχαιμικός πλακούντας απελευθερώνει αρκετούς παράγοντες που προκαλούν φλεγμονή όπως: διαλυτούς παράγοντες τύπου κινάσης τυροσίνης (sFlt-1) και τοξικά συσσωματώματα πρωτεϊνών όπως η συσσωματωμένη τρανσθυρετίνη. 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)



Εικόνα 1: Οι κυτταροτροφοβλάστες του πλακούντα εισβάλλουν στο τοίχωμα της μήτρας όπου παραμορφώνουν τις φλέβες και αναστέλλουν εκτεταμένα τα μητρικά σπειροειδή αρτηρίδια.

A4.2. 2^ο Στάδιο-φλεγμονώδης ανοσολογική απόκριση

Η ανεπαρκής εισβολή των κυτταροτροφοβλαστών μετά την ατελής αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών εκθέτει τον πλακούντα σε οξειδωτικό στρες.

Το δεύτερο στάδιο της διαταραχής προκύπτει επειδή ο ισχαιμικός πλακούντας και το αυξημένο οξειδωτικό στρες του πλακούντα προκαλούν υπερβολική συστηματική φλεγμονή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που εκδηλώνεται ως υπέρταση και πρωτεϊνουρία.

Το τελικό αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες στην προεκλαμψία είναι η υπερβολική νέκρωση του πλακούντα ή η απόπτωση. Ο νεκρωτικός πλακούντας απορρίπτει μικροσωματίδια συγκυτιοτροφοβλαστών στη μητρική κυκλοφορία, δημιουργώντας φλεγμονώδες φορτίο και επηρεάζοντας έμμεσα την ενδοθηλιακή λειτουργία.

Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο παράγοντες όπως: προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, δείκτες οξειδωτικού στρες, θρομβομοντουλίνη, ινωδονεκτίνη, ενδοθηλίνη-1 και ο παράγοντας Von Willebrand. Αποτέλεσμα της έκκρισης των παραπάνω παραγόντων είναι η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου το οποίο περιλαμβάνει: υπέρταση, ισχαιμική καρδιοπάθεια, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκία.

Επίσης, αυξημένα επίπεδα συσσωματωμένης τρανσθυρετίνης μεταφέρονται μέσω της έκκρισης εξωκυτταρικών κυστιδίων από τον πλακούντα. Η συσσωρευμένη τρανσθυρετίνη σε αυτά τα κυστίδια μπορεί επίσης να επιτρέψει τη στοχευμένη απελευθέρωση αυτών των τοξικών πρωτεϊνών σε άλλα μητρικά όργανα, διεξάγοντας ένα σήμα κυτταρικού στρες από τον ασθενή πλακούντα και συμβάλλοντας στην παθογένεια της προεκλαμψίας. Τα τοξικά συσσωματώματα πρωτεϊνών είναι μια νέα προσέγγιση και έχουν θεωρηθεί παθογόνα σε άλλες ασθένειες, επομένως πρέπει επίσης να εξεταστεί η πιθανότητα να συμβάλλουν στην υπερβολική φλεγμονή στην προεκλαμψία μέσω της δημιουργίας κυτταρικού στρες.

A4.3. Προκαλιτονίνη (PCT) και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)

Ο ρόλος των φλεγμονωδών δεικτών με αυξημένα επίπεδα στην προεκλαμψία έχει επίσης διερευνηθεί, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου της προκαλιτονίνης (PCT) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP). Το PCT είναι ένας πρόδρομος της καλσιτονίνης και χρησιμοποιείται ως δείκτης βακτηριακής λοίμωξης και προκύπτουσας συστηματικής φλεγμονής. Ο ακριβής ρόλος της PCT και της CRP στην προεκλαμψία παραμένει αμφισβητούμενος.

Έχει καθιερωθεί ότι το ανθρώπινο μικροβιακό φορτίο διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων. Η μικροβιακή ανοσολογική αλληλεπίδραση διαμεσολαβείται μέσω σχετιζόμενων μικροβιακών μοριακών μοτίβων, όπως για παράδειγμα ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης ενδοτοξίνης (LPS), ο οποίος αναγνωρίζεται από κυτταρικούς υποδοχείς τύπου Toll (TLRs). Οι ερευνητές έχουν καθιερώσει το LPS να είναι ένα εξωτερικό ερέθισμα, το οποίο είναι ικανό να προκαλέσει υπέρταση και πρωτεϊνουρία όμοια με της προεκλαμψίας σε εγκύους αρουραίους. Σε αυτό το συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο ανθρώπινης προεκλαμψίας, το λιπιδικό A / LPS, ένα γνωστό προ-φλεγμονώδες ερέθισμα, προκάλεσε συστηματική φλεγμονή και συσχετίστηκε με τις κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας.

Σε μελέτη του Cotechini et al. που πραγματοποιήθηκε σε εγκύους αρουραίους, η χορήγηση LPS προκάλεσε συστηματική και τοπική φλεγμονώδη απόκριση, περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου (FGR) και αύξηση της μέσης αρτηριακής πίεσης, μέσω μηχανισμού που προκαλείται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε έλλειψη εισβολής τροφοβλάστης και διαταραχή της επαναμορφοποίησης σπειροειδούς αρτηρίας χαρακτηριστική της προεκλαμψίας, που συνδέεται με FGR που επάγεται από LPS. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν από τους Xue et al. που έδειξαν ότι μία μόνο χορήγηση LPS σε εγκύους αρουραίους προκάλεσε φλεγμονή ειδικά δεσμευόμενη στον υποδοχέα της, την TLR-4 στον πλακούντα. Η σηματοδότηση TLR-4 στον πλακούντα συσχετίστηκε με έλλειψη εισβολής τροφοβλαστών και αναδιαμόρφωση σπειροειδούς αρτηρίας συμβάλλοντας σε ατελή πλακουντοποίηση που μπορεί να οδηγήσει σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της προεκλαμψίας.

Τελικά, όλοι αυτοί οι εκκρινόμενοι παράγοντες του πλακούντα, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριακής ενδοτοξίνης, είναι ικανά να διαταράξουν την ισορροπία του ανοσοποιητικού συστήματος και να προκαλέσουν συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

A5. Αντι-αγγειογενείς παράγοντες στην προεκλαμψία

Η αγγειογένεση είναι κρίσιμη για τη βελτίωση της αιματικής κυκλοφορίας του πλακούντα καθώς ο σχηματισμός νέων αγγειακών στρωμάτων επιτρέπει την αγγειακή ανάπτυξή του, καθιστώντας επιτυχής την πλακουντοποίηση. Ένας ισχαιμικός πλακούντας μπορεί να διακόψει, έμμεσα, τη διαδικασία της πλακουντοποίησης μέσω διαφόρων παραγόντων. Οι προ-αγγειογόνοι παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PlGF) σε συνδυασμό με αντι-αγγειογενείς πρωτεΐνες είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη του πλακούντα, την αγγειοποίηση και τη διατήρηση της υγείας των αγγείων του. Αυτοί οι παράγοντες λειτουργούν ως βιοδείκτες που αντικατοπτρίζουν μοναδικά πρότυπα στην προεκλαμψία ανάλογα με τη σοβαρότητα και την ηλικία κύησης κατά την εμφάνιση της διαταραχής.

Η προεκλαμψία σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα αγγειοδιασταλτικών, όπως το νιτρικό οξείδιο (NO) και την προστακυκλίνη, ως αποτέλεσμα της δυσανάλογης αύξησης των αντι-αγγειογενών παραγόντων sFlt-1 και sEng και της μείωσης των αγγειογενών παραγόντων VEGF και PlGF.

A5.1. VEGF

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF είναι απαραίτητος για την αγγειογένεση εξαιτίας της προ-αγγειογόνου δράσης τους που επάγει αγγειακή διαπερατότητα και προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των επιθηλιακών κυττάρων. Ο VEGF θεωρείται ότι εκκρίνεται από κύτταρα τροφοβλαστών και είναι απαραίτητος για την ακεραιότητα των μητρικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Alon T, et al. 1995). Αλληλεπιδρά με δυο υψηλής συγγενείας υποδοχείς με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, τους KDR και Flt-1, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Ο sFlt-1 είναι ένας αντί-αγγειογενετικός παράγοντας που είναι σε θέση να αποκλείσει τη δράση του VEGF παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς του. Ο VEGF μπορεί να προκαλέσει αγγειοδιαστολή με διέγερση της οδού αγγειακής χαλάρωσης του νιτρικού οξειδίου καθώς και με αύξηση της παραγωγής των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}).

Αύξηση των επιπέδων των ιόντων ασβεστίου προάγει τη δέσμευση νιτρικού οξειδίου (NO) στο ενδοθήλιο (eNOS) αυξάνοντας την ενεργότητα του, με αποτέλεσμα να διεγείρει την παραγωγή NO. Η εξουδετέρωση του VEGF και η περίσσεια sFlt-1 φαίνεται να συμβάλουν στην παθογένεση του μητρικού συνδρόμου της προεκλαμψίας, καθώς, μία πτώση του VEGF έχει ως αποτέλεσμα σπειραματική ενδοθηλίωση, μια ειδική ενδοθηλιακή νεφρική βλάβη που παρουσιάζει πρωτεϊνουρία (Lam, et al. 2005). Η χορήγηση sFlt1 σε εγκύους αρουραίους προκαλεί υπέρταση, πρωτεϊνουρία και σπειραματική ενδοθηλιοπάθεια, συμπτώματα κλασικά της προεκλαμψίας (Maynard et al 2003).

A5.2. PlGF

Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων PlGF παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση του πλακούντα, καθώς, όπως και ο VEGF, εκκρίνεται από κύτταρα τροφοβλαστών και συμβάλλει στην αγγειακή διαπερατότητα και στον πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο ρόλος του PlGF είναι λιγότερο κατανοητός από αυτόν του VEGF, αλλά φαίνεται να διεγείρει την αγγειογένεση υπό συνθήκες ισχαιμίας, φλεγμονής και επούλωσης τραύματος, ενώ μπορεί να συνεισφέρει και στην αθηροσκλήρωση (Luttun A, et al. 2002). Ο PlGF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από τον ανθρώπινο πλακούντα ενώ τα ομοδιμερή του δεσμεύονται στον υποδοχέα Flt-1 με υψηλή συγγένεια (Powe, et al. 2011). Όπως και στην περίπτωση του VEGF, ο sFlt-1 είναι σε θέση να αποκλείσει τη δράση του PlGF παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς του. Η χαμηλή συγκέντρωση του PlGF είναι ικανή να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, συμβάλλοντας στην παθογένεια της προεκλαμψίας.

A5.3. sEng

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 κυττάρων. 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 αναστολή της σηματοδότησης του TGF-β1 θα οδηγήσει σε μειωμένη αγγειοδιαστολή εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο και αυξημένη απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων. 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).

A6. Σύστημα ανοσίας και προεκλαμψία

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική ρύθμιση για να εξασφαλίσουν μια επιτυχής εγκυμοσύνη, για την οποία απαιτείται ο συντονισμός μεταξύ ενός δεκτικού ενδομητρίου και της βλαστοκύστης που πρόκειται να εμφυτευτεί. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως οι φυσικοί φονείς dNK, τα μακροφάγα, τα T κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) βρίσκονται στο φθαρτό σε ποσοστό 30-40% στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Loke et al 1995). Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (dNK), καταλαμβάνουν το 70% των ανοσοκυττάρων στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και αποτελούν σημαντική πηγή ανοσορυθμιστικών κυτοκινών, μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) και αγγειογόνων παραγόντων. Οι παραπάνω παράγοντες προάγουν βασικές διεργασίες στην πλακουντοποίηση, όπως, η επαναμορφοποίηση της μήτρας, η διείσδυση της τροφοβλάστης και η αγγειογένεση. Τα μακροφάγα τα οποία βρίσκονται σε ποσοστό <30% κατά το πρώτο τρίμηνο, εκκρίνουν επίσης παράγοντες που συμβάλλουν στον ανασχηματισμό των ιστών και στην αγγειογένεση, όπως ο MMP9 και ο VEGF. Τα μακροφάγα αποτελούνται κυρίως από τον ανοσορυθμιστικό φαινότυπο (M2) και συμβάλλουν στη δημιουργία ενός ανοσοποιητικού ανοσολογικού περιβάλλοντος με την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών, όπως IL-10 και IL-35, προκαλώντας την έκφραση ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs), φαγοκυτταρικών αποπτωτικών τροφοβλαστικών κυττάρων για την πρόληψη της απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών ουσιών και την αναστολή της κυτταροτοξικής λειτουργίας των dNK κυττάρων. Τα T κύτταρα (<20%) κυριαρχούν στον φαινότυπο CD8⁺ και παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της εισβολής των τροφοβλαστών, ενώ τα CD4⁺ T κύτταρα προάγουν την ανοχή στο έμβρυο. Τέλος, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs), παρόλο που εμφανίζονται σε πολύ μικρούς αριθμούς στο φθαρτό, πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην οδήγηση της διαφοροποίησης των CD4⁺ T κυττάρων σε ένα Th2 φαινότυπο και στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και ενεργοποίησης των dNK.

Η ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων μέσω της επαρκούς ενεργοποίησης των dNK κυττάρων, των μακροφάγων και των T κυττάρων, παίζει ρόλο στις διαδικασίες εμφύτευσης, πλακουντοποίησης και εξέλιξης της εγκυμοσύνης. 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 ρυθμιστικά προϊόντα, οι κυτοκίνες και άλλοι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που απελευθερώνονται από τον πλακούντα από συνκυτιοτροφοβλάστες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση μεταξύ κυττάρων του φλεγμονώδους δικτύου. Η προεκλαμψία έχει συσχετιστεί με τη διάσπαση πολλών από αυτές τις φυσιολογικές διεργασίες. Ένας ισχαιμικός πλακούντας έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων με τη συνεχή απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων στη μητρική κυκλοφορία. 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). Συγκεκριμένα, η ανισορροπία των υποομάδων Th, η ανώμαλη ενεργοποίηση των dNK κυττάρων και η υπερβολική πρόσληψη εγγενών κυττάρων ανοσίας είναι κυρίως υπεύθυνες για τη διακοπή της ρύθμισης της ανοσολογικής ισορροπίας κατά την εγκυμοσύνη. 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)

A7. Γενετικό υπόβαθρο της νόσου

Από τον 19^ο αιώνα έχουν καταγραφεί περιστατικά προεκλαμψίας ανάμεσα σε μέλη οικογενειών, γεγονός που υποδηλώνει το γενετικό υπόβαθρο της διαταραχής. Η εμφάνιση της συγκεκριμένης διαταραχής σε έγκυες γυναίκες, καθώς, και ο αναγκαίος έλεγχος δύο γονοτύπων, του εμβρύου και της μητέρας, καθιστούν τη διαλεύκανση του γενετικών αιτιών της διαταραχής μια πρόκληση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η προεκλαμψία φαίνεται να ακολουθεί τους νόμους κληρονομικότητας του Mendel, μεταβιβάζεται δηλαδή μέσω μίας μονογονιδιακής γενετικής αλλαγής, με υψηλή διεισδυτικότητα. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η προεκλαμψία αντιπροσωπεύει μία σύνθετη γενετική διαταραχή που προκύπτει από πολυάριθμες κοινές γενετικές αλλαγές σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος. Η κάθε μία από αυτές έχει μικρή επίδραση, αλλά δρώντας αθροιστικά συνεισφέρουν στην προδιάθεση στη νόσο. Έρευνες σε μονοζυγωτικές αδερφές είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των πιθανοτήτων η προεκλαμψία να κληρονομείται μέσω της μητέρας. Ωστόσο, μια έρευνα που έκανε χρήση του Σουηδικού αρχείου διδύμων κυήσεων υπολόγισε ότι σε ποσοστό 55% η προεκλαμψία κληρονομείται μέσω εμβρυικών και μητρικών γονιδίων. Η παραπάνω μελέτη αποκάλυψε ότι η διεισδυτικότητα της νόσου ήταν μικρότερη από 50% υποδεικνύοντας την ύπαρξη διαφορετικών μοντέλων κληρονομικότητας. Μελέτες επιδημιολογίας σε εγκυμοσύνες που γεννήθηκαν βρέφη με πατέρες οι οποίοι γεννήθηκαν από προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες, έδειξε υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης της διαταραχής. Αμφότερα οι γονείς συνεισφέρουν γενετικά στην εμφάνιση της διαταραχής, με τα εμβρυικά γονίδια να αυξάνουν την αρτηριακή πίεση της μητέρας προκειμένου να βελτιώσουν την μητροπλακουντιακή ροή αίματος, ενώ τα μητρικά γονίδια δρουν με τον αντίθετο τρόπο (Williams & Broughton Pirkin, 2011). Η προεκλαμψία είναι μια σύνθετη γενετική διαταραχή και παράγοντες όπως: οι περιβαλλοντικές εκθέσεις, η ηλικίας και το βάρος καθορίζουν εάν οι γενετικές παραλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα στην εκδήλωση της νόσου.

Είναι πιθανό ότι δεν υπάρχει καμία αιτία ή γενετική παραλλαγή που να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις της προεκλαμψίας, αν και είναι πιθανό ότι διάφορες παραλλαγές συνδέονται με τους διαφορετικούς φαινότυπους της προεκλαμψίας.

A7.1. Μελέτη υποψήφιων γονιδίων

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί το γενετικό υπόβαθρο της προεκλαμψίας, έχουν μελετηθεί μέσω της προσέγγισης του υποψήφιου γονιδίου (candidate gene approach), διάφορα γονίδια που αφορούν κυρίως στο γονότυπο της μητέρας. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην επιλογή ενός γονιδίου ως υποψήφιο για διερεύνηση, το οποίο πιθανόν να διαδραματίζει κάποιο βιολογικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο μοντέλο μελέτης είναι αυτό των ασθενών-μαρτύρων, το οποίο συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ των δύο ομάδων. Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί πάνω από 70 γονίδια, τα οποία συμμετέχουν σε βιολογικές διαδικασίες, όπου διαταραχές σε αυτές ευθύνονται για την εμφάνιση προεκλαμψίας. Στις διαδικασίες αυτές συμπεριλαμβάνονται: η αγγειοδιαστολή, η θρομβοφιλία, το οξειδωτικό στρες, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η ενδοθηλιακή λειτουργία και η ανοσολογική απόκριση. (Mutze *et al.*, 2008)

A7.1.1. Γονίδια αγγειοδιαστολής

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

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

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

Σύμφωνα με τις αλλαγές στην ρενίνη και την αγγειοτενσίνη II (Ang II), η αλδοστερόνη αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και είναι σχετικά χαμηλή στις εγκυμοσύνες που εμφανίζεται προεκλαμψία. Το χαμηλό επίπεδο αλδοστερόνης μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μειωμένη αύξηση όγκου και την προκύπτουσα φτωχή εμφάνιση πλακούντα στην προεκλαμψία, γι'αυτό και αποτελεί σημαντικό γονίδιο στόχο. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων τροφοβλαστών ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυξήθηκε μετά την διέγερση του γονιδίου αλδοστερόνης, καταδुकνεύοντας την σημαντικότητα της έλλειψης της δράσης του στην διαταραχή (Gennari-Moser, *et al.*, 2011). Θετικές ή προσθετικές μεταλλάξεις του γονιδίου CYP11B2 γνωστού και ως συνθάση της αλδοστερόνης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (Escher, *et al.*, 2009).

A7.1.2. Γονίδια θρομβοφιλίας

Ο παράγοντας V Leiden (FVL) ή F5 είναι ένας από τους πιο μελετημένους θρομβοφιλικούς παράγοντες, με πιθανό ρόλο στην προεκλαμψία. Στη δεκαετία του 1990 ο παράγοντας V Leiden (επίσης γνωστός ως παράγοντας V G1691A) και η προθρομβίνη (G20210A) αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι σχετίζονται με υπερπηκτική κατάσταση, ενώ ταυτοποιήθηκαν ως παράγοντες κινδύνου για φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση. Ακόμη, πολυάριθμες μελέτες έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό PT 20210 του παράγοντα V Leiden με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας.

A7.1.3. Γονίδια οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της μικροσωμικής εποξειδικής υδρολάσης (EPHX), που καταλύει την υδρόλυση ορισμένων οξειδίων ικανών να παράγουν τοξικά ενδιάμεσα προϊόντα, όπως και η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση ή GST, ένα αντιοξειδωτικό, θα μπορούσαν να εμπλακούν στην προεκλαμψία (Canto *et al.*, 2008). Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την διαμεσολάβηση του NRF2, βρίσκεται στην κορυφή του καταλόγου τέτοιων οδών. Το NRF2 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες ρυθμίζοντας την έκφραση των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης ή AREs (Mann *et al.*, 200). Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν το NRF2, το οποίο μετατοπίζεται στο πυρήνα, όπου δεσμεύεται με αλληλουχίες ARE, οδηγώντας στη μεταγραφική ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Ishii *et al.*, 2000). Συνολικά, η αύξηση έκφρασης του NRF2 μπορεί να υποδεικνύει αμυντική απόκριση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην προεκλαμψία.

A7.1.4. Γονίδια μεταβολισμού των λιπιδίων

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

A7.1.5. Γονίδια ενδοθηλιακής λειτουργίας

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι χαρακτηριστική της προεκλαμψίας, που σχετίζεται με την υπέρταση και την πρωτεϊνουρία. Μεταξύ των διαφόρων διαμεσολαβητών που απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο, το νιτρικό οξείδιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας (Williams & Morgan, 2012). Μέσα στο καρδιαγγειακό σύστημα το ενδοθηλιακό ισόμορφο της συνθετάσης νιτρικού οξειδίου (eNOS) είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση νιτρικού οξειδίου. Μειωμένη έκφραση της eNOS συνεπάγεται μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα νιτρικού οξειδίου που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την προεκλαμψία (Sandrim *et al.*, 2008). Το γονίδιο eNOS, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q35-7q36, έχει μήκος 21 έως 22 Kb και αποτελείται από 26 εξόνια και 25 ιντρόνια (Miyahara *et al.*, 1995). Μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών έχουν ταυτοποιηθεί για το γονίδιο eNOS, συμπεριλαμβανομένων επαναλαμβανόμενων διαδοχικών επαναλήψεων του δινουκλεοτίδιου CA (Marsden *et al.*, 1993), αρκετοί από αυτούς έχουν συσχετιστεί με την προεκλαμψία και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις. Επίσης, έχει συσχετιστεί με την ενδοθηλιακή λειτουργία, η συνθετάση ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου 3 (eNOS3), πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην αγγειακή αναδιαμόρφωση και αγγειοδιαστολή και έχει δειχθεί ότι έχει μειωμένη δραστηριότητα σε μελέτες προεκλαμψίας (Brenecke *et al.*, 1997).

Ακόμη, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι σημαντικός για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση τους, την επιβίωση και τη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας (Papazoglou *et al.*, 2004). Δύο πολυμορφισμοί στο γονίδιο που εκφράζει τον παράγοντα VEGF, οι 405G>C και 936C>T, βρέθηκαν να σχετίζονται με τη σοβαρή μορφή της προεκλαμψίας (Banyasz *et al.*, 2006). Η διαλυτή κινάση τυροσίνης τύπου fms 1 (sFLT1) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12, δεσμεύει τον VEGF με υψηλή συγγένεια εμποδίζοντας τον να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα του, με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του VEGF (Chen, 2009).

A7.1.6. Γονίδια ανοσολογικής απόκρισης

Δύο θεωρίες φαίνεται να είναι αλληλένδετες στην ανώμαλη πλακουντοποίηση, η γενετική θεωρία και η ανοσολογική θεωρία. Γονίδια που έχουν συνδεθεί με την προεκλαμψία πιθανώς αλληλεπιδρούν στα αιμοστατικά και τα καρδιαγγειακά συστήματα, καθώς και στη φλεγμονώδη αντίδραση. Ορισμένα έχουν εντοπιστεί, και παρείχαν αποδείξεις σύνδεσης τους με την διαταραχή, συμπεριλαμβανομένου εκείνου της αγγειοτενσίνης στο χρωμόσωμα 1q42-43 (Mutze *et al.*, 2008). Η προεκλαμψία μπορεί να θεωρηθεί ως βλάβη του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος που το εμποδίζει να αναγνωρίσει την εμβρυοπλακουντιακή μονάδα. Υπερβολική παραγωγή κυττάρων ανοσίας προκαλεί έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TGF- α) η οποία επάγει την απόπτωση του εξωβιλώδους κυτταροτροφοβλάστη (Genbacev *et al.*, 1999). Επίσης το σύστημα ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA φαίνεται να παίζει ρόλο στην ελαττωματική εισβολή των σπειροειδών αρτηριών, καθώς οι γυναίκες με προεκλαμψία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα των HLA-G και HLA-E (Colbern *et al.*, 1994)

A7.2. Φλεγμονώδεις παράγοντες

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

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

A8. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS)

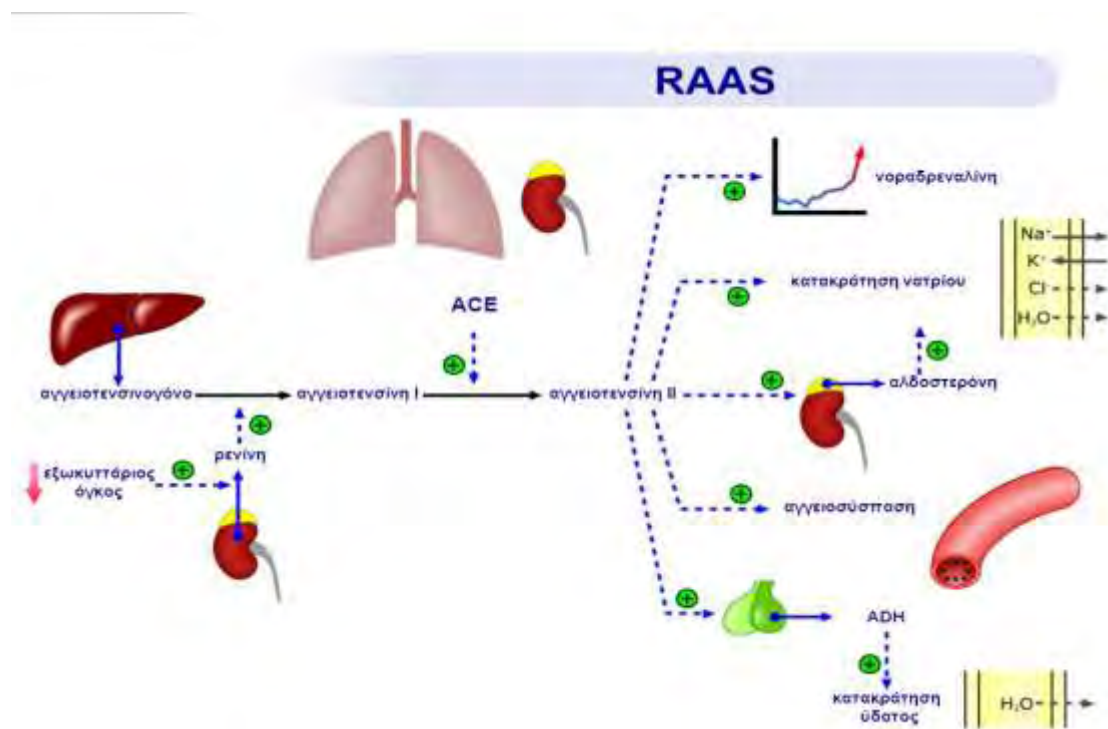
Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης είναι ένα ορμονικό σύμπλεγμα, το οποίο συμμετέχει στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Ο τρόπος δράσης του βασίζεται στην επαναρρόφιση του νατρίου μέσω του ελέγχου της έκκρισης της αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη η οποία παράγεται από το φλοιό των επινεφριδίων. Όταν ένα άτομο καταναλώνει πολύ νάτριο, η έκκριση της αλδοστερόνης είναι μικρή, ενώ, αυτή αυξάνεται όταν κάποιος ακολουθεί δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο ή για κάποιο λόγο έχει εξαντλήσει το σωματικό του νάτριο. Ο υπεύθυνος παράγοντας για τη ρύθμιση της έκκρισης της αλδοστερόνης είναι η ορμόνη αγγειοτενσίνη II (ANG II), η οποία αποτελεί συστατικό του συστήματος ρενίνης- αγγειοτενσίνης. Η ρενίνη (REN) είναι ένα ένζυμο το οποίο εκκρίνεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα του νεφρού. Η κυκλοφορία της στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση ενός μικρού πολυπεπτιδίου της αγγειοτενσίνης I (ANG I) από ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα του πλάσματος, το αγγειοτενσινογόνο το οποίο παράγεται από το ήπαρ. Στη συνέχεια η αγγειοτενσίνη I διασπάται περαιτέρω και σχηματίζεται η αγγειοτενσίνη II, όπου αποτελεί τον ενεργό παράγοντα του συστήματος RAS. Η μετατροπή αυτή διαμεσολαβείτε από ένα ένζυμο, γνωστό ως ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE), το οποίο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη ενδοαυλιακή επιφάνεια των τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων και ειδικά στα τριχοειδή αγγεία των πνευμόνων. Οι περισσότερες από τις επιδράσεις του ANG II λειτουργούν μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων AT1 οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των λείων αγγειακών μυϊκών κυττάρων και στα επινεφρίδια.

Ο υποδοχέας AT1 υποδέχεται την πρωτεΐνη Gq, που λειτουργεί στην οδό σηματοδότησης αύξησης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Η ενεργοποίησή του προωθεί την αγγειοσυστολή, την συμπαθητική δραστηριότητα και την απελευθέρωση αλδοστερόνης. Ο υποδοχέας AT2 εκφράζεται στο νεφρό του εμβρύου και η έκφρασή του μειώνεται κατά τη νεογνική περίοδο (Ozono *et al.*, 1997). Στους ενήλικες νεφρούς ο AT2 βρίσκεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από τον AT1 και η

διέγερση του εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, αυξάνει την απόπτωση τους, προκαλεί αγγειοδιαστολή και εμπλέκεται στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού ιστού (Grishko *et al.*, 2003).

Η αγγειοτενσίνη II, η οποία εκτός από τη ρύθμιση έκκρισης της αλδοστερόνης είναι υπεύθυνη και για τη συστολή των αρτηριδίων, είναι υψηλή όταν το σωματικό νάτριο είναι εξαντλημένο και χαμηλή όταν το άτομο έχει επαναπληρώσει το σωματικό του νάτριο. Το αγγειοτενσινογόνο και το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης βρίσκονται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε υψηλή και αμετάβλητη συγκέντρωση και έτσι ο περιοριστικός παράγοντας παραγωγής αγγειοτενσίνης II είναι η συγκέντρωση ρενίνης στο πλάσμα. Συνήθως η συγκέντρωση αυτή εξαρτάται από τη νεφρική έκκριση της ρενίνης.

Συμπερασματικά η αλληλουχία των γεγονότων στην περίπτωση εξάντλησης του σωματικού νατρίου είναι: αυξημένη έκκριση ρενίνης-αυξημένη συγκέντρωση ρενίνης πλάσματος-αυξημένη συγκέντρωση αγγειοτενσίνης πλάσματος-αυξημένη έκκριση αλδοστερόνης-αυξημένη συγκέντρωση αλδοστερόνης πλάσματος.



Εικόνα 2: 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, καθώς, έχουν ανακαλυφθεί τοπικά ή RAS (Paul, et. 2006). Το τοπικό σύστημα ρενίνης-αγγεοτενσίνης 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 το λιπώδη ιστό. Ακόμη η ρενίνη, το αγγειοτενσινογόνο, το ACE, οι ANG I και II, όπως και ο υποδοχέας AT1, έχουν ταυτοποιηθεί στους ιστούς του πλακούντα. Επίσης, στις σπειροειδής αρτηρίες του ενδομήτριου, εκφράζεται το αγγειοτενσινογόνο, η ρενίνη, το ACE και ο AT1 υποδοχέας (Morgan *et al.*, 1998). Επομένως στις εγκυμονούσες γυναίκες, το ενδομήτριο και ο πλακούντας περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για ένα λειτουργικό σύστημα (RAS).

Αυτά τα τοπικά συστήματα φαίνεται να ρυθμίζονται ανεξάρτητα από το κυκλοφορικό σύστημα RAS, ωστόσο μπορούν και να αλληλεπιδράσουν με αυτό. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα τοπικά αποτελέσματα του RAS θα μπορούσαν να εμφανιστούν στο κύτταρο που παράγει τα πεπτίδια, σε γειτονικά κύτταρα (παρακρινή λειτουργία) ή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό (ενδοκρινική λειτουργία) (Oliveira, et al. 2008).

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).

A8.1. Σύστημα (RAS) και προεκλαμψία

Στα πλαίσια της διερεύνησης της παθογένειας της προεκλαμψίας προκειμένου να αποσαφηνιστούν τα αίτια της εμφάνισης της και να τεθεί η νόσος υπό έλεγχο, μελετήθηκε και η πιθανή εμπλοκή του RAS στην εκδήλωσή της. Πράγματι, μελέτες έχουν αποδείξει πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) στις προεκλαμπτικές γυναίκες σε σύγκριση με τις υγιείς εγκύους. Έχει βρεθεί, πως εκτός από το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE), η ρενίνη, η αγγειοτενσίνη I, η αγγειοτενσίνη II και η αλδοστερόνη παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις στο περιφερικό αίμα στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Shah, 2005). Αντίθετα σε γυναίκες με προεκλαμψία η δραστηριότητα της ρενίνης του πλάσματος και της αλδοστερόνης καταστέλλονται, με εκείνη της αλδοστερόνης να βρίσκεται σχετικά σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το επίπεδο της ρενίνης, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη επινεφρίδια ευαισθησία στο ANG II.

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη σχετίζεται με μειωμένη αγγειακή ανταπόκριση στο ANG II και η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στο ANG II που μπορεί να αναπτυχθεί πριν από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Η αύξηση της σηματοδοτικής αλληλουχίας μεταξύ του ANG II και του $\alpha 1$ -επινεφριδιακού υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα κυτταρικά γεγονότα, τα οποία, μαζί με τα αυξημένα επίπεδα sFlt1, εξηγούν τα πρωτογενή παθογόνα χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας. Κατά τη φυσιολογική εγκυμοσύνη οι AT1 υποδοχείς αδρανοποιούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου που οδηγούν σε χαμηλότερη ευαισθησία στην σύνδεση του με την αγγειοτενσίνη II (AbdAlla *et al.*, 2001), ενώ στην προεκλαμψία, ο υποδοχέας AT1 βρίσκεται συνδεδεμένος με τον υποδοχέα βραδυκινίνης (B2), με αποτέλεσμα αυτά τα ετεροδιμερή AT1/B2 να παρουσιάζουν αντοχή στην αδρανοποίηση μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και να παραμείνει ενεργός για την αγγειοτενσίνη ANG II (Ariza, *et al.*, 2007).

Τα οιστρογόνα διεγείρουν τη σύνθεση του αγγειοτενσινογόνου με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων κυκλοφορικής αγγειοτενσίνης κατά τις πρώτες 20 εβδομάδες κύησης. Στην προεκλαμψία φαίνεται ότι υπάρχει σχετική αύξηση του υψηλού μοριακού βάρους της αγγειοτενσίνης (Verdonk *et al.*, 2014). Πολυμορφισμοί του γονιδίου της αγγειοτενσίνης που αυξάνουν τα επίπεδα αγγειοτενσινογόνου στο πλάσμα έχουν επίσης συσχετιστεί με την προεκλαμψία, με τον μηχανισμό να εμπλέκει τη μείωση της ρενίνης, που είναι η συνέπεια αυτών των αυξημένων επιπέδων αγγειοτενσίνης. Η Αγγειοτενσίνη 1-7 αποτελεί βασικό συστατικό του (RAS) και εμφανίζει ανταγωνιστικές δράσεις της Αγγειοτενσίνης II, ενεργώντας ως ρυθμιστής του αγγειακού τόνου και απελευθερώνοντας μονοξείδιο του αζώτου (NO) και προσταγλανδίνες (Ueki *et al.*, 2015). Η Αγγειοτενσίνη 1-7 δημιουργείται από την ATII από το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) (Brosnihan, *et. al.*, 2004). Η Αγγειοτενσίνη 1-7 του πλάσματος αυξάνεται στην κανονική εγκυμοσύνη και μειώνεται στην προεκλαμψία, και κάτι τέτοιο είναι συμβατό με τα διαφορετικά ποσοστά των προϊόντων της ATII που μπορεί να έχουν σχέση με την υπέρταση και μεταβολικά ελαττώματα στην προεκλαμψία (Merrill, *et. al.*, 2002). Σε αντίθεση, έχει προταθεί πως η διαταραχή οφείλεται στην παρουσία αγωνιστικών αυτοαντισωμάτων ή AA που δεσμεύονται και ενεργοποιούν τον υποδοχέα αγγειοτενσίνης II τύπου 1 (Dechend, *et. al.*, 2003). Ανοσοσφαιρίνες του ορού γυναικών με προεκλαμψία διεγείρουν τον υποδοχέα AT1, αλλά εκείνες από τις υγιείς έγκυες γυναίκες δεν δείχνουν καμία επίδραση. Η ανοσοσφαιρίνη G ή IgG από προεκλαμπτικές γυναίκες συμβάλλει στην παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου διεγείροντας το NADPH στον αγγειακό λείο μυ κυττάρων και ανθρώπινων τροφοβλαστών (Dechend, *et. al.*, 2003).

Για το τοπικό μητροπλακουντιακό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, έχουν καταγραφεί αμφιλεγόμενα αποτελέσματα τόσο για την υπερβολική έκφραση του υποδοχέα AT1R, την αύξηση των επιπέδων ρενίνης στο ενδομήτριο, όσο και για τα αυξημένα επίπεδα της ANG II και AT1R.

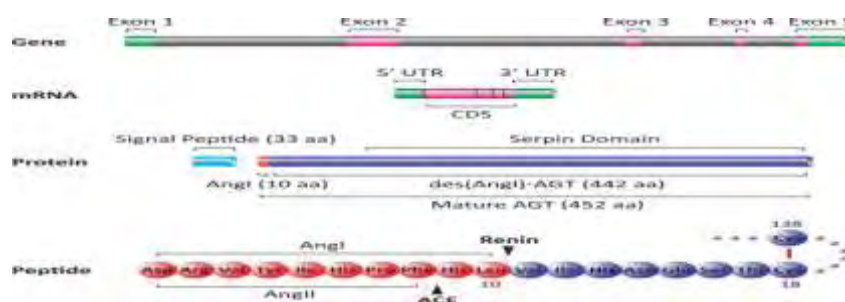
Ακόμη, μελέτες γενετικής σύνδεσης έχουν αποκαλύψει την παρουσία πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν βασικά συστατικά του RAS, έχοντας ως αποτέλεσμα τη διακύμανση της δραστηριότητας και κατ'επέκταση την εμπλοκή του στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας.

A8.2. Αγγειοτενσινογόνο

Το γονίδιο AGT ή αγγειοτενσινογόνο σε ανθρώπους και τρωκτικά κλωνοποιήθηκε, χαρτογραφήθηκε και χαρακτηρίστηκε τη δεκαετία του 1980 (Ohkubo, et al. 1983). Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και η οποία απελευθερώνεται από το ήπαρ καθώς και από άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, των αγγείων, των νεφρών και του λιπώδους ιστού. Αποτελεί γονίδιο ενός αντιγράφου και βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1(1q42.2) (Wu, et al. 2011). Το ανθρώπινο γονίδιο AGT έχει 485 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου 33 αμινοξέων. Τα 10 N-τερματικά αμινοξέα διασπώνται από ρενίνη, προερχόμενη από τους νεφρούς στο πλάσμα, για να παρέχουν αγγειοτενσίνη I (AngI), η οποία είναι η πηγή μιας σειράς ενεργών πεπτιδίων αγγειοτενσίνης. Στη συνέχεια η αγγειοτενσίνης I (AngI) διασπάται από το ενζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης (ACE) για να σχηματίσει την αγγειοτενσίνη II (Ang II), το κύριο βιολογικά ενεργό πεπτίδιο που παράγεται από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Wu, et al. 2011).

Έχει διευκρινιστεί ότι η κυρίαρχη ρύθμιση του AGT γονιδίου συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο, αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις μετα-μεταγραφικής ρύθμισης. Έχει αποδειχθεί ότι η AngII ενισχύει τη σταθερότητα του mRNA του 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).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως πραγματοποιείται ανεξάρτητη ρύθμιση των επιπέδων AGT σε μεμονωμένα τμήματα ιστού, γεγονός που 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).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου AGT γονιδίου και των πρωτεϊνών που προκύπτουν.

A8.3. Συσχέτιση πολυμορφισμών του AGT γονιδίου με παθοφυσιολογικές λειτουργίες

Ήδη από το 1992 είχε περιγραφεί η σχέση μεταξύ των επιπέδων αγγειοτενσίνης και των υψηλότερων επιπέδων αρτηριακής πίεσης μεταξύ των μελών της οικογένειας (Watt et al. 1992). Υψηλότερα επίπεδα αγγειοτενσίνης παρατηρήθηκαν σε οικογένειες στις οποίες οι δύο γονείς και οι απόγονοι είχαν υψηλότερες αρτηριακές πιέσεις. Μελέτες κατέδειξαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αγγειοτενσινογόνου μεταξύ υπέρτασικών και υγιών ατόμων (Jeunemaitre et al., 1992). Η μελέτη κατέδειξε επίσης στοιχεία γενετικής σύνδεση μεταξύ του γονιδίου AGT και της υπέρτασης, ενώ, μελετήθηκαν 15 μοριακές παραλλαγές προκειμένου να προσδιοριστεί η συσχέτισή τους με την υπέρταση (Jeunemaitre et al., 1997).

Η χαρτογράφηση των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου χρησιμοποιείται εκτενώς σε μελέτες συσχέτισμού σε όλο το γονιδίωμα για τον εντοπισμό λειτουργικών παραλλαγών στις αλληλουχίες DNA. Έχουν μελετηθεί διεξοδικά δύο δυνητικές μεταλλάξεις, T174M και M235T, και πολλαπλοί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου, συμπεριλαμβανομένων των A (-6) G και A (-20) C στην περιοχή του εκκινήτη του ανθρώπινου AGT γονιδίου, προκειμένου να διερευνηθεί αν σχετίζονται με κάποια δυσλειτουργία του οργανισμού.

A8.3.1. M235T

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. Οι πιθανοί γονότυποι του πολυμορφισμού είναι: MM, MT, TT. Είναι γνωστό πως κάθε αμινοξύ κωδικοποιείται από μία τριπλέτα νουκλεοτιδίων. Σύμφωνα με το γενετικό κώδικα η τριπλέτα ATG αντιστοιχεί στο αμινοξύ μεθειονίνη, ενώ η τριπλέτα ACG αντιστοιχεί στο αμινοξύ θρεονίνη. Επομένως, ο πολυμορφισμός M235T προκύπτει από την αντικατάσταση της βάσης θυμίνης (T) από την κυτοσίνη (C), οδηγώντας σε αλλαγή αμινοξέως, πρόκειται δηλαδή για μια σημειακή μετάλλαξη.

Μελέτες διαπίστωσαν πως η παραλλαγή M235T σχετίζεται με την υπέρταση που πιθανόν σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα AGT σε διάφορους πληθυσμούς (Corvol et al., 1999, Staessen κ.ά., 1997). Ο πολυμορφισμός αυτός απαντάται συχνότερα στους Ιάπωνες σε σχέση με τους Καυκάσιους.

Στους Καυκάσιους το αλληλίο M είναι πιο συχνό και η παρουσία του T συνδέεται με την υπέρταση. Στους Ιάπωνες, η συχνότητα του T αλληλίου είναι μεγαλύτερη, αλλά δε φαίνεται να συνδέεται με την υπέρταση, όπως ισχύει για τους Καυκάσιους, γεγονός που επισημαίνει τις διαφυλετικές διαφορές, που υπάρχουν στη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων γονοτύπων. Ο γονότυπος TT έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα, γεγονός που συμβάλλει στην υπερδραστηριοποίηση όλου του συστήματος. Συγκεκριμένα, η ομοζυγωτία TT έχει συσχετισθεί με αύξηση 10% των επιπέδων αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα. Μια Βελγική μελέτη υποστήριξε την κληρονομικότητα κατά 90% για τη συγκέντρωση της αγγειοτασίνης και κατά 66% για τη δραστηριότητα της ρενίνης στο πλάσμα, στους άνδρες. Σε μετα-ανάλυση 127 μελετών βρέθηκε ότι ο γονότυπος MT σχετίζεται με αύξηση 5% και ο TT 11%, σε σχέση με τον MM, στα επίπεδα του αγγειοτασινογόνου που μετρώνται στο πλάσμα στους Καυκάσιους¹²⁴. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετισθεί σε πολλές μελέτες με την υπέρταση σε Καυκάσιους, σε Ιάπωνες και σε Βραζιλιάνους, στην τελευταία μάλιστα περίπτωση, υπήρξε ισχυρή συσχέτιση του αλληλίου 235T, με όλους τους φαινότυπους της αρτηριακής πίεσης: συστολική, μέση, διαστολική και πίεση παλμού. Μεταγενέστερη ανάλυση της ίδιας ερευνητικής ομάδας, υποστηρίζει ότι, παρά τις σημαντικές φυλετικές διαφορές στη συχνότητα με την οποία κατανέμονται οι γονότυποι του M235T στους διάφορους πληθυσμούς, υπάρχει σημαντική συσχέτιση του T235 με την ιδιοπαθή υπέρταση, τόσο με τους Καυκάσιους ($p=0,004$) όσο και με τους Ιάπωνες ($p=0,002$). Σε μια μελέτη με Ιάπωνες εργατές, βρέθηκε ότι, σε εκείνους που είχαν το γονότυπο MM για τον πολυμορφισμό M235T, η συστολική αρτηριακή πίεση ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με το γονότυπο MT. Η διαστολική πίεση στους ίδιους ασθενείς ήταν επίσης αυξημένη σε σχέση με τους γονότυπους MT και TT. Η παραπάνω παρατήρηση δεν επιβεβαιώθηκε στην ομώνυμη μελέτη από την πόλη Ohasama της Ιαπωνίας, με 1.245 συμμετέχοντες από το γενικό πληθυσμό, αφού δεν έδειξε συσχέτιση του M235T με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης. Φάνηκε όμως ότι, η παρουσία του γονοτύπου MM συνδέθηκε με υψηλότερη πίεση παλμού και αυτή η διαφορά ήταν μεγαλύτερη στους ηλικιωμένους ασθενείς.

Σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T με την υπέρταση έχει φανεί σε μελέτη με Μαλαισιανούς. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ο γονότυπος TT είχε 1,36 φορές υψηλότερη πιθανότητα να αναπτύξει υπέρταση σε σχέση με τους άλλους γονότυπους, ενώ η παρουσία του αλληλίου T, ανέβαζε τον κίνδυνο στο 1,98.

Επίσης η δραστηριότητα της ρενίνης στο πλάσμα ήταν σημαντικά αυξημένη στους υπερτασικούς σε σχέση με τους νορμοτασικούς. Η παρουσία του T αλληλομόρφου συσχετίστηκε ισχυρά με όλους τους φαινότυπους της αρτηριακής πίεσης (συστολική, μέση, διαστολική και πίεση παλμού), σε μια μελέτη που συμπεριέλαβε συμμετέχοντες από αστική περιοχή της Βραζιλίας. Βρέθηκε μάλιστα γραμμική σχέση μεταξύ του αριθμού των T235 αλληλίων και της αρτηριακής πίεσης, επιβεβαιώνοντας το ρόλο του ως ανεξάρτητου παράγοντα κινδύνου, για την εμφάνιση υπέρτασης σε άνδρες και γυναίκες. Μεταγενέστερη μελέτη από την ίδια περιοχή έδειξε επιπλέον ότι, οι ασθενείς με το αλληλίο T, για το M235T είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ανθεκτική υπέρταση. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε μελέτη με Αιγυπτιακό πληθυσμό. Η παρουσία του αλληλίου T, του M235T, σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία αύξανε τον κίνδυνο εμφάνισης ιδιοπαθούς υπέρτασης. Μια μελέτη έδειξε ότι οι πολύ αγχώδεις άνδρες που είχαν το γονότυπο TT, είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υψηλής αρτηριακής πίεσης, ενώ ο γονότυπος MM φαινόταν να είναι προστατευτικός. Με τον πολυμορφισμό M235T σχετίστηκαν οι μεταβολές στη διαστολική αρτηριακή πίεση, κατά τη διάρκεια εξάσκησης κάτω από το μέγιστο δυνατό επίπεδο έντασης σε υγιείς. Οι συμμετέχοντες που έφεραν το γονότυπο TT δεν είχαν αύξηση της διαστολικής αρτηριακής πίεσης σε σχέση με τους άλλους δύο γονότυπους MM και MT, για τους οποίους καταγράφηκαν αυξήσεις. Μια μελέτη με 2.509 Νιγηριανούς, άνδρες και γυναίκες 25-74 ετών έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του M αλληλίου και των επιπέδων αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα. Τα επίπεδα του αγγειοτασινογόνου ήταν υψηλότερα στους υπερτασικούς. Μεταγενέστερη μελέτη από τη Νιγηρία, με 1.308 συμμετέχοντες, δεν επανέλαβε τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς δε βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T με την υπέρταση στο συγκεκριμένο πληθυσμό. Προγενέστερη μελέτη με 46 οικογένειες, αποτελούμενες από Αμερικάνους Μεξικανικής καταγωγής, από την περιοχή του San Antonio δεν έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T με την ιδιοπαθή υπέρταση. Το ίδιο φάνηκε και από μια μελέτη με Άγγλους Καυκάσιους και σε άλλη με Αφρικανούς από την Καραϊβική¹⁴⁰.

Υπάρχει η άποψη ότι, η επίδραση αυτού του πολυμορφισμού στην εμφάνιση υπέρτασης, εξαρτάται από την πρόσληψη χλωριούχου νατρίου (NaCl). Είναι γνωστό ότι στο 50% των υπερτασικών που αποκαλούνται και ευαίσθητοι στο αλάτι, η αρτηριακή τους πίεση παρουσιάζει διακυμάνσεις με βάση την πρόσληψη ή την αποβολή του αλατιού.

Όπως έδειξε μελέτη με υπερτασικούς, από τους οποίους οι μισοί περίπου ήταν ανθεκτικοί στο αλάτι και οι άλλοι μισοί ευαίσθητοι, ο γονότυπος TT του πολυμορφισμού M235T βρέθηκε ότι συνδέεται με την υπέρταση. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από μελέτη που συμπεριέλαβε 11.384 άνδρες και γυναίκες, ηλικίας 45-79 ετών, που έλαβαν μέρος στη μελέτη EPIC (European Prospective Investigation of Nutrition and Cancer). Η μελέτη έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας αλατιού που καταναλώνεται και της αρτηριακής πίεσης, για όλους τους γονότυπους. Επιπλέον οι γονότυποι MT και TT ανταποκρίθηκαν σε διπλάσιο βαθμό σε σχέση με το γονότυπο MM στη μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης ανά μονάδα μείωσης πρόσληψης αλατιού. Οι διαφορές αυτές παρατηρήθηκαν για όλα τα επίπεδα πρόσληψης αλατιού από τα χαμηλά ως τα υψηλά. Η προεκλαμψία δηλαδή η αύξηση της αρτηριακής πίεσης στη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει συσχετισθεί με τον πολυμορφισμό αυτό και συγκεκριμένα με την παρουσία του T αλληλομόρφου.

Μια πρόσφατη δημοσίευση στην οποία αξιολογήθηκαν 302 υπερτασικά και 191 υγιείς άτομα για τον πολυμορφισμό M235T διαπίστωσε σημαντική διαφορά στην επικράτηση των TT ωμοζυγωτών στον υπερτασικό πληθυσμό (15,9%) έναντι των μαρτύρων (6,3%), ($p < 0,01$) (Tousoulis et al., 2012).

Ακόμη, όσο αφορά το συγκεκριμένο πολυμορφισμό, παρόλο που δεν υπάρχουν άμεσα στοιχεία, μελέτες σε ζώα και πειράματα *in vitro* δείχνουν ότι το γονίδιο 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).

A8.3.2. T174M

Εκτός από τον πολυμορφισμό M235T, έχει μελετηθεί διεξοδικά και ο πολυμορφισμός T174M. Στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό η θρεονίνη έχει αντικατασταθεί από τη μεθειονίνη στη θέση 174. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, όπως και ο M235T προκύπτει από την αλλαγή μιας βάσης οδηγώντας τελικά στην αντικατάσταση ολόκληρου του αμινοξέως. Η αλλαγή εντοπίζεται στο δεύτερο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας, όπου η βάση κυτοσίνη (C) αντικαθίσταται από τη θυμίνη (T), μετατρέποντας έτσι τη θρεονίνη σε μεθειονίνη, πρόκειται πάλι δηλαδή για μία σημειακή μετάλλαξη. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, ο οποίος εντοπίζεται στο εξόνιο 2 του γονιδίου AGT, σχετίζεται με παράγοντες κινδύνου ή επικράτηση της στεφανιαίας νόσου (Gardemann, et al. 1999). Το M αλληλόμορφο έχει σχετισθεί με αυξημένα επίπεδα συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης. Ο πολυμορφισμός αυτός όμως, έχει συνδεθεί με την εμφάνιση υπέρτασης στην περίπτωση μόνο, που συνυπάρχουν επιπλέον γενετικοί ή/και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως αυξημένη πρόσληψη νατρίου και/ή κατανάλωση αλκοόλ. Συγκεκριμένα μια μελέτη σε 2.823 Ιάπωνες άνδρες και γυναίκες ηλικίας 30-74 ετών, έδειξε ότι ο πολυμορφισμός T174M και συγκεκριμένα το M αλληλόμορφο (TM+MM έναντι TT), συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης σε νέους μη παχύσαρκους. Η σχέση αυτή ήταν περισσότερο ισχυρή μεταξύ εκείνων που κατανάλωναν υψηλότερη ποσότητα αλατιού στην καθημερινή διατροφή τους. Σε μια μελέτη από το Αραβικό Εμιράτο δε φάνηκε καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού T174M με την ιδιοπαθή υπέρταση. Αντίθετα μια μεγάλη μεταανάλυση, 43 μελετών με 26.818 ασθενείς, βρήκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού T174M με την υπέρταση.

A8.3.3. Μελέτες και με τους δύο πολυμορφισμούς: AGTM235T και AGTT174M

Η πρώτη μελέτη που έδειξε σημαντική συσχέτιση με την υπέρταση για τους δύο πολυμορφισμούς, τον AGTM235T και τον AGTT174M, από τους 15 που εξετάστηκαν συνολικά, σε Καυκάσιους ασθενείς ήταν των Jeunemaitre et al. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν δύο ανεξάρτητες ομάδες από τη Βορειοδυτική Ευρώπη, η μία στη Salt Lake City στη Utah και η δεύτερη στο Παρίσι. Τόσο το AGTM235T όσο και το AGTT174M ήταν συχνότερα στους υπερτασικούς ασθενείς και των δύο περιοχών.

Τα παραπάνω ευρήματα επαληθεύτηκαν και σε Ιάπωνες. Η πρώτη μελέτη που επαλήθευσε ότι τα ευρήματα σε Καυκάσιους, ισχύουν και στους Ιάπωνες, είναι η μελέτη των Hata et al. Σε αυτή βρέθηκε ότι το AGTT235 ήταν πιο συχνά ευρισκόμενο στους υπερτασικούς σε σχέση με τους νορμοτασικούς. Η συχνότητα του AGTT235 στους νορμοτασικούς Ασιάτες βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με τους Καυκάσιους (0,75 έναντι 0,36). Δεν υπήρχε διαφορά στο αλληλίο AGTM174 μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου (0,11 έναντι 0,09) και η συχνότητα ήταν η ίδια που βρέθηκε στην παραπάνω μελέτη για τους Καυκάσιους. Υπάρχουν αναφορές που δεν συνδέουν τους δύο πολυμορφισμούς με την εμφάνιση υπέρτασης σε Κινέζους, σε Καυκάσιους Άγγλους και σε Καυκάσιους Ισπανούς. Η κλασική μελέτη της Κοπεγχάγης συμπεριέλαβε 9.100 γυναίκες και άνδρες από την ομώνυμη περιοχή, από τους οποίους το 54% είχαν υψηλή αρτηριακή πίεση. Έγινε γενετική ανάλυση, με βάση την οποία προσδιορίστηκε ότι το 41% είχαν το αλληλίο AGTT235 και το 12% το αλληλίο AGTM174. Όταν υπήρχε το αλληλίο AGTM174 πάντα συνυπήρχε και το AGTT235. Οι ομόζυγες για το AGTT235 γυναίκες, έναντι εκείνων που δεν είχαν καθόλου το αλληλίο είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο για αυξημένη αρτηριακή πίεση.

Η ομοζυγωτία και για τα δύο AGTT235 και AGTT174 συνδέθηκε με 10% αύξηση της συγκέντρωσης του αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα και για τα δύο φύλλα, συγκριτικά με την ομοζυγωτία AGTM235 και AGTT174. Συμπερασματικά, σε αυτή τη μεγάλης κλίμακας μελέτη στο γενικό πληθυσμό, η διπλή ομοζυγωτία συνδέθηκε με αύξηση των επιπέδων αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα κατά 10% και η παρουσία της ομοζυγωτίας αποτελούσε παράγοντα κινδύνου για υψηλή αρτηριακή πίεση στις γυναίκες αλλά όχι στους άνδρες. Σε μια Γαλλική μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού AGTT174M με τα επίπεδα του αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα.

Τα επίπεδα αγγειοτασινογόνου συσχετίστηκαν σημαντικά (βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα) με τον πολυμορφισμό AGTM235T για τους ενήλικους συμμετέχοντες της μελέτης. Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα μιας Μεξικανικής μελέτης, όπου βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού AGTT174M αλλά όχι του AGTM235T, με χαμηλά επίπεδα αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα. Η συχνότητα του πολυμορφισμού AGTT174M ήταν 2% στο συγκεκριμένο δείγμα. Μια Κινεζική μελέτη έδειξε ότι η παρουσία των πολυμορφισμών AGTM235T και AGTT174M και ειδικά το M αλληλίο για τον AGTM235T αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης.

Σε μια μεγάλη μεταανάλυση, που συμπεριέλαβε 10.690 συμμετέχοντες συνολικά, από τους οποίους οι 9.184 παρακολούθηθηκαν για 22 χρόνια, βρέθηκε ότι οι γυναίκες που είχαν το γονότυπο AGTTT174 ή AGTTT235 είχαν αυξημένα επίπεδα αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα και μέτριο κίνδυνο για αυξημένη αρτηριακή πίεση. Τελος σε μια Ινδική μελέτη βρέθηκε ότι η κατανομή των πολυμορφισμών του αγγειοτασινογόνου (AGTT174M και AGTM235T) συνδέοταν ισχυρά με την υπέρταση.

A8.4 M235T, T174M & Προεκλαμψία

Προκειμένου να διαλευκανθούν τα αίτια εμφάνισης της προεκλαμψίας, έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς πολυάριθμες μελέτες σε αρκετά υποψήφια γονίδια τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Μεταξύ αυτών των γονιδίων βρίσκονται και διάφορα γονίδια του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS), το οποίο συμμετέχει άμεσα στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Το AGT, το φυσικό υπόστρωμα του RAS, συντίθεται στο ήπαρ και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο πιθανός ρόλος του γονιδίου AGT στην υπέρταση διερευνήθηκε αρχικά από την ομάδα Jeunemaitre μέσω μελέτης σύνδεσης στην πιθανή εμπλοκή του στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης στο Γαλλικό πληθυσμό. Η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα πως μεταξύ των αναγνωρισμένων μείζονων μοριακών παραλλαγών του AGT, οι παραλλαγές M235T και T174M είχαν σημαντική συσχέτιση με την υπέρταση. Ωστόσο, οι συσχετίσεις με αυτές τις παραλλαγές είναι αντιφατικές σε διάφορους πληθυσμούς.

Μία πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2018 από τον Hedia Zitouni και τους συνεργάτες του, είχε ως αντικείμενο μελέτης τη συσχέτιση των πολυμορφισμών M235T και T174M με την προεκλαμψία και τη σοβαρότητά της στους πληθυσμούς της Τυνησίας. Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι το ο πολυμορφισμός M235T αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας σχεδόν στο τριπλάσιο. Η συσχέτιση του M235T με την προεκλαμψία αναφέρθηκε για πρώτη φορά στους Καυκάσιους το 1993, και μια προηγούμενη μετα-ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση του M235T με τη νόσο υπό κυρίαρχα και υπολειπόμενα γενετικά μοντέλα. Άλλες μελέτες έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό M235T με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου στους Καυκάσιους και τους Μογγόλους, αλλά όχι στους πληθυσμούς της Νότιας Αφρικής και τους Αφροαμερικανούς. Μια άλλη μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 22 μελέτες ανέφερε την ύπαρξη σύνδεσης του M235T με την προεκλαμψία στους Καυκάσιους, αλλά όχι στους Ινδούς, τους πληθυσμούς της Νότιας Αφρικής, τους Αφροαμερικανούς και τους ασιατικούς πληθυσμούς.

Η ύπαρξη των πολυμορφισμών M235T και T174M σε γυναίκες με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος και η συσχέτισή τους με την εμφάνιση της προεκλαμψίας, υποδηλώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίου-περιβάλλοντος προκειμένου να εμφανιστεί η νόσος. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση ανέφερε ότι ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας, υποδηλώνοντας ότι η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνισή της. Τα αποτελέσματά αυτά συμφωνούν με μια προηγούμενη ιαπωνική μελέτη που ανέφερε θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T με σπλαχνική παχυσαρκία και με νοσηρή παχυσαρκία σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η παχυσαρκία και η υπέρταση είναι δύο παράμετροι του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ, είναι γνωστό πως και η προεκλαμψία θεωρείται μεταβολικό σύνδρομο. Στον πληθυσμό της Τυνησίας, ο M235T πολυμορφισμός έχει ερευνηθεί ότι συσχετίζεται με αθηροσκληρωτικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και διαβήτη τύπου 2, αυξάνοντας τον κίνδυνο για νεφροπάθειες, καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο.

Επιπλέον, η ατελής διαμόρφωση του πλακούντα λόγω ελαττωματικής αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών συσχετίστηκε με τον πολυμορφισμό M235T στο 63% των γυναικών με προεκλαμψία και στο 60% σε ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης σε σύγκριση με την κανονική εγκυμοσύνη.

Ακόμη μια πρόσφατη μελέτη σε πληθυσμό της Κίνας, έδειξε ότι ο M235T πολυμορφισμός μπορεί να συμβάλει σε μεταβολές των συγκεντρώσεων του PIGF και του sFlt1 στο πλάσμα προκαλώντας αύξηση των επιπέδων του sFlt1 και μείωση των επιπέδων PIGF στους ασθενείς με προεκλαμψία.

Όσο αφορά τον T174M πολυμορφισμό, έχει διαπιστωθεί από μελέτες ότι βρίσκεται σε χαμηλότερη συχνότητα σε σχέση με τον πολυμορφισμό M235T σε προεκλαπτικές γυναίκες της Τυνησίας, της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής, καθώς και ότι δε συνδέεται με τη σοβαρή μορφή της νόσου σε αυτούς τους πληθυσμούς. Ακόμη, οι γυναίκες που ήταν φορείς του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, χωρίς ιστορικό υπέρτασης, και εμφάνισαν προεκλαμψία, βρέθηκε ότι έχουν χαμηλότερα επίπεδα AGT πλάσματος σε σύγκριση με γυναίκες που είχαν μια φυσιολογική εγκυμοσύνη.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της συσχέτισης δύο πολυμορφισμών του γονιδίου της αγγειοτενσίνης AGT (M235T, rs699 και T174M, rs4762) με την προεκλαμψία σε ομάδα γυναικών από την Κεντρική Ελλάδα.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 42 γυναίκες που εμφάνισαν συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και / ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg και ποσότητα πρωτεΐνης > 300 mg σε ούρα εικοσιτετράωρου πριν τις 34^η εβδομάδα κύησης και 42 γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη ως ομάδα έλεγχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΥΛΙΚΑ

B1.1 Δείγματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 84 δείγματα αίματος από έγκυες γυναίκες της Κεντρικής Ελλάδας. Τα 42 από αυτά ήταν δείγματα control, δηλαδή, δείγματα από ασθενείς που δεν εμφάνισαν προεκλαμψία, ενώ, τα υπόλοιπα 42 ήταν δείγματα από γυναίκες με πρόιμη προεκλαμψία.

B1.2 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
- Εκκινητές για το γονίδιο AGT (Forwart & Reverse), Invitrogen
- Ένζυμο SfaNI (10u/μλ), New England Biolabs
- Ένζυμο NcoI (20000u), New England Biolabs
- RNAase free H₂O, QIAGEN

B1.3 Χρωστικές Ουσίες

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

B1.4 Όργανα – Συσκευές

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

B1.5 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 χρήση στηλών που φέρουν φίλτρα/ μεμβράνες πηκτής σιλικόνης (silica membrane gel), η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή σε πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την DNA πολυμεράση κατά 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 βρίσκονται στα επιθυμητά επίπεδα, 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 έκλυσης και επακόλουθη φυγοκέντρωση, θα αποδεσμευτεί από την μεμβράνη και θα συλλεχθεί στο σωληνάριο (Matson, 2008, Kumar, 2006).

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία απομόνωσης DNA από ολικό αίμα περιλαμβάνει τις εξής φάσεις: τη λύση των κυττάρων, την αφυδάτωση του DNA, τη δέσμευση του DNA στο φίλτρο, τον καθαρισμό του φίλτρου και την ενυδάτωσή του (έκλυση υδατικού διαλύματος DNA).

1^η φάση: Λύση κυττάρων

Αρχικά, πραγματοποιείται μετάγγιση 200 μL αίματος από το σωληνάριο αιμοληψίας στο erpendorf και προστίθενται 20 μL πρωτεΐνας K. Ακολούθησε προσθήκη 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης AL και αφού πραγματοποιηθεί ανάμειξη με Vortex, ακολουθεί επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56° C για 15 min.

2^η φάση: Αφυδάτωση DNA

Προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 100% και ακολούθησε ακόμη μία επώαση στο υδατόλουτρο στους 70° C για 15 min.

3^η φάση: Δέσμευσή του DNA στο φίλτρο

Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται μετάγγιση του διαλύματος σε στήλη (QIAamp Mini spin column) μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2 μL , το οποίο φυγοκεντρείται στις 8000 rpm για 1 min και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL .

4^η φάση: Καθαρισμός του φίλτρου

Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη 500 μL διαλύματος έκπλυσης AW1 και το διάλυμα, αφού φυγοκεντρείται στις 8000 rpm για 1 min μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL . Στη συνέχεια, προστίθενται 500 μL διαλύματος έκπλυσης AW2 και ακολουθεί ακόμα μία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 3 min και μεταφορά της QIAamp Mini spin column σε νέο σωληνάριο συλλογής των 2 μL . Μετά τη μεταφορά, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 1 min, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ποσότητα του διαλύματος AW2.

5^η φάση: Ενυδάτωση του φίλτρου/έκλυση υδατικού διαλύματος DNA

Τέλος, μετά την προσθήκη 60–70 μL διαλύματος ελκούσης και επαναδιάλυσης του DNA AE, το διάλυμα φυγοκεντρείται για μια τελευταία φορά στις 8000 rpm για 3 min. Έπειτα, ακολουθεί μετάγγιση του DNA από το σωληνάριο συλλογής των 2 mL σε καθαρό eppendorf των 1,5 mL το οποίο φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.

B2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης μεθοδολογίας για τον καθαρισμό, τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεο-πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, καθίσταται δυνατή η μετακίνησή τους μέσα σε υδατίνα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, με διαφορετικές ταχύτητες, καθιστώντας, έτσι, εφικτό το διαχωρισμό τους σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας ταυτόχρονα τις βιολογικές τους ιδιότητες (Watson *et al.*, 2007).

Όλα αυτά τα βιομόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ' επέκταση όταν εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού, διαθέτουν καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να μετακινούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αρνητικό ή το θετικό πόλο αντίστοιχα, με μία ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από το μήκος, το φορτίο, το σχήμα τους καθώς και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τη θερμοκρασία (Lee *et al.*, 2012).

Η αγαρόζη εξάγεται με τη μορφή άγαρ, ένα προϊόν που λαμβάνεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη και διατίθεται σε μορφή σκόνης. Το κύριο συστατικό του άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από διάφορα είδη του είδους Rhodophyceae (*Geldium amansii*, *G. Cartilagineum*), αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες D-γαλακτοπυρανόζης και μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 1 - 2%.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μια πολύ συχνή μέθοδος ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (*Watson et al., 2007*).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση του πηκτώματος της αγαρόζης καθώς και η στερεοδιάταξη του DNA επηρεάζουν σημαντικά την κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων. Συγκεκριμένα η ποσοστιαία συγκέντρωση του πηκτώματος και η ταχύτητα κίνησης είναι μεγέθη που σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα. Έτσι, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης, μειώνεται η ταχύτητα μετανάστευσης των τμημάτων αλλά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των μικρότερων τμημάτων. Αντίθετα, μειώνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός μεγαλύτερων τμημάτων. Χαρακτηριστικά, ένα πήκτωμα αγαρόζης είναι αποτελεσματικό για το διαχωρισμό τμημάτων DNA με μεγέθη από 100 bp έως 25 kb (*Lee et al., 2012*). Επιπλέον, το DNA μπορεί να λάβει τρεις διαμορφώσεις την υπερελικωμένη διαμόρφωση, στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή, την ανοιχτή κυκλική, στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα και την γραμμική διαμόρφωση, στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα. Κάτω από τυπικές συνθήκες (πλασμίδιο 3.000-10.000 bp – αγαρόζη 1%), η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από τη χαλαρή, γιατί είναι πιο συμπιεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς (*Lee et al., 2012*).

Πειραματική πορεία

➤ Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Αρχικά για την παρασκευή 2% πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: προστέθηκαν 2g αγαρόζης και 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE σε κωνική φιάλη στην οποία γίνεται ανακίνηση και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5min, μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει). Έπειτα, προστίθεται 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 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 "χτένα" που θα δημιουργήσει θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αγαρόζη. Όταν επιτευχθεί αυτό, αφαιρείται προσεκτικά η χτένα και το πήκτωμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.

➤ Ηλεκτροφόρηση του DNA

Το πήκτωμα αγαρόζης που παρασκευάστηκε, βυθίζεται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πηκτώματος (1xTBE). Πραγματοποιείται ανάμιξη 5 μL κάθε δείγματος με 3μL από το διάλυμα χρωστικής μπλε της βρομοφαινόλης και φόρτωμα 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.

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

Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του '80 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Αποτελεί μία γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική, ενώ, παράλληλα, πρόκειται για μία εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδο, καθώς έχει δυνατότητα ανίχνευσης μιας αλληλουχίας από ένα μόριο DNA (*Li et al., 1990*).

Η PCR είναι μία τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών, όπως η *E. coli* ή ζύμες) μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (γνωστού ή άγνωστου). Η γρήγορη βελτιστοποίηση της μεθόδου επιτεύχθηκε με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Saiki et al., 1988*) και επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Επίσης απαραίτητο συστατικό της PCR αποτελεί η χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (*primers*) μήκους 18-22 βάσεις, που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

1. Ένα στάδιο θερμικής αποδιάταξης του DNA – στόχου στους 94-96 °C

Κατά το στάδιο της αποδιάταξης, πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Για την αποδιάταξη του DNA η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 94 °-96 °C, μία θερμοκρασία, η οποία ευνοεί τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας. Η θερμοκρασία στην οποία το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο, καλείται θερμοκρασία τήξης, T_m (melting temperature). Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη θερμοκρασία τήξεως όπως η περιεκτικότητα του DNA σε G/C και A/T, η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα (κυρίως των ιόντων Mg^{+} και K^{+}) και το μήκος της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλινα μόρια DNA σε μια θερμοκρασία, που εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών και την αλληλουχία τους

Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 °C, με αποτέλεσμα μερική επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων του DNA-στόχου και πρόσδεση των εκκινητικών μορίων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες. Η θερμοκρασία αυτή είναι γνωστή ως θερμοκρασία επαναδιάταξης, T_a (annealing temperature) και είναι κατά κανόνα 5-10 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξεως, T_m . Αξίζει να αναφερθεί ότι ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Γι' αυτό το λόγο, οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως, T_m .

3. Πολυμερισμός στους 72 °C

Στο τρίτο στάδιο η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72 °C και μπορεί να αρχίσει η σύνθεση του DNA, με τη δράση της Taq πολυμεράσης, παρουσία ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και ιόντων Mg⁺. Σε αυτή τη θερμοκρασία, η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 δεοξυριβοζονουκλεοτίδια (dNTPs), ανά δευτερόλεπτο, με προσανατολισμό 5'→3', τα οποία είναι συμπληρωματικά στο υπόστρωμα. Αφού οι εκκινητές επεκταθούν μερικές βάσεις, τότε κατέχουν μια ισχυρότερη ιονική έλξη προς την ακολουθία-στόχο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα αποδέσμευσης των εκκινητών από την ακολουθία-στόχο. Μετά από κάθε κύκλο, οι πρόσφατα συντιθέμενοι κλώνοι του DNA μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγείο στον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα του δίκλωνου DNA, του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές και το μήκος του από την απόσταση μεταξύ των εκκινητών (Πλαγιάς *et al.*, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό, συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA-στόχου. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2ⁿ όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Στους τελευταίους κύκλους, η αντίδραση φτάνει σε «πλατό», κυρίως, λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Watson *et al.*, 2007).

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτερες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40 °C να λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

Τα πλεονεκτήματα της PCR είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA, καθώς και όταν το DNA δεν είναι εξαιρετικής ποιότητας ή καθαρότητας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για τον πολλαπλασιασμό με PCR των περιοχών που περιλαμβάνουν τους υπό διερεύνηση πολυμορφισμούς (T174M, M235T) χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων **5'-GATGCGCACAAAGGTCCTG-3'** και **5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC-3'** για την σύνθεση κωδικής περιοχής μήκους 303 bp του γονιδίου AGT.

B2.3.1. Πρωτόκολλο PCR για AGT με HOTSTART

Σε κάθε eppendorf 0.2 ml προστίθεται:

- 6μl DNA
- 24μl MIX

τελικός όγκος: 30μl

Το mix παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανα δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
HotStart	15μl	10	150
PRIMER F stock	2μl	10	20
PRIMER R αραιωμένος	2μl	10	20
H ₂ O	5μl	10	50

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

Το τελικό προϊόν αναμένεται να έχει μήκος 303 bp

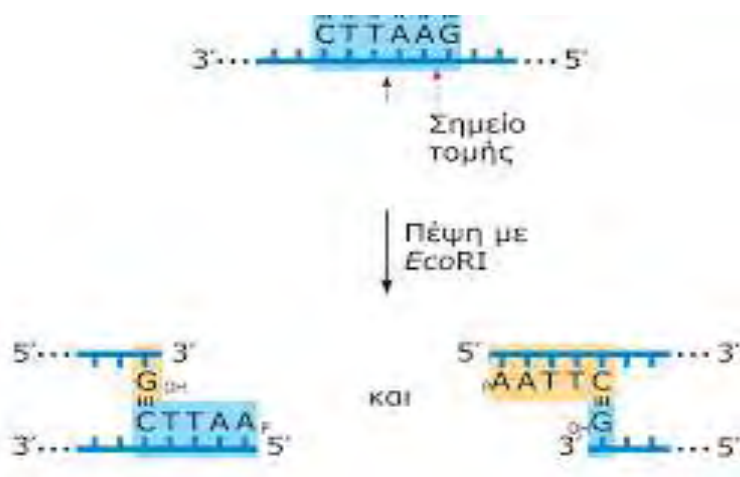
B2.4. Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες

Τα περιοριστικά ενζύμα αποτελούν βασικό εργαλείο της μοριακής βιολογίας, καθώς, έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν σύντομες ακολουθίες DNA και να διασπών με ειδικό τρόπο την διπλή έλικα του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Βρίσκονται, κυρίως, σε βακτηριακά γονιδιώματα, ωστόσο, έχουν απομονωθεί και από ιούς, αρχαιοβακτήρια και ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πήραν το όνομά τους λόγω της ικανότητάς τους να περιορίζουν την ανάπτυξη του φάγου σε ένα βακτηριακό κύτταρο ξενιστή διασπώντας το DNA του. Η φυσιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους. Οι ενδονουκλεάσες των βακτηρίων διασπών τις αλληλουχίες DNA του «εισβολέα». Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται από τη δράση τους μεθυλιώνοντας το DNA του στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών του με την βοήθεια ειδικών μεθυλτρανφερασών. Η τροποποίηση του DNA με την προσθήκη μεθυλ-ομάδων εμποδίζει την πέψη του από τις ενδονουκλεάσες. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να λειτουργούν ως συστήματα βακτηριακής προστασίας. (Williams, 2003). Η περιγραφή του συστήματος περιοριστικών ενδονουκλεασών - ενζύμων τροποποίησης του DNA σαν αμυντικού μηχανισμού των βακτηρίων έγινε το 1965 από τον Werner Aber. Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών επέτρεψε την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών *in vitro* χειρισμού του DNA μεταξύ των οποίων η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς και η δημιουργία βιβλιοθηκών. Παλιότερα οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώνονταν από τον οργανισμό προέλευσης, σήμερα όμως, οι περισσότερες, παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που μπορούν να τροποποιηθούν κατάλληλα ώστε να εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Το 2009 περισσότερες από 4000 ενδονουκλεάσες είχαν χαρακτηριστεί γενετικά ή βιοχημικά. Τα τελευταία χρόνια η επιτάχυνση της αλληλούχισης των γονιδιωμάτων διαφόρων οργανισμών επέτρεψε τον χαρακτηρισμό νέων ενδονουκλεασών και μεθυλτρανσφερασών. Περισσότερες από 640 περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι εμπορικά διαθέσιμες σήμερα.

Γονοτύπηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

✓ Πειραματική πορεία

Οι Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) είναι μια τεχνική όπου το DNA επωάζεται με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού τα οποία το κόβουν όταν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων (κάθε ένζυμο περιορισμού θα κόψει σε μία μοναδική θέση στο DNA). Δημιουργείται έτσι ένας αριθμός θραυσμάτων του DNA με διαφορετικά μήκη. Η μεθοδολογία που ακολουθείται, απαιτεί αρχικά ενίσχυση της περιοχής με PCR γύρω από τον πολυμορφισμό ή τη μετάλλαξη που θέλουμε να μελετήσουμε. Έπειτα γίνεται πέψη τμήματος, βάση πρωτοκόλλου, των προϊόντων PCR με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, στην οποία η θέση αναγνώρισης της θα βρίσκεται και θα επηρεάζεται από το πολυμορφικό σημείο. Μετά την πέψη του προϊόντος ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αгарόζης και αναγνώριση των χαρακτηριστικών θραυσμάτων του DNA 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 (Πλαγιάς, 2011).



Εικόνα 4: Παράδειγμα πέψη τμήματος DNA με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC και κόβει το DNA μεταξύ της γουανίνης(G) και της αδενίνης(A) με κατεύθυνση 5' 3'.

B2.4.1. Πρωτόκολλο πέψης ANG με NcoI (2000u) για πολυμορφισμό T174M (rs 4762)

Σε κάθε eppendorf προστίθενται 10 µL από το προϊόν PCR και 20 µL από το mix με τελικό όγκο 30µL.

Το mix παρασκευάζεται ως εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
Ενζυμο	1	42	42
Buffer	3	42	126
H ₂ O	16	42	672

- Επώαση 1h στους 37° C σε υδατόλουτρο
- Τρέξιμο σε gel 20 µl

AGT T174M (rs4762)	PCR product 303bp	
T/T-	0	303bp
M/T-	1	303bp/211bp/92bp
M/M-	2	211bp/92bp

B2.4.2. Πρωτόκολλο πέψης ANG με SfaNI (10u/μl) για πολυμορφισμό M235T (rs 699, C to T)

Σε κάθε erpendorf προστίθενται 15 μL από το προϊόν PCR και 15 μL από το mix με τελικό όγκο 30μL.

Το mix 1 παρασκευάζεται ως εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
Ενζυμο	1,2	17	20,4
Buffer	3	17	51
H2O	10,8	17	183,6

Το mix 2 παρασκευάζεται ως εξής :

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα	Αριθμός δειγμάτων	Τελική ποσότητα στο mix
Ενζυμο	6	21	126
Buffer	3	21	63
H2O	6	21	126

- Επώαση overnight στους 37° C σε υδατόλουτρο
- Τρέξιμο σε gel 20 μl

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

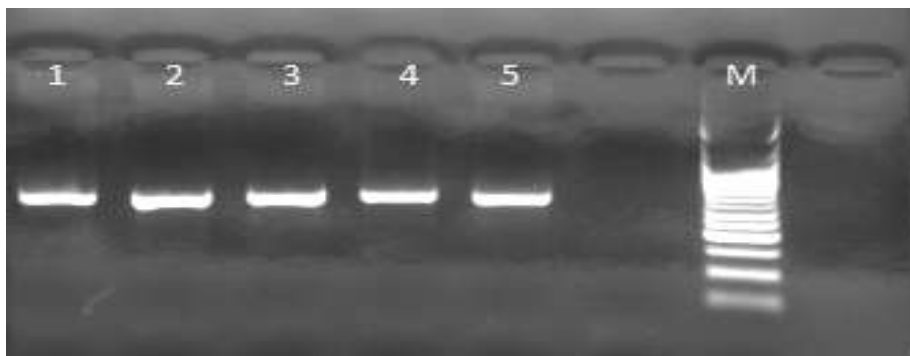
B2.5. Μέθοδοι Στατιστικής Ανάλυσης

Προκειμένου να περιγραφούν και να εξηγηθούν πολυάριθμα πειραματικά αποτελέσματα, η στατιστική και τα μαθηματικά έχουν αναπτύξει μεθόδους έκφρασης της ποσοτικής ιατρικής σκέψης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές (mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD), οι διάμεσοι (median) και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη (interquartile range). Όσο αφορά τις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney, ενώ, για τη σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test όπου ήταν απαραίτητο. Ακόμη, για την διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ύπαρξη προεκλαμψίας λαμβάνοντας υπόψη και άλλους παράγοντες έγινε ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) και προέκυψαν σχετικοί λόγοι (Odds ratio) με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους (95% ΔΕ). Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ:
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
&
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

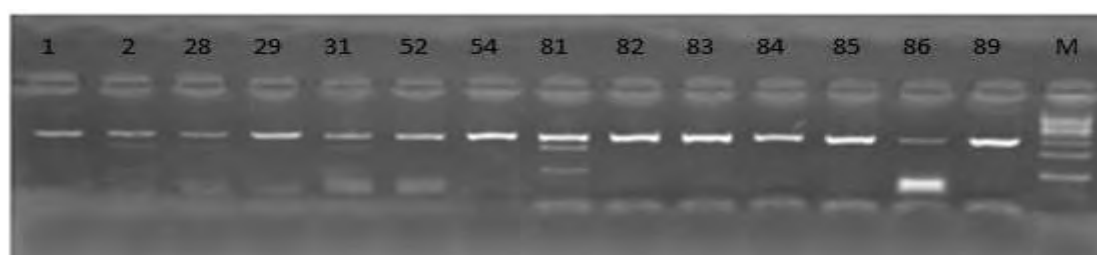
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 13: Οι αριθμοί 1-5 απεικονίζουν τμήματα απομονωμένων δειγμάτων DNA μήκους 303 bp, τα οποία περιλαμβάνουν το γονίδιο AGT. Τα δείγματα αυτά πολλαπλασιάστηκαν με την Τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη DNA στα δείγματα που είχαν υποστεί απομόνωση.

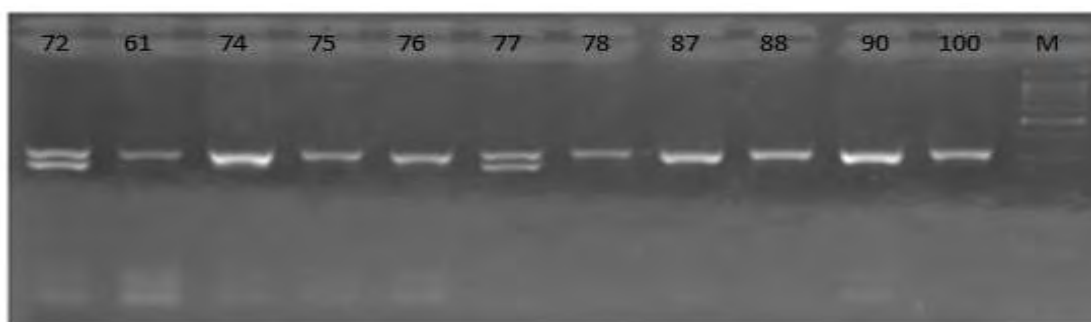
- Προϊόν πέψης με το περιοριστικό ένζυμο NcoI (20000u) για τον πολυμορφισμό T174M



Εικόνα 14: Απεικόνιση αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (4%) των τμημάτων του απομονωμένου DNA, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο NcoI για τον πολυμορφισμό T174M. Τα δείγματα αυτά αφορούν στην ομάδα control. Από αυτά στα δείγματα 2,28,31 και 81 διακρίνονται 3 ζώνες, μία στα 303 bp , μία στα 211 bp και μία στα 92 bp.

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη το αποτέλεσμα της πέψης, σύμφωνα με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης, καθώς, και το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω τα δείγματα 2,28,31 και 81 έχουν γονότυπο 1, ενώ τα υπόλοιπα, που δεν έχουν υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο, έχουν γονότυπο 0.

- Προϊόν πέψης με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI (2u/μλ) για τον πολυμορφισμό M235T



Εικόνα 15: Απεικόνιση αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (4%) των τμημάτων του απομονωμένου DNA, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο SfaNI για τον πολυμορφισμό M235T. Τα δείγματα αυτά αφορούν στην ομάδα των γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία. Από αυτά στα δείγματα 72 και 77 διακρίνονται 2 ζώνες, μία στα 266 bp και μία στα 303 bp. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη το αποτέλεσμα της πέψης, σύμφωνα με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης, καθώς, και το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω τα δείγματα αυτά έχουν γονότυπο 1. Στα δείγματα 74,76,87 και 90 παρατηρείται 1 ζώνη στα 266 bp και σύμφωνα με το πρωτόκολλο έχουν γονότυπο 2. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν έχουν υποστεί πέψη με το ένζυμο και παρατηρείται σε αυτά 1 ζώνη στα 303 bp και έχουν γονότυπο 0.

CONTROL		
a/a	AGT-NCO	AGT-SFAN
1	0	0
2	1	1
7	0	0
10	0	1
11	0	0
28	1	2
29	0	1
30	0	0
31	1	1
32	0	0
33	0	1
35	0	1
39	0	0
40	0	0
41	0	1
42	0	0
43	0	1
47	0	0
52	0	0
54	0	1
65	0	0
60	0	0
62	0	0
73	0	0
79	1	0
80	0	1
81	1	0
82	0	0
83	0	1
84	0	0
85	0	1
86	0	0
89	0	0
91	0	1
92	0	1
93	0	1
94	1	1
95	0	1
96	0	1
97	0	2
98	0	2
99	1	0

PRE-ECLAMPSIA		
a/a	AGT-NCO	AGT-SFAN
1	0	0
2	0	1
7	0	0
10	0	1
11	0	1
28	1	1
29	0	1
30	0	1
31	0	1
32	1	1
33	0	1
35	1	2
39	1	1
40	0	1
41	0	1
42	0	1
43	1	0
47	0	2
52	0	2
54	1	2
65	0	1
60	0	1
62	0	2
73	0	1
79	1	2
80	0	1
81	1	1
82	0	0
83	0	1
85	0	2
84	0	2
86	0	1
89	0	0
91	1	2
92	0	0
93	1	2
94	0	1
95	0	0
96	1	2
97	0	0
98	2	2
99	0	0

Πίνακας 1: Γονότυποι της ομάδας control και της ομάδας pre-eclampsia ως προς τους πολυμορφισμούς T174M (AGT-NCO) και M235T (AGT-SFAN) του γονιδίου AGT.

Πίνακας 2: Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά στις δυο ομάδες της μελέτης.

		Group				P Pearson's χ^2 test
		Control		Preeclampsia		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	31	73,8	31	73,8	0,913
	2ος	6	14,3	5	11,9	
	3ος	5	11,9	6	14,3	
Ηλικία (έτη), μέση τιμή (SD)		32,0 (6,0)		32,0 (6,0)		0,972 ⁺
Φύλο νεογνού	Αγόρι	21	50,0	24	57,1	0,866*
	Κορίτσι	19	45,2	16	38,1	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	2	4,8	2	4,8	
Εμβρυϊκός θάνατος	Όχι	42	100,0	40	95,2	0,494*
	Ναι	0	0,0	2	4,8	
Δίδυμη κύηση	Όχι	38	90,5	37	88,1	>0,999*
	Ναι	4	9,5	5	11,9	
Εβδομάδα κύησης, διάμεσος (ενδ. εύρος)		39,0 (38,0 - 40,0)		32,0 (31,0 - 34,0)		<0,001 ⁺⁺
Πρόωρος τοκετός	Όχι	41	97,6	0	0,0	<0,001
	Ναι	1	2,4	42	100,0	
Βάρος γέννησης (gr), διάμεσος (ενδ. εύρος)		3675 (3250 - 3980)		1650 (1260 - 2140)		<0,001 ⁺⁺

*Fisher's exact test * Student's t-test ** Mann-Whitney test

Συμπέρασμα

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

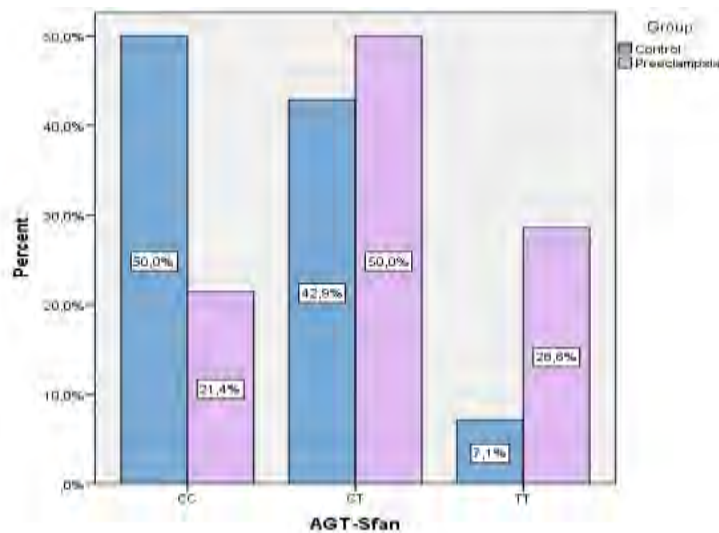
Πίνακας 3: Στον ακόλουθο πίνακα περιγράφεται η παρουσία των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες της μελέτης.

		Group				P Pearson's χ^2 test
		Control		Preeclampsia		
		N	%	N	%	
T174M	CC	35	83,3	30	71,4	0,297*
	CT	7	16,7	11	26,2	
	TT	0	0	1	2,4	
M235T	TT	21	50	9	21,4	0,005
	TC	18	42,9	21	50	
	CC	3	7,1	12	28,6	

*Fisher's exact test

Συμπέρασμα

Βρέθηκε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ομόζυγων (CC) για τον πολυμορφισμό M235T στην ομάδα της προεκλαμψίας.



Γράφημα 1: Παρουσιάζεται η έκφραση του πολυμορφισμού M235T του AGT γονιδίου στις δυο ομάδες της μελέτης.

Πίνακας 4: Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα προεκλαμψίας από την παρουσία των πολυμορφισμών.

		OR (95% ΔΕ)⁺	P
T174M	CC (αναφ.)		
	CT/TT	2,00 (0,70 - 5,73)	0,197
M235T	TT (αναφ.)		
	TC	2,72 (1,00 - 7,42)	0,050
	CC	9,33 (2,11 - 41,28)	0,003

*Σχετικός λόγος (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης)

Συμπέρασμα

Οι TC για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 2,72 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

Οι CC για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 9,33 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

Πίνακας 5: Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα προεκλαμψίας από την παρουσία των πολυμορφισμών έχοντας λάβει υπόψη το βάρος γέννησης και την εβδομάδα γέννησης.

		OR (95% ΔΕ)⁺	P
T174M	CC (αναφ.)		
	CT/TT	2,01 (0,70 - 5,76)	0,196
M235T	TT (αναφ.)		
	TC	2,76 (1,01 - 7,57)	0,048
	CC	9,21 (2,08 - 40,81)	0,004

*Σχετικός λόγος (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης)

Συμπέρασμα

Οι TC για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 2,76 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

Οι CC για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 9,21 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

Πίνακας 6: Παρουσιάζεται η σχέση του πολυμορφισμού **T174M** με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία.

		T174M				P Fisher's exact test
		CC		CT/TT		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	23	76,7	8	66,7	0,527
	2ος	4	13,3	1	8,3	
	3ος	3	10,0	3	25,0	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	14	46,7	10	83,3	0,106
	Κορίτσι	14	46,7	2	16,7	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	2	6,7	0	0,0	
Δίδυμη κύηση	Όχι	26	86,7	11	91,7	>0,999
	Ναι	4	13,3	1	8,3	

Συμπέρασμα

Δε βρέθηκε σημαντική σχέση του πολυμορφισμού T174M με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη.

Πίνακας 7: Ακολούθως παρουσιάζεται η σχέση του πολυμορφισμού με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με προεκλαμψία.

		M235T						P Fisher's exact test
		TT		TC		CC		
		N	%	N	%	N	%	
Τόκος	1ος	5	55,6	17	81	9	75,0	0,636
	2ος	2	22,2	2	9,5	1	8,3	
	3ος	2	22,2	2	9,5	2	16,7	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	7	77,8	10	47,6	7	58,3	0,559
	Κορίτσι	2	22,2	9	42,9	5	41,7	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	0	0,0	2	9,5	0	0,0	
Δίδυμη κύηση	Όχι	9	100	16	76,2	12	100,0	0,084
	Ναι	0	0,0	5	23,8	0	0,0	

Συμπέρασμα

Δεν βρέθηκε σημαντική σχέση του πολυμορφισμού M235T με τον τόκο, το φύλο νεογνού και το αν η κύηση ήταν δίδυμη. Σε ενδεικτικά σημαντικό βαθμό όλες οι δίδυμες κυήσεις ήταν TC για τον M235T πολυμορφισμό.

Πίνακας 7: Παρουσιάζεται η σχέση των μελετώμενων πολυμορφισμών του AGT γονιδίου με την εβδομάδα κήσης στην ομάδα με προεκλαμψία.

		Εβδομάδα κήσης	P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
T174M	CC	32 (30 - 34)	0,414 ⁺
	CT	32 (31 - 34)	
	TT	34 (34 - 34)	
M235T	TT	31 (28 - 34)	0,493 ⁺
	TC	32 (31 - 33)	
	CC	32,5 (31 - 34)	
	CT/CC	32 (31 - 34)	
T174M	CC	32 (30 - 34)	0,401 ⁺⁺
	CT/TT	32,5 (31,5 - 34)	
M235T	TT	31 (28 - 34)	0,289 ⁺⁺
	TC/CC	32 (31 - 34)	

*Kruskal-Wallis test ⁺⁺Mann-Whitney test

Πίνακας 8: Παρουσιάζεται η σχέση των δύο μελετώμενων πολυμορφισμών του AGT γονιδίου με το βάρος γέννησης στην ομάδα με προεκλαμψία.

		Βάρος γέννησης (gr)	P
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
T174M	CC	1540 (1130 - 2000)	0,356
	CT	2115 (1440 - 2360)	
	TT	1750 (1750 - 1750)	
M235T	TT	900 (750 - 2100)	0,179
	TC	1725 (1380 - 2375)	
	CC	1680 (1450 - 1915)	
T174M	CC	1540 (1130 - 2000)	0,152
	CT/TT	2003 (1520 - 2340)	
M235T	TT	900 (750 - 2100)	0,073
	TC/CC	1680 (1420 - 2228)	

*Kruskal-Wallis test ⁺⁺Mann-Whitney test

Συμπέρασμα

Δεν βρέθηκε σημαντική σχέση των πολυμορφισμών με το βάρος γέννησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί πως κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των καρδιαγγειακών και νεφρικών αλλαγών που παρατηρούνται εκείνη την περίοδο. Είναι γνωστό, ότι η ρενίνη, το αγγειοτενσινογόνο (AGT), το ACE, οι ANG I και II, όπως και ο υποδοχέας AT1, έχουν ταυτοποιηθεί στους ιστούς του πλακούντα, ενώ, στις σπειροειδής αρτηρίες του ενδομήτριου, εκφράζεται το αγγειοτενσινογόνο (AGT), η ρενίνη, το ACE και ο AT1 υποδοχέας (Morgan *et al.*, 1998). Επομένως, το RAS, καθώς, και τα γονίδια που το αποτελούν εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας κρίνοντας αναγκαία τη μελέτη τους προκειμένου να αποσαφηνιστούν τα αίτια εμφάνισης της νόσου.

Το αγγειοτενσινογόνο (AGT) αποτελεί σημαντικό συστατικό και το μοναδικό υπόστρωμα του συστήματος RAS. Διάφοροι παράγοντες του συστήματος RAS επιδρούν στο γονίδιο AGT έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή της αγγειοτενσίνης II (Ang II), το κύριο βιολογικά ενεργό πεπτίδιο που παράγεται από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Wu, *et al.* 2011). Έχει αποδειχθεί πως πραγματοποιείται ανεξάρτητη ρύθμιση των επιπέδων AGT σε μεμονωμένα τμήματα ιστού, τα οποία δεν αποτελούν μέρος του κυκλοφοριακού συστήματος. Τα επίπεδα AGT πρωτεΐνης στο πλάσμα αυξάνονται περίπου στην 20^η εβδομάδα της κύησης σε γυναίκες που έχουν εμφανίσει προεκλαμψία, ενώ, έχουν μελετηθεί πολυμορφισμοί του γονιδίου που συνδέονται με την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος του AGT γονιδίου στην υπέρταση και όλες κατέδειξαν γενετική σύνδεση μεταξύ του γονιδίου και της προεκλαμψίας. Μέσω της χαρτογράφησης των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου έχουν μελετηθεί διεξοδικά οι πολυμορφισμοί T174M και M235T του AGT γονιδίου προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος τους στην εμφάνιση της νόσου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία για τον πολυμορφισμό M235T διαπιστώθηκε ότι οι ετερόζυγοι (M/T) για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 2,72 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία ενώ οι ομόζυγοι (T/T) για τον πολυμορφισμό M235T είχαν 9,33 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία. Ωστόσο, οι γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ομόζυγων (T/T) αντιγράφων για τον πολυμορφισμό M235T σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με μία πρόσφατη δημοσίευση των Tousolis et al. στην οποία διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην επικράτηση των ομοζυγωτών T/T στον υπερτασικό πληθυσμό (15,9%) έναντι των μαρτύρων (6,3%), ($p < 0,01$). Επίσης, οι Kusmierska-Urban et al, με πρόσφατη μελέτη τους το 2015 επιβεβαίωσαν ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου AGT M235T και συγκεκριμένα ο γονότυπος T/T του πολυμορφισμού αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης της κήσεως. Μία μελέτη των Bouba et al το 2003 είχε ως αποτέλεσμα τη συσχέτιση του πολυμορφισμού M235T του AGT γονιδίου και της προεκλαμψίας. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και η 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 της νόσου. Επίσης, μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2018 από τον τον Hedia Zitouni και τους συνεργάτες του, είχε ως κύριο εύρημα ότι ο πολυμορφισμός M235T αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας σχεδόν στο τριπλάσιο. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν περισσότερο τους Καυκάσιους και τους Μογγόλους. Ακόμη μια πρόσφατη μελέτη σε πληθυσμό της Κίνας, έδειξε ότι ο M235T πολυμορφισμός μπορεί να συμβάλει σε μεταβολές των συγκεντρώσεων του PIGF και του sFlt1 στο πλάσμα προκαλώντας αύξηση των επιπέδων του sFlt1 και μείωση των επιπέδων PIGF στους ασθενείς με προεκλαμψία. Το 2004 οι Prat-Larquemin et al. απέδειξαν σημαντική συσχέτιση του M235T με την παχυσαρκία σε γυναίκες με υπέρταση σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Ακόμη, οι Zhang, et al, διερεύνησαν την αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών του RAS, μητρικής και εμβρυϊκής προέλευσης σε σχέση με την προεκλαμψία. Συγκρίνοντας επτά εμβρυϊκά γονίδια μεταξύ των όποιων εντοπίζεται και ο πολυμορφισμός 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 τον AGT T174M πολυμορφισμό στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Zhang et al. 2017).

Όσο αφορά τον πολυμορφισμό T174M, τόσο στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη, όσο και στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του πολυμορφισμού με τη εμφάνιση προεκλαμψίας, όπως, ούτε και με τον τόκο, το φύλο του νεογνού και τον αν η κύηση ήταν δίδυμη. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί από μελέτες ότι βρίσκεται σε χαμηλότερη συχνότητα σε σχέση με τον πολυμορφισμό M235T σε προεκλαπτικές γυναίκες της Τυνησίας, της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής, καθώς και ότι δε συνδέεται με τη σοβαρή μορφή της νόσου σε αυτούς τους πληθυσμούς. Ακόμη, οι γυναίκες που ήταν φορείς του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, χωρίς ιστορικό υπέρτασης, και εμφάνισαν προεκλαμψία, βρέθηκε ότι έχουν χαμηλότερα επίπεδα AGT πλάσματος σε σύγκριση με γυναίκες που είχαν μια φυσιολογική εγκυμοσύνη.

Η προεκλαμψία αποτελεί μία πολυσυστηματική ασθένεια και η αιτιολογία της παθοφυσιολογία της εντοπίζεται σε γενετικούς παράγοντες, περιβαλλοντικούς αλλά και σε συνδυασμό των δύο παραπάνω. Έχουν μελετηθεί πολυάριθμα γονίδια και έχουν καταγραφεί αρκετοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι είναι ικανοί να τροποποιούν την έκφραση των γονιδίων και να προκαλούν την εμφάνιση της νόσου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι, η προεκλαμψία είναι μία σύνθετη ασθένεια και πέρα από την κατανόηση της γενετικής βάσης της, η εκδήλωσή της επηρεάζεται επίσης από αλληλεπιδράσεις των γονιδίων με το περιβάλλον. 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.

Επιπλέον, προκειμένου να αποσαφηνιστούν με ακρίβεια τα αίτια εμφάνισης της προεκλαμψίας, είναι απαραίτητο να διασαφηνιστεί η αλληλεπίδραση των γονότυπων της μητέρας και του εμβρύου (Williams, et al. 2011).

Με βάση τους ήδη υπάρχοντες παράγοντες κινδύνου, είναι δυνατή η ταυτοποίηση των γυναικών που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική διαχείριση της νόσου. Ως μέτρο πρόληψης στις γυναίκες υψηλού κινδύνου θα μπορούσε να χορηγηθεί χαμηλή δόση ασπιρίνης σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης (πριν από τη 12^η εβδομάδα της κύησης) όπως επίσης και η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου (≥ 1 g / ημέρα). 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, προς το παρόν, ότι ένας μεμονωμένος βιοδείκτης στην αρχή της εγκυμοσύνης θα μπορούσε να προβλέψει τις γυναίκες που ενδέχεται να αναπτύξουν προεκλαμψία (English, et al.2015).

Αναμφισβήτητα, σημαντικό εργαλείο στον τρόπο διαχείριση της νόσου, αποτελεί η κατανόηση της γενετικής βάσης της. Έχουν ήδη μελετηθεί αρκετά γονίδια τα οποία αποδείχθηκε πως εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, ωστόσο λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου δεν προκαλούν μεμονωμένα την εμφάνισή της. Για το λόγο αυτό, το πεδίο της έρευνας έχει στραφεί στη διεξοδική μελέτη και άλλων υποψήφιων γονιδίων, προκειμένου να κατανοηθεί το γενετικό υπόβαθρό της. 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).

Η ιατρική, η βιολογία και η τεχνολογία σημειώνουν πρόοδο με εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό, έχοντας ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση νέων δεδομένων και τη συνεχή ενημέρωση για πολυάριθμες ασθένειες. Η χρήση εργαλείων της σύγχρονης τεχνολογίας και η αξιοποίηση τεχνικών όπως η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση, η μαζική παράλληλη αλληλούχιση και οι μικροσυστοιχίες με μεγάλο αριθμό μονονουκλεοτιδίων πολυμοφισμών (SNP) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ώστε να συμβάλουν στην αναγνώριση των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν σε όλο το γονιδίωμα των γυναικών που ανέπτυξαν προεκλαμψία.

Καταλήγοντας, ενώ τα αποτελέσματα μας είναι ενθαρρυντικά, καθώς φάνηκε να υπάρχει τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού M235T του γονιδίου AGT και της προεκλαμψίας, θα πρέπει να τονιστεί ότι για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει να εξεταστεί μεγαλύτερος αριθμός τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] **Brown M.A, Hague W.M, Higgins J et al** “The Detection, Investigation, and Management of Hypertension in Pregnancy” *Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.* 2000, dU, 133-1 55
- [2] **Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al.** “The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSH” *Pregnancy Hypertens An Int J Women’s Cardiovasc Heal.* 2014 Apr;4(2):97–104
- [3] **Douglas KA, Redman** “Eclampsia in the United Kingdom” *British Medical Journal.* 1994;309(6966):1395–1400
- [4] **Von Dadelszen P¹, Magee LA, Roberts JM.** “Subclassification of preeclampsia”, *Hypertens Pregnancy.* 2003;22(2):143-8)
- [5] **Sohlberg S¹, Mulic-Lutvica A², Lindgren P³, Ortiz-Nieto F⁴, Wikström AK⁵, Wikström J⁶** “Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study.” *Placenta.* 2014 Mar;35(3):202-6
- [6] **Sharon E, Maynard, MD* and S. Ananth Karumanchi M, Semin Nephrol** “Angiogenic Factors and Preeclampsia” 2011 Jan; 31(1): 33-46.
- [7] **Conrad KP** “G-Protein-coupled receptors as potential drug candidates in preeclampsia: targeting the relaxin/insulin-like family peptide receptor 1 for treatment and prevention.” *Hum Reprod Update.* 2016 Jul 6;22(5):647–64
- [8] **Gathiram P, Moodley J** “Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology.” *Cardiovasc J Afr.* 2016;27(2):71–8
- [9] **Von Dadelszen P, Magee LA** “Pre-eclampsia: an updat” *Curr Hypertens Rep.* 2014 Aug;16(8):454
- [10] **Ross MG, Meyer BA** “Eclampsia” *Emedicine Article* 253960. 2011:1-13
- [11] **Redman CW, Sargent IL.** “Immunology of pre-eclampsia.” *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):534–43
- [12] **Fan P, Liu XH, He GL, Zhang S, Zhang JX, Bai H.** “Maternal and fetal plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity and distribution in preeclampsia.” *Pediatr Res.* 2012;72(4):426–31.

- [13] **Shaker O, Sadik N.** “Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress.” *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(11):1170–8.
- [14] **Redman CW, Sargent IL.** “Immunology of pre-eclampsia.” *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):534–43.
- [15] **Fan P, Liu XH, He GL, Zhang S, Zhang JX, Bai H.** “Maternal and fetal plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity and distribution in preeclampsia.” *Pediatr Res.* 2012;72(4):426–31.
- [16] **Schramm AM, Clowse MEB.** “Aspirin for prevention of preeclampsia in lupus pregnancy.” *Autoimmune Dis.* 2014 Jan;2014:920467.
- [17] **Lindheimer MDW.** “Benson and Pamela Harer Seminar on History. The History of Preeclampsia and Eclampsia as Seen by a Nephrologist.” 2012
- [18] **Lever JC.** “Cases of puerperal convulsions with remarks.” *Guys Hosp. Rep.* 1843;2:495–517.)
- [19] **Ballantyne JW.** “Sphygmographic tracings in puerperal eclampsia.” *Edinburgh Med. J.* 1885;30:1007–1020.)
- [20] **Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham GC, Chesley L. In:** Chesley’s “Hypertensive Disorders in Pregnancy.” Elsevier; 2009. pp. 25–36.)
- [21] **Ballantyne JW.** “A plea for a pro-maternity hospital.” *Br. Med. J.* 1901;1:813–814.
- [22] **Roberts J.** “Endothelial dysfunction in preeclampsia” *Semin Reprod Med* (1998) 16:5–15.10.1055/s-2007-1016248
- [23] **Savoia C, Schiffrin EL.** “Inflammation in hypertension.” *Curr Opin Intern Med* (2006) 5:245–51.10.1097/01.mnh.0000203189.57513.76
- [24] **Lamarca B.** “The role of immune activation in contributing to vascular dysfunction and the pathophysiology of hypertension during preeclampsia” *Minerva Ginecol* (2010) 62:105–20.
- [25] **Van Nieuwenhoven ALV, Heineman MJ, Faas MM.** “The immunology of successful pregnancy.” *Hum Reprod Update* (2003) 9:347–57.10.1093/humupd/dmg026
- [26] **Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T.** “Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation” *Am J Obstet Gynecol* (2002) 186:158–66.10.1067/mob.2002.119176

- [27] **Redman CW, Sargent IL, Staff AC.** “IFPA senior award lecture: making sense of pre-eclampsia – two placental causes of preeclampsia” *Placenta* (2014) 35:S20–5.10.1016/j.placenta.2013.12.008
- [28] **Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B.** “Preeclampsia: updates in pathogenesis, definitions, and guidelines.” *Clin J Am Soc Nephrol* (2016) 11:1102–13.10.2215/CJN.12081115
- [29] **Redman CW.** “Preeclampsia: a multi-stress disorder”. *Rev Med Interne* (2011) 32:41–4.10.1016/j.revmed.2011.03.331
- [30] **Reynolds LP, Redmer DA.** “Angiogenesis in the placenta.” *Vascular* (2001) 64:1033–40.10.1095/biolreprod64.4.1033
- [31] **Redman CW.** “Preeclampsia: a multi-stress disorder.” *Rev Med Interne* (2011) 32:41–4.10.1016/j.revmed.2011.03.331
- [32] **Redman CW, Sargent IL, Staff AC.** “IFPA senior award lecture: making sense of pre-eclampsia – two placental causes of preeclampsia” *Placenta* (2014) 35:S20–5.10.1016/j.placenta.2013.12.008
- [33] **Redman CW, Sargent IL.** “Placental stress and pre-eclampsia: a revised view.” *Placenta* (2009) 30:38–42.10.1016/j.placenta.2008.11.021
- [34] **CW, Sargent IL.** “Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia.” *Placenta* (2000) 21:597–602.10.1053/plac.2000.0560
- [35] **Tong M, Cheng S, Chen Q, DeSousa J, Stone PR, James JL, et al.** “Aggregated transthyretin is specifically packaged into placental nano-vesicles in preeclampsia.” *Sci Rep* (2017) 7:6694.10.1038/s41598-017-07017-x
- [36] **Westermark P, Bergström J, Solomon A, Murphy C, Sletten K.** “Transthyretin-derived senile systemic amyloidosis: clinicopathologic and structural considerations.” *Amyloid* (2003) 10(Suppl 1):48–54.
- [37] **Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW.** “A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats.” *Am J Obstet Gynecol* (1994) 171:158–64.10.1016/0002-9378(94)90463-4
- [38] **Cotechini T, Komisarenko M, Sperou A, Macdonald-Goodfellow S, Adams MA, Graham CH.** “Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia.” *J Exp Med* (2014) 211:165–79.10.1084/jem.20130295

- [39] **Xue P, Zheng M, Gong P, Lin C, Zhou J, Li Y, et al.** “Single administration of ultra-low-dose lipopolysaccharide in rat early pregnancy induces TLR4 activation in the placenta contributing to preeclampsia.” *PLoS One* (2015) 10:e0124001.10.1371/journal.pone.0124001
- [40] **Belkaid Y, Hand TW.** “Role of the microbiota in immunity and inflammation.” *Cell* (2014) 157:121–41.10.1016/j.cell.2014.03.011
- [41] **W. Arber,** “Host-controlled modification of bacteriophage,” *Annu. Rev. Microbiol.*, τόμ. 19, σσ. 365–378, 1965)
- [42] **R. J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai et al.,** “REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes,” *Nucleic Acids Res.*, τόμ. 43, αρθμ. Database issue, σσ. D298–299, Ιαν. 2015)
- [43] **Reynolds LP, Redmer DA.** “Angiogenesis in the placenta.” *Vascular* (2001) 64:1033–40.10.1095/biolreprod64.4.1033
- [44] **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al.** “Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.” *N Engl J Med* (2004) 350:672–83.10.1056/NEJMoa031884
- [45] **Sheppard SJ, Khalil RA.** “Risk factors and mediators of the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy.” *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* (2010)
- [46] **Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA.** “Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease.” *Circulation* (2011)
- [47] **Sheppard SJ, Khalil RA.** “Risk factors and mediators of the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy”. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* (2010)
- [48] **Redman CW.** “Preeclampsia: a multi-stress disorder.” *Rev Med Interne* (2011)
- [49] **Lamarca B.** “The role of immune activation in contributing to vascular dysfunction and the pathophysiology of hypertension during preeclampsia.” *Minerva Ginecol* (2010)
- [50] **Goulopoulou S, Davidge ST.** “Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia.” *Trends Mol Med* (2015)
- [51] **Redman CW, Sargent IL.** “Placental stress and pre-eclampsia: a revised view.” *Placenta* (2009)

- [52] **Sykes L, Macintyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR.** “The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour.” *Mediators Inflamm* (2012)
- [53] **Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, et al.** “Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy.” *J Leukoc Biol* (2006)
- [54] **Faas MM, Spaans F, De Vos P.** “Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia.” *Front Immunol* (2014)
- [55] **Svensson-Arvelund J** “Immune Regulation at the Fetal-Maternal Interface With Focus on Decidual Macrophages.” Linköping: Linköping University Electronic Press; (2015)
- [56] **Morelli SS, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM.** “The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development.” *Res Rep Biol* (2015)
- [57] **Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y.** “The role of the immune system in preeclampsia.” *Mol Aspects Med* (2007)
- [58] **Faas MM, Spaans F, De Vos P.** “Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia.” *Front Immunol* (2014)
- [59] **Faas MM, De Vos P.** “Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats.” *J Reprod Immunol* (2017)
- [60] **Chesley LC, Anitto JE, Cosgrove RA.** “The familial factor in toxemia of pregnancy.” *Obstet Gynecol.* 1968
- [61] **Redman CW, Sargent IL.** “Latest advances in understanding preeclampsia.” *Science.* 2005
- [62] **Williams PJ, Pipkin FB.** “The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy.” *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011
- [63] **Thornton JG, Macdonald AM.** “Twin mothers, pregnancy hypertension and pre-eclampsia.” *Br J Obstet Gynaecol.* 1999
- [64] **Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S.** “Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension.” *Am J Med Genet.* 2000
- [65] **Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Ronning T, Irgens LM, Lie RT.** “Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort.” *BMJ.* 2005

- [66] **Haig D.** “Genetic conflicts in human pregnancy.” *Q Rev Biol.* 1993
- [67] **Williams PJ, Pipkin FB.** “The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy.” *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Aug;25(4):405-17.
- [68] **Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W.** “Genes and the preeclampsia syndrome.” *J Perinat Med.* 2008;36(1):38-58.
- [69] **Irani R.A. and Xia Y.,** “The Functional Role of the Renin-Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia”, *Placenta.* 2008 September ; 29(9): 763–771
- [70] **Hertig A, Berkane N, Lefevre G, et al.** “Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia.” *Clin Chem* 2004;50(9):1702–3.
- [71] Li X., Tan H., Zhou H., Hu S., Zhang T., Li Y., Dou Q., Lai Z., and Chen F., “Renin–angiotensin–aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and preeclampsia: A case–control geneassociation study”, 2016, *Nature, Sci. Rep.* 6, 38030
- [72] **Moore N, Niamh D, O'Brien P., et al.,** “Renin Gene Polymorphisms and Haplotypes, Blood Pressure, and Responses to Renin-Angiotensin System Inhibition”. 2007, *Hypertension.* 50. 340-7. [73] **Lin J & August P.** “Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis.” *Obstet Gynecol* 2005; 105: 182–192.
- [74] **Mann GE, Niehueser-Saran J, Watson A, Gao L, Ishii T, de Winter P, et al.,** “Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia.” *Sheng Li Xue Bao* 2007;59(2):117-27
- [75] **Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF.** “WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review.” *Lancet* 2006;367:1066–74
- [76] **Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D, Chies JA.** “Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids.” *Med Hypotheses.* 2011;77(2):188–191.

[77] **Koga K, Mor G.** “Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface.” *Reprod Sci* 2008;15(3):231–242.

[78] **Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, Pecks U, Rath W, Pufe T, et al.**, “Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): implications for preeclampsia.” *The Journal of biological chemistry* 2011;286 (50):42863-72.

[79] **LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS et al.** “Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia.” *Curr Hypertens Rep* 2007; 9: 480–485.

[80] **Vander M.D., Sherman Ph.D., Luciano Ph.D., Μ.Τσακόπουλος**
Φυσιολογία του Ανθρώπου 8^η Έκδοση

[81] **Jim B., S. Sharma, T. Kebede, A. Acharya,** “Hypertension in pregnancy: a comprehensive update” *Cardiol. Rev.* 18 (4) (2010).

[82] **Karumanchi SA, Lindheimer MD.** “Advances in the understanding of eclampsia.” *Curr Hypertens Rep* 2008;10:305–12.

[83] **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

[84] **Li X., Tan H., Zhou H., Hu S., Zhang T., Li Y., Dou Q., Lai Z., and Chen F.,** “Renin–angiotensin–aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and preeclampsia: A case–control geneassociation study”, 2016, *Nature, Sci. Rep.* 6, 38030

[85] **Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, Glazer NL, Morrison AC, Johnson AD, Aspelund T, Aulchenko Y, Lumley T, Kottgen A, Vasan RS, Rivadeneira F, Eiriksdottir G, Guo X, et al.** “Genome-wide association study of blood pressure and hypertension.” *Nat Genet.* 2009;41:677– 687.

[86] **Morgan T, Craven C, Ward K.** “Human spiral artery renin-angiotensin system.” *Hypertension* 1998;32(4):683–687

[87]

- [87] **Norikazu Ueki, Satoru Takeda, Daisuke Koya, and Keizo Kanasaki**, “The Relevance of the Renin-Angiotensin System in the Development of Drugs to Combat Preeclampsia” *International Journal of Endocrinology*, Volume 2015, Article ID 572713, 12 pages
- [88] **Streatfeild-James RM, Williamson D, Pike RN, Tewksbury D, Carrell RW, Coughlin PB**. “Angiotensinogen cleavage by renin: importance of a structurally constrained N-terminus.” *FEBS Lett* 1998; 436: 267–270.
- [89] **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.
- [90] **Zhou A, Carrell RW, Murphy MP, Wei Z, Yan Y, Stanley PL, Stein PE, Broughton Pipkin F, Read RJ**. “A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release.” *Nature* 2010; 468: 108–111.
- [91] **Gong, M. & Hubner, N., 2006**. “Molecular genetics of human hypertension.” *Clinical science*, 110(3), pp.315–326.
- [92] **Glavnik, N. & Petrovic, D., 2007**. “M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-1 converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians.” *Folia biologica*, 53(2), pp.69–70.
- [93] **Gardemann, et al. (1999)**. “Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis.” *Atherosclerosis*. 145 (2) :309–314.
- [94] **Jain S, Vinukonda G, Fiering SN, Kumar A**. “A haplotype of human angiotensinogen gene containing -217A increases blood pressure in transgenic mice compared with -217G.” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1849–R1857.
- [95] **Dai Manhong, Shah Nigam H, Xuan Wei, Musen Mark A, Watson Stanley J, Athey Brian D, Meng Fan**. “An Efficient Solution for Mapping Free Text to Ontology Terms.” *Proceedings of the AMIA Summit on Translational Bioinformatics*. 2008
- [96] **Garten Yael, Altman Russ B**. “Pharmspresso: a text mining tool for extraction of pharmacogenomic concepts and relationships” *BMC Bioinformatics*. 2009;10(Suppl 2):S6

- [97] **Fundel Katrin, Küffner Robert, Zimmer Ralf.** “Relex - relation extraction using dependency parse trees.” *Bioinformatics*. 2007;23(3):365–371.
- [98] **Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, et al.** “A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia.” *Nat Genet* 1993; 4: 59–61
- [99] **Medica I, Kastrin A, Peterlin B.** “Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia” A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 131: 115–126.
- [100] **Lin R, Lei Y, Yuan Z, et al.** “Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms and susceptibility of pre-eclampsia” A meta-analysis. *Ann Hum Genet* 2012; 76: 377–386.
- [101] **Poorolajal J, Jenabi E.** “The association between body mass index and preeclampsia” A meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; 29: 3670–3676.
- [102] **Yasuto T, Toshihide Y, Keiji Y, et al.** “Angiotensinogen gene polymorphism (Met235Thr) influences visceral obesity and insulin resistance in obese Japanese women.” *Metabolism* 2006; 55: 819–824.
- [103] **Pacholczyk M, Ferenc T, Kowalski J, et al.** “Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus.” *J Diabetes Metab* 2015; 6: 479.
- [104] **Saidi S, Mallat SG, Almawi WY, et al.** “Association between renin-angiotensin-aldosterone system genotypes and haplotypes and risk of ischemic stroke of atherosclerotic etiology.” *Acta Neurol Scand* 2009; 119: 356–363.
- [105] **Mehri M, Koubaa N, Hammamia S, et al.** “Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes with diabetes type 2 in a Tunisian population.” *Life Sci* 2010; 87: 49–54.
- [106] **Mtiraoui N, Ezzidi I, Turki A, et al.** “Renin-angiotensin-aldosterone system genotypes and haplotypes affect the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients.” *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 12: 572–580.

- [107] **Aggarwal S, Dimri N, Tandon I, et al.** “Preeclampsia in North Indian women: The contribution of genetic polymorphisms.” *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37: 1335–1341.
- [108] **Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al.** “Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen”. *Cell* 1992; 71: 169–180.
- [109] **Zhang XQ, Craven C, Nelson L, et al.** “Placental abruption is more frequent in women with the angiotensinogen Thr235 mutation.” *Placenta* 2007; 28: 616–619.
- [110] **Dahlback B (1994)** “Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene.” *Haemostasis* 24: 139–151.
- [111] **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996)** “A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.” *Blood* 88: 3698–3703.
- [112] **Katsuya T, Ishikawa K, Sugimoto K, Rakugi H, Ogihara T,** “Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism” *Hypertens Res.* 2003 Jul;26(7):521-525.
- [113] **Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Suzuki M, Sato T, Funahashi J, Katoh R, Kazama I, Michimata M, Araki T, Hozawa A, Tsuji I, Ogihara T, Yanagisawa T, Imai Y, Matsubara M,** “A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure” the Ohasama Study, *Hypertens Res.* 2003 Feb;26(2):141- 145.
- [114] **Ishigami T, Umemura S, Tamura K, Hibi K, Nyui N, Kihara M, Yabana M, Watanabe Y, Sumida Y, Nagahara T, Ochiai H, Ishii M,** “Essential hypertension and 5' upstream core promoter region of human angiotensinogen gene” *Hypertension.* 1997 Dec;30(6):1325-1330.
- [115] **Sethi A, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Frandsen E, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A,** “Angiotensinogen polymorphisms and elevated blood pressure in the general population” The Copenhagen City Heart Study, *Hypertension* 2001;37:875-881.

- [116] **Vinck WJ , Fagard RH, Vlietinck R, Lijnen P**, “Heritability of plasma renin activity and plasma concentration of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme” *J Hum Hypertens*. 2002 Jun;16(6):417-422.
- [117] **Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A**, “Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul 1;23(7):1269-1275.
- [118] **Sato N, Katsuya T, Nakagawa T, Ishikawa K, Fu Y, Asai T, Fuduka M, Suzuki F, Nakamura Y, Higaki J, Oqihara T**, “Nine polymorphisms of angiotensinogen gene in the susceptibility to essential hypertension.” *Life Sci* 2000, 68:259-272.
- [119] **Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM**, “Angiotensinogen as a Risk Factor for Essential Hypertension in Japan” *J. Clin. Invest*. 1994. 93:1285-1287.
- [120] **Pereira AC, Mota GF, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE**, “Angiotensinogen 235T allele “dosage” is associated with blood pressure phenotypes” *Hypertension*. 2003 Jan;41(1):25-30.
- [121] **Jeunemaitre X , Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, GimenezRoqueplo AP, Hata A, Corvol P, Lalouel JM**, “Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension” *Am J Hum Genet*. 1997 Jun; 60(6):1448-1460.
- [122] **Suwazono Y, Kobayashi E, Sakurada I, Ohkubo Y, Nogawa K, Kido T**. “Associations of the angiotensinogen gene (M235T, T174M) and the angiotensin I-converting enzyme gene (I/D) with blood pressure in Japanese workers.” *Blood Pressure* 1999; 8: 23–28.
- [123] **Freitas SR , Cabello PH, Moura-Neto RS, Dolinsky LC, Lima AB, Barros M, Bittencourt I, Cordovil IL**, “Analysis of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in resistant hypertension” *Braz J Med Biol Res*. 2007 Mar;40(3):309-316.
- [124] **Shamaa MM, Fouad H, Haroun M, Hassanein M, Mohamed Ayman Abdel Hay**, “Association between the Angiotensinogen (AGT) gene (M235T) polymorphism and Essential Hypertension in Egyptian patients” <http://dx.doi.org/10.1016/j.ehj.2013.10.001>

- [125] **Knox SS , Guo X, Zhang Y, Weidner G, Williams S, Ellison RC**, “AGT M235T genotype/ anxiety interaction and gender in the Hypertension” GEN Study, PLoS One. 2010 Oct 13;5(10):e13353.
- [126] **Krizanová O, Koska J, Vigas M, Kvetnanský R**, “Correlation of M235T DNA polymorphism with cardiovascular and endocrine responses during physical exercise in healthy subjects” *Physiol Res*. 1998;47(2):81-88.
- [127] **Rotimi C , Cooper R, Ogunbiyi O, Morrison L, Ladipo M, Tewksbury D, Ward R**, “Hypertension, serum angiotensinogen, and molecular variants of the angiotensinogen gene among Nigerians” *Circulation*. 1997 May 20;95(10):2348-2350.
- [128] **Kooffreh ME, Anumudu CI, Akpan EE, Ikpeme EV, Kumar PL**, “A study of the M235T variant of the angiotensinogen gene and hypertension in a sample population of Calabar and Uyo, Nigeria” *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2013,14:13-19.
- [129] **Atwood LD , Kammerer CM, Samollow PB, Hixson JE, Shade RE, MacCluer JW**, “Linkage of essential hypertension to the angiotensinogen locus in Mexican Americans, Hypertension.” 1997 Sep;30(3 Pt 1):326-330.
- [130] **Hingorani AD , Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ**, “Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene” *Hypertension*. 1996 Nov;28(5):907-911.
- [131] **Caulfield M , Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJ**, “Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans” *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):687-692.
- [132] **Caprioli J , Mele C, Mossali C, Gallizioli L, Giacchetti G, Noris M, Remuzzi G, Benigni A**, “Polymorphisms of EDNRB, ATG, and ACE genes in salt-sensitive hypertension” *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;86(8):505-510.
- [133] **Norat T , Bowman R, Luben R, Welch A, Khaw KT, Wareham N, Bingham S**, “Blood pressure and interactions between the angiotensin polymorphism AGT M235T and sodium intake: a cross-sectional population study” *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88 (2):392- 397.

- [134] **Gimenez-Roqueplo AP , Célrier J, Schmid G, Corvol P, Jeunemaitre X,** “Role of cysteine residues in human angiotensinogen. Cys232 is required for angiotensinogen-pro major basic protein complex formation” *J Biol Chem.* 1998 Dec 18;273(51):34480- 34487.
- [135] **Yamagishi K, Iso H, Tanigawa T, Cui R, Kudo M, Shimamoto T,** “High Sodium Intake Strengthens the Association between Angiotensinogen T174M Polymorphism and Blood Pressure Levels among Lean Men and Women” a Community-Based Study, *Hypertens Res* 2004; 27: 53–60.
- [136] **Pereira TV, Nunes ACF, Rudnicki M, Yamada Y, Pereira AC, Krieger JE,** “Meta-Analysis of the Association of 4 Angiotensinogen Polymorphisms With Essential Hypertension A Role Beyond M235T” *Hypertension.* 2008;51:778-783.
- [137] **Caulfield M , Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJ,** “Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension” *N Engl J Med.* 1994 Jun 9;330(23):1629-1633.
- [138] **Fernandez-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert L,** “Angiotensinogen Gene M235T and T174M Polymorphisms in Essential Hypertension Relation With Target Organ Damage” *Am J Hypertens* 1998;11:439–444.
- [139] **Brand E, Chatelain N, Paillard F, Tiret L, Visvikis S, Lathrop M, FSoubrier F, Demenais F,** “Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis” *European Journal of Human Genetics* (2002) 10, 715 – 723.
- [140] **Balam-Ortiz E, Esquivel-Villarreal A, Alfaro-Ruiz L, Carrillo K, Elizalde A, Gil T, Urushihara M, Kobori H, Jimenez-Sanchez G,** “Variants and Haplotypes in Angiotensinogen Gene Are Associated With Plasmatic Angiotensinogen Level in Mexican Population” *Am J Med Sci.* 2011 September ; 342(3): 205–211.
- [141] **Fang YJ, Deng HB, Thomas GN, Tzang CH, Li CX, Xu ZL, Yang M, Tomlinson B,** “Linkage of Angiotensinogen Gene Polymorphisms with Hypertension in a Sibling Study of Hong Kong Chinese” *J Hypertens.* 2010 June ; 28(6): 1203–1209.
- [142] **Sethi AA, Nordestgaard BG, Grønholdt MLM, Steffensen R, Jensen G, Tybjærg-Hansen A,** “Angiotensinogen Single Nucleotide Polymorphisms, Elevated Blood Pressure, and Risk of Cardiovascular Disease” *Hypertension.* 2003;41:1202-1211.

[143] **Mohana VU, Swapna N, Surender Reddy S, Vishnupriya S, Padma Tirunilai**, “Gender Related Association of AGT Gene Variants (M235T and T174M) with Essential Hypertension” A Case-Control Study, *Clinical and Experimental Hypertension*.2012;34(1):38–44.

Εικόνες

1. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* (2014) 10(8):466–80.10.1038/nrneph.2014.102
2. Zárate A, Saucedo R, Valencia J, Manuel L, Hernández M. Early disturbed placental ischemia and hypoxia creates immune alteration and vascular disorder causing preeclampsia. *Arch Med Res* (2014) 45:519–24.10.1016/j.arcmed.2014.10.003
3. Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y, Feng KT, Singh H, Fisher SJ. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development*. 2005;132(18):4097–106.
4. <https://opencourses.auth.gr>