

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Σωτήρης Σωτηρίου, Επίκουρος Καθηγητής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ: «Ρόλος πολυμορφισμών TLR στην εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας και υπολειπόμενης ανάπτυξης (IUGR, intrauterine growth retardation)»

Της: Δήμητρας Ν. Βαμβακοπούλου

Παιδιάτρου

**Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την
απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος**

Λάρισα, 2020

Δήμητρα Ν. Βαμβακοπούλου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα

(συμφώνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932)

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

1 ^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Σωτήρης Σωτηρίου Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, <i>Επιβλέπων</i> Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2 ^{ος} Εξεταστής	Αντώνης Γούναρης Ομότιμος Καθηγητής Νεογνολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3 ^{ος} Εξεταστής	Δημήτρης Αρβανίτης Ομότιμος Καθηγητής Ανατομίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4 ^{ος} Εξεταστής	Δαπόντε Αλέξανδρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5 ^{ος} Εξεταστής	Ιωάννου Μαρία Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6 ^{ος} Εξεταστής	Γριβέα Ιωάννα Καθηγήτρια Παιδιατρικής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7 ^{ος} Εξεταστής	Συρογιαννόπουλος Γεώργιος Καθηγητής Παιδιατρικής Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί σύνθεση κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων. Το κλινικό μέρος, που αφορά αμιγώς γηγενή πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας, πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Πανεπιστημιακή Κλινική Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Παν. Θεσσαλίας (Διευθυντής ο Καθ. Α. Δαπόντε). Το εργαστηριακό μέρος πραγματοποιήθηκε στα Εργαστήρια Εμβρυολογίας (Δν/της ο Επ. Καθ. Σ. Σωτηρίου) & Βιολογίας (Δν/της ο Καθ. Ν. Βαμβακόπουλος) του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επιστημονική επίβλεψη της Δρ. Μαρίας Σάτρα (Ε.ΔΙ.Π. Μοριακής Βιολογίας).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα και τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής για την εμπιστοσύνη τους και την συμβολή τους στη προσπάθειά μου, τους διευθυντές της κλινικής και των εργαστηρίων που συνεργάστηκα και με περιέβαλαν με την αμέριστη υποστήριξή τους και ιδιαίτερος τη Δρ. Μ. Σάτρα για την άψογη συνεργασία και βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια του της διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω και σε όλα τα μέλη ΔΕΠ του τομέα Μητέρας-Παιδιού, των Εργ. Εμβρυολογίας & Βιολογίας και τις γραμματείες τους.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω την συμβολή της Αγγελικής Φέγγα, η διπλωματική εργασία της οποίας, με τίτλο «ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TLR ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ» που εκπονήθηκε το 2016 με επιβλέπουσα τη Δρ. Μ. Σάτρα στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ», απετέλεσε τη βάση των Κεφαλαίων 2 & 6 και μεγάλου μέρους του Κεφαλαίου 4 (4.4.1-4.2.4) της παρούσας διατριβής.

Δήμητρα Ν. Βαμβακοπούλου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Δήμητρα Νικολάου Βαμβακοπούλου
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Δαβάκη 28, Νεάπολη, Λάρισα 41334.
ΓΕΝΝΗΘΕΙΣΑ: 13 Οκτωβρίου, 1988, ΑΘΗΝΑ.
ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ: Email: gina.dimitra@hotmail.com, Τηλ: 2410-610217 & 6987336896

ΣΠΟΥΔΕΣ:

- **Προπτυχιακές**
Τμήμα Ιατρικής Παν/μίου Κομένιους, Μπρατισλάβα, Σλοβακία (2006-2012)
- **Μεταπτυχιακές**
Υποψήφια διδάκτωρ στο Τμήμα Ιατρικής του Π.Θ. με θέμα «**Ρόλος των πολυμορφισμών TLR στην εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας και υπολειπόμενης ανάπτυξης.**» (10^η/11-12-2013 συνεδρίαση Γ.Σ.)
Στο πλαίσιο των υποχρεώσεων για τη λήψη του διδακτορικού τίτλου περιλαμβάνεται η επιτυχής παρακολούθηση των εξής μαθημάτων του Π.Μ.Σ.
«Βιολογία της Αναπαραγωγής» του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Θεσσαλίας:
«Προγεννητικός έλεγχος και διάγνωση», 2 ECTS, βαθμολογία: 9 (εννέα)
«Γενετικά σύνδρομα και Αναπαραγωγή», 2 ECTS, βαθμολογία: 9 (εννέα)
«Γενετική συμβουλευτική», 2 ECTS, βαθμολογία: 9 (εννέα)

ΠΤΥΧΙΑ: Πτυχίο Ιατρικής Παν/μίου Κομένιους, Μπρατισλάβα, Σλοβακία (2006-2012)

ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: Παιδιατρική

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ: Μέλος Ιατρικού Συλλόγου Λάρισας (από 2012)

ΘΕΣΕΙΣ: (2017-2019) Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Παν/μιακό Νοσ. Λάρισας
(2015-2017) Ειδικευόμενη Παιδιατρικής, Κουτλιμπάνειο-Τριανταφύλειο Γεν. Νοσ. Λάρισας
(2013-2015) Αγροτική Ιατρός, Κέντρο Υγείας Τσοτυλίου, Κοζάνης

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

1. Εννέα (9) πρωτότυπες δημοσιεύσεις σε διεθνή ιατρικά περιοδικά με συντελεστή εμπέλειας (impact factor, IF): IF/αριθμός δημοσιεύσεων: 4.486/1, 0.45/1, 1.466/1, 2.042/2, 4.333/1, 3.365/1, 2.819/1, 3,191/1
2. Ένα άρθρο ανασκόπησης σε διεθνές ιατρικό περιοδικό με συντελεστή εμπέλειας (impact factor, IF: 3.568)
3. Ένα άρθρο ανασκόπησης σε Ελληνικό ιατρικό περιοδικό
4. Ένα κεφάλαιο σε βιβλίο διεθνούς εκδοτικού οίκου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ:

Σύνολο αναφορών (έως 2020) **88** ή **9.6** αναφορές/δημοσίευση [9 πρωτότυπες και 1 ανασκόπηση], πηγή Scopus. Συνολικός συντελεστής εμπέλειας (IF) **27.757** & μέσος IF/δημοσίευση **2.77**

ΤΙΤΛΟΣ: «Ρόλος πολυμορφισμών TLR στην εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας και υπολειπόμενης ανάπτυξης (IUGR, intrauterine growth retardation)»

Επιγραμματικός τίτλος: Ρόλος πολυμορφισμών TLR στην εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας στην Κεντρική Ελλάδα

TITLE: «Potential role of TLR polymorphism in the pathogenesis of early preeclampsia and IUGR, intrauterine growth retardation»

Running title: Association of TLR polymorphisms with early onset preeclampsia in central Greece.

Δήμητρα Ν. Βαμβακοπούλου

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Σωτήρης Σωτηρίου**, Εμβρυολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Αντώνης Γούναρης**, Παιδιατρική – Νεογνολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δημήτρης Αρβανίτης**, Ανατομία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αρχικά-Συντομογραφίες: **EOP**, early-onset pre-eclampsia, πρώιμη προεκλαμψία

CVD, cardiovascular disease, καρδιαγγειοπάθεια

OR, odds ratio, σχετικοί λόγοι

p, probability, πιθανότητα

PCR, polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PE, pre-eclampsia, προεκλαμψία

PRR, pattern recognition receptors, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

RR, relative risk, σχετικός κίνδυνος

SD, standard deviation, σταθερή απόκλιση

TLR, toll-like receptor, υποδοχέας τύπου toll

Τόκος, αριθμός τοκετών

Περίληψη

Ιστορικό: Οι αλλοιώσεις της φλεγμονώδους αντίδρασης της μητέρας μπορεί να παίξουν ρόλο στην ανάπτυξη υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης, όπως η προεκλαμψία, η σοβαρότερη πρώιμη μορφή της και η καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης. Αξιολογήθηκε η σχέση των κοινών αλληλόμορφων παραλλαγών του υποδοχέα 4 τύπου Toll (TLR4), που είναι γνωστό ότι εξασθενούν την ανοσοφλεγμονώδη απόκριση σε ποικίλες εξωγενείς και ενδογενείς παθογενείς προσβολές, με την ευαισθησία εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας στην Κεντρική Ελλάδα.

Μέθοδοι: Συγκρίθηκε η παρουσία αλληλόμορφων TLR4 (Asp299Gly και Thr399Ile) σε ετερόζυγη (A / G, C / T) και ομόζυγη (G / G, T / T) κατάσταση σε ομάδα 84 γυναικών με ιστορικό πρώιμης προεκλαμψίας και σε ομάδα 94 γυναικών ελέγχου όμοιου ηλικιακού εύρους με ιστορικό φυσιολογικής μόνο εγκυμοσύνης, με άμεση αλληλούχιση.

Ευρήματα: Οι φορείς ετερόζυγων TLR4 αλληλομόρφων ήταν συχνότεροι στην ομάδα γυναικών με ιστορικό πρώιμης προεκλαμψίας απ' ότι στην ομάδα ελέγχου (GA για Asp299Gly: 14,3% έναντι 6,4% (AA), $p = 0,053$ & CT για Thr399Ile: 16,7% έναντι 6,4% (OA), $p = 0.019$) και η παραπάνω συσχέτιση ενισχύθηκε περαιτέρω όταν συμπεριελήφθησαν και οι φορείς ομόζυγων αλληλομόρφων (GA / GG για Asp299Gly: 16.7% έναντι 6.4% (AA), $p = 0.03$ & TC / TT για Thr399Ile: έναντι 6,4% (CC), $p = 0,01$).

Συμπεράσματα: Καταγράφηκε συσχέτιση μεταξύ κοινών παραλλαγών γονιδίων TLR4 και πρώιμης προεκλαμψίας. Τα ευρήματα υποστηρίζουν τη συμμετοχή του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας σε σοβαρές υπερτασικές διαταραχές της εγκυμοσύνης και υποδεικνύουν τη δυναμική αξία των μητρικών πολυμορφισμών TLR4 σαν ευαίσθητους προγνωστικούς δείκτες-παράγοντες κινδύνου πρώιμης προεκλαμψίας στην Κεντρική Ελλάδα.

Abstract

Background: Altered maternal inflammatory responses may play a role in the development of hypertensive disorders of pregnancy like preeclampsia, its more severe early-onset form and intrauterine growth restriction. We evaluated the relation of common allelic variants of Toll-like receptor 4 (TLR4), known to impair the inflammatory response to diverse exogenous and endogenous pathogenic insults/threats, with the susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

Methods: We compared the occurrence of TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) alleles in heterozygous (A/G, C/T) and homozygous (G/G, T/T) states in 84 women with a history of early-onset preeclampsia and 94 age matched controls with a history of only uneventful pregnancies, by direct sequencing.

Findings: Heterozygous TLR4 allelic variants were more common in women with a history of early-onset preeclampsia than in controls (GA for Asp299Gly: 14.3% vs 6.4% (AA), $p=0.053$ & CT for Thr399Ile: 16.7% vs. 6.4% (CC), $p=0.019$) and a stronger association was obtained when homozygous allelic carriers were also included (GA/GG for Asp299Gly: 16.7% vs. 6.4% (AA), $p=0.03$ & TC/TT for Thr399Ile: 19.0% vs. 6.4% (CC), $p=0.01$).

Conclusions: We recorded association between common TLR4 gene variants and early-onset preeclampsia. Our findings support the involvement of maternal innate immune system in severe hypertensive disorders of pregnancy and point to the potential value of maternal TLR4 polymorphisms as predictors-risk factors of susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Σύντομο Βιογραφικό	5
Τίτλος Διατριβής-Συμβουλευτική Επιτροπή	6
Αρχικά – Συνομογραφίες	7
Περίληψη	7
Abstract	8
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή	
1.1 Σκεπτικό, τεκμηρίωση κεντρικού ερωτήματος, σκοπός διατριβής.....	12
1.2 Πρώιμη Προεκλαμψία: Κλινικό πλαίσιο, επιπλοκές, έλεγχος.....	13
1.2.1 Εισαγωγικά.....	13
1.2.2 Πρόγνωση.....	14
1.2.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί.....	14
1.2.4 Ρόλος αγγειογενετικών παραγόντων.....	17
1.2.5 Πρωτεϊνικό προφίλ πλακουντιακού ιστού στη προεκλαμψία.....	17
1.2.6 Ρόλος υποδοχέων TLR.....	19
1.2.7 Επιπλοκές.....	20
1.2.8 Έλεγχος προεκλαμψίας.....	20
1.2.9 Επίλογος.....	21
1.3 Εισαγωγή Διατριβής.....	22
Κεφάλαιο 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	
2.1 Η προεκλαμψία ως διαταραχή.....	24
2.2 Παράγοντες κινδύνου για προεκλαμψία	26
2.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί προεκλαμψίας.....	27
2.3.1 Ατελής Πλακουντοποίηση - Μετατροπή σπειροειδών αρτηριών.....	27
2.3.2 Ισχαιμία του πλακούντα.....	30
2.3.3 Οξειδωτικό στρες.....	31
2.3.4 Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο.....	32
2.3.5 Δυσλειτουργία του Ενδοθηλίου	32
2.3.6 Αντι-αγγειογενετικές συνθήκες.....	33
2.3.7 Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II	34

2.3.8 Συμμετοχή του συστήματος ανοσίας στην προεκλαμψία.....	34
2.4 Βιοδείκτες προεκλαμψίας	36
2.4.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση	36
2.4.2 Κορίνη	39
2.4.3 Ελεύθερο Εμβρυικό DNA	39
2.4.4 Εμβρυική αιμοσφαιρίνη	39
2.4.5 PAPP-A	40
2.4.6 Βασοπρεσίνη – Coreptin	40
2.4.7 PP-13	41
2.4.8 Κυστατίνη C	41
2.4.9 miRNAs	42
2.4.10 Γενετικοί Δείκτες	43
2.5 Toll – Like υποδοχείς.....	45
2.5.1 Υποδοχέας TL-2 (TLR-2)	48
2.5.2 Υποδοχέας TL-4 (TLR-4)	48
2.6 Toll – Like υποδοχείς & προεκλαμψία	49
2.7 Σκοπός μελέτης.....	53
Κεφάλαιο 3 ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
3.1 Συμμετέχουσες στη μελέτη.....	54
Κεφάλαιο 4 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ:ΥΛΙΚΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ, ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	
4.1 Υλικά: Αντιδραστήρια, Χρωστικές, Όργανα – Συσκευές, Αναλώσιμα	61
4.2 Μέθοδοι-Πρωτόκολλα: Απομόνωση DNA από ολικό αίμα, Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR, Πρωτόκολλο PCR για TLR-2 με HOTSTART, Πρωτόκολλο PCR για TLR-4 με HOTSTART, Αλληλούχιση DNA κατά Sanger	61
4.3 Διαδικασία Γονοτυπικής ανάλυσης πολυμορφισμών TLR-4 Επιγραμμатικά:	
4.3.1 Απομόνωση DNA	61
4.3.2 PCR ενίσχυση	61
4.3.3 Ανάλυση αλληλουχίας	62
4.3.4 Αλληλούχιση περιοχής TLR-4 DNA με τη μέθοδο Sanger	62
4.4 Στατιστική Ανάλυση.....	64

4.5 Ηθική και Δεοντολογία.....	64
Κεφάλαιο 5 Πειραματικό Μέρος	
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
5.2 Συγκεντρωτικά Ευρήματα Διατριβής Επιγραμματικά.....	78
Κεφάλαιο 6 Γενικός Σχολιασμός	84
Κεφάλαιο 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
7.1 Ευρήματα Μελέτης.....	88
7.2 Στρατηγικές αντιμετώπισης προεκλαμψίας.....	88
7.2.1 Το κλινικό πρόβλημα.....	90
7.2.2 Στοχευμένες ερευνητικές κατευθύνσεις θεραπευτικής αντιμετώπισης της προεκλαμψίας και των παραλλαγών της.....	91
7.2.3` Σύνδεση Καρδιαγγειοπαθειών και Προεκλαμψίας.....	92
7.2.4` Διαγνωστικές προοπτικές ΕΟΡ.....	94
Κεφάλαιο 8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	96
Κεφάλαιο 9 Σύνοψη Διατριβής	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99
Πηγές Έγχρωμων Εικόνων & Διαγραμμάτων (Εικ. 1-14)	120
Παράρτημα I: Ανάπτυπο σύνοψης ευρημάτων	121
Παράρτημα II: Ανάπτυπο δημοσίευσης ευρημάτων.....	124

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1 Σκεπτικό, τεκμηρίωση κεντρικού ερωτήματος, σκοπός διατριβής

Ο άνθρωπος ζει και παραμένει υγιής και δραστήριος όσο οι απειλούμενοι από στρες ομοιοστατικοί του μηχανισμοί επιτυγχάνουν δυναμική εξισορρόπηση του συνόλου των ζωικών του λειτουργιών με ισοζυγισμένη ρύθμιση καταβολικών και αναβολικών δραστηριοτήτων.

Η στρεσογόνος περίοδος απειλούμενης ομοιόστασης του ζεύγους μητέρα-παιδί συνδέεται με αυξημένη παθογένεια, καθώς η απαραίτητη εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας για την ομαλή διατήρηση και ανάπτυξη του αλλογενούς εμβρύου, συνοδεύεται από μειωμένη αντίσταση σε απειλές όπως οι λοιμώξεις.

Καθώς η εξασθένηση των συστημάτων ανοσίας κατά την εγκυμοσύνη οδηγεί σε μειωμένη ανοσολογική απόκριση, μειωμένη προστασία σε απειλές και αυξημένη παθογένεια κύησης, είναι αναμενόμενο οι παραπάνω τάσεις να ενισχύονται σε παθολογικά επίπεδα σε μητέρες φορείς γονιδιακών πολυμορφισμών κλινικής σημασίας, όπως των υποδοχέων Toll, που συνδέουν εγγενή με επίκτητη ανοσία στον άνθρωπο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυμορφισμοί κλινικής σημασίας του υποδοχέα Toll-4 (TLR4) που μειώνουν την ανοσοφλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού έναντι πλήθους απειλών συμπεριλαμβανόμενης της ενδοτοξίνης των gram(-) μικροοργανισμών και εξασθενούν την αμυντική του θωράκιση.

Η ασθενής ανοσοφλεγμονώδης απόκριση της μητέρας έχει ενοχοποιηθεί στην αιτιοπαθογένεια πολυπαραγοντικών ασθενειών κύησης όπως πρώιμη προεκλαμψία και υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου. Προηγούμενες μελέτες σύνδεσης των πολυμορφισμών TLR4 με προδιάθεση εκδήλωσης προεκλαμψίας έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Καθώς οι συχνότητες πολυμορφισμών TLR4 των συμμετεχόντων στις μελέτες αυτές κυμαίνονταν από 7% έως 8% περίπου, είναι πιθανό ευαίσθητες πληθυσμιακές μεταβλητές όπως μεροληψία επιλογής (selection bias) και πληθυσμιακή στρωμάτωση (population stratification) να επηρέασαν διαφορετικά τα ευρήματα.

Δεδομένης της καταγεγραμμένα υψηλής συχνότητας πολυμορφισμών TLR4 κλινικής σημασίας στην Κεντρική Ελλάδα (~14%),

επαναξιολογήθηκε η παρουσία τους σε περιστατικά πρώιμης προεκλαμψίας συγκριτικά με αυτή των φυσιολογικών κύησεων σε αυστηρά γηγενή Θεσσαλικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της εγγενούς ανοσίας της μητέρας στην αιτιοπαθογένεια της κύησης και ενισχύουν την προληπτική αξία των πολυμορφισμών TLR4 σαν προδιαθεσικούς δείκτες εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας στη Κεντρική Ελλάδα.

1.2 Πρώιμη Προεκλαμψία: Κλινικό πλαίσιο, επιπλοκές, έλεγχος

1.2.1 Εισαγωγικά: Η προεκλαμψία κατατάσσεται στις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας της εγκυμοσύνης, πλήττει το 5-8% των γεννήσεων, ευθύνεται για 14% των μητρικών θανάτων της κύησης παγκοσμίως και η επίπτωσή της είναι ιδιαίτερα αυξημένη στις αναπτυσσόμενες χώρες. Είναι αξιοσημείωτο ότι το ποσοστό των θανάτων κατά τη κύηση λόγω προεκλαμψίας, παραμένει σταθερό τη τελευταία δεκαπενταετία. Η προεκλαμψία είναι σύνθετη πολυσυστηματική νόσος άγνωστης προέλευσης, που χαρακτηρίζεται από υπέρταση, πρωτεϊνουρία, παθολογική πλακουντοποίηση, καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης και συνοδεύεται από αυξημένη αντίσταση του αγγειακού δικτύου, ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ανάλογα με το χρόνο εμφάνισής της κατά τη κύηση, διακρίνονται κλινικά δύο υποομάδες:

1. Η Πρώιμη προεκλαμψία, όταν εκδηλώνεται πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και
2. Η Όψιμη προεκλαμψία, όταν εκδηλώνεται μετά την 34^η εβδομάδα κύησης.

Η σοβαρότητα της νόσου καθορίζεται από τα κλινικά της συμπτώματα όπως:

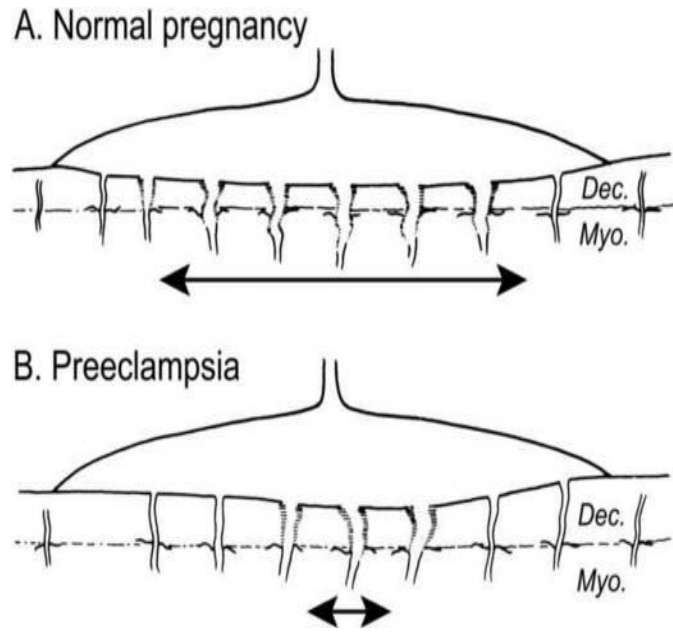
- Αύξηση συστολικής πίεσης ≥ 160 mmHg ή διαστολικής πίεσης ≥ 110 mmHg
- Ολιγουρία < 500 mL/ημέρα
- Θρομβοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων < 100.000 /mL)
- Σύνδρομο HELLP
- Νευρολογικά συμπτώματα
- Νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια
- Ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη - IUGR
- Αιφνίδιο εμβρυικό stress
- Πνευμονικό οίδημα (1)

Διάφορες χρόνιες παθήσεις που συνυπάρχουν στην εγκυμοσύνη όπως νεφρικές νόσοι ή αυτοάνοσα σύνδρομα, μπορεί να μιμηθούν τις κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας δυσχεραίνοντας τη διαφορική της διάγνωση. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και σε εγκυμονούσες γυναίκες που πάσχουν από χρόνια υπέρταση ή υπέρταση κύησης (1-8)

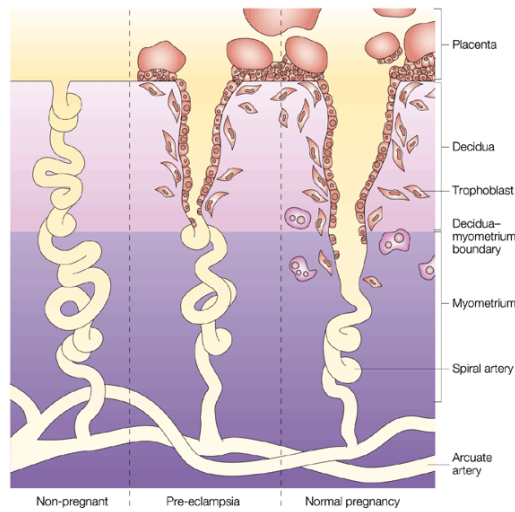
Η τελική κλινική έκφραση της προεκλαμψίας είναι η εκλαμψία όταν πλέον η νόσος έχει επιπλακεί από την ύπαρξη σπασμών και εγκεφαλικού οιδήματος και είναι αυτή η κλινική εκδήλωση που αυξάνει τις πιθανότητες μητρικού θανάτου. Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι σωστή, έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση και μεταφορά της εγκύου σε τριτοβάθμιο κέντρο με δυνατότητες αντιμετώπισης των επιπλοκών της νόσου, είναι ο χρυσός κανόνας για μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας από προεκλαμψία.

1.2.2 Πρόγνωση: Τα παγκόσμια αποδεκτά κριτήρια διάγνωσης της προεκλαμψίας, όπως αύξηση πίεσης σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία, έχουν χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία αναφορικά με τη κλινική πρόβλεψη της εξέλιξης και της σοβαρότητας της νόσου. (1-9).

1.2.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί: Κατά τη φυσιολογική βιογένεση και ανάπτυξη του πλακούντα, κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης εμβρυϊκής προέλευσης διεισδύουν στις μητριάδες σπειροειδείς αρτηρίες και τις μετατρέπουν σε αρτηρίες μεγάλης χωρητικότητας και ευρείας διαμέτρου από μικρής χωρητικότητας και διαμέτρου που είναι αρχικά, επιτρέποντάς τους να προσφέρουν την απαιτούμενη άφθονη αιμάτωση που απαιτεί ο πλακούντας για τη διαρκή και απρόσκοπτη ανάπτυξη του εμβρύου. Ο χαρακτήρας των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης αλλάζει από επιθηλιακού σε ενδοθηλιακού τύπου κατά την αγγειακή διείσδυση, με διαδικασία που αναφέρεται ως «ψευδοαγγειογέννεση» ή ως «αγγειακή απομίμηση». Εικ. 1Α Στη προεκλαμψία, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης αδυνατούν να αποκτήσουν το φυσιολογικό διεισδυτικό ενδοθηλιακό φαινότυπο με αποτέλεσμα οι μητριάδες αρτηρίες να μην υφίστανται την φυσιολογική μετατροπή σε μεγάλο εύρους αγγεία, παραμένοντας αρτηρίες μικρού εύρους και διαμετρήματος. Εικ. 1B (10) Εικ. 2



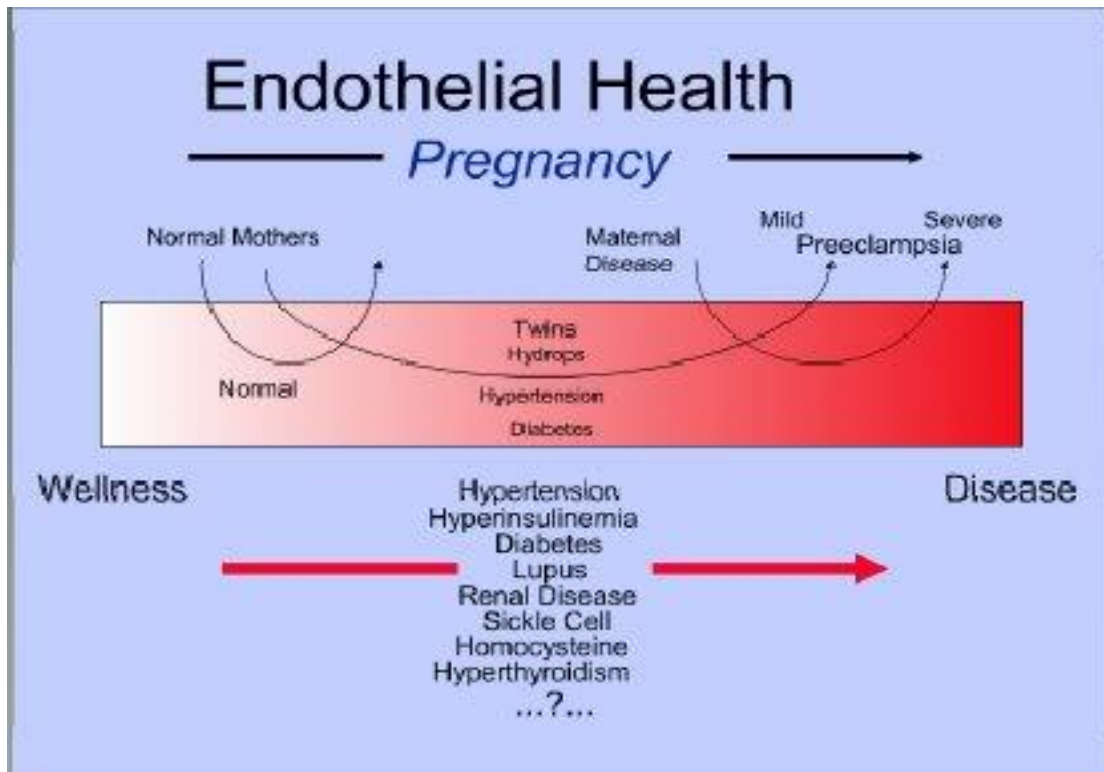
Εικ. 1 Διαφορά διαμέτρου μητροπλακουντιακών αρτηριών: α. φυσιολογική κύηση, β. προεκλαμψία



Nature Reviews | Immunology

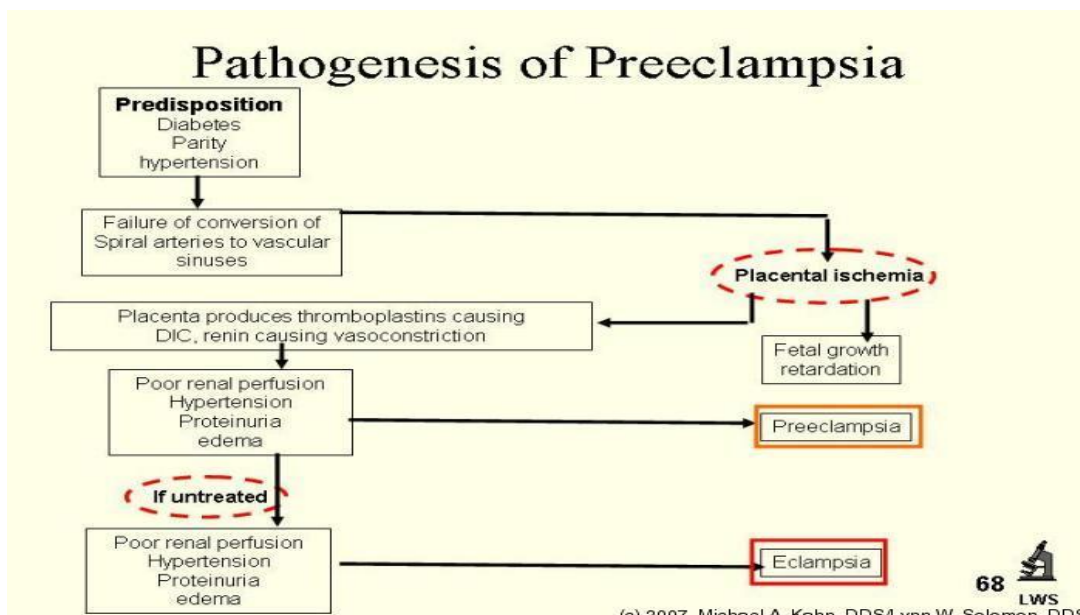
Εικ. 2 Διαφορά μεταξύ των μητροπλακουντιακών αγγείων της φυσιολογικής κύησης και της εγκυμοσύνης που θα εμφανίσει προεκλαμψία.

Διάφορα προυπάρχοντα κλινικά νοσήματα ή άλλες κλινικές εκδηλώσεις μπορεί είτε να προδιαθέτουν είτε να εκδηλώνονται παράλληλα με τη προεκλαμψία λόγω της επίδρασής τους πάνω στη φυσιολογία του ενδοθηλίου των αγγείων όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.



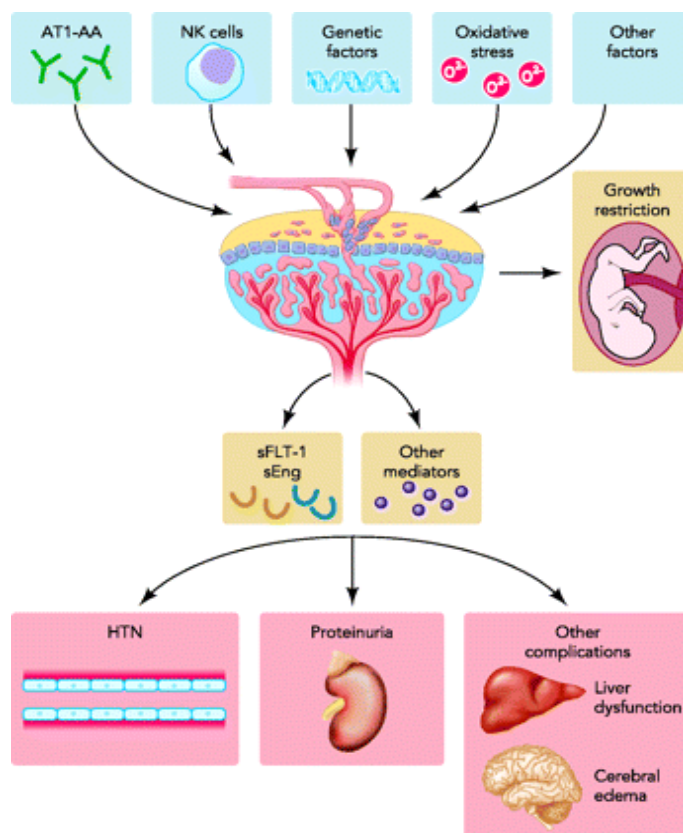
Εικόνα 3. Παράγοντες που δρουν στην υγεία του αγγειακού ενδοθηλίου

Ο κοινός μηχανισμός σε όλες τις ανωτέρω νόσους, είναι η ισχαιμία που προκαλείται στο πλακούντα και η οποία στη συνέχεια οδηγεί στην εκδήλωση όλων των συμπτωμάτων της προεκλαμψίας, επιπλέκεται με την υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου και αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως οδηγεί στη κλινική εκδήλωση της εκλαμψίας. Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Παθογένεση Προεκλαμψίας

1.2.4 Ρόλος αγγειογενετικών παραγόντων: Ανοσοποιητικοί παράγοντες όπως AT1-AA, οξειδωτικό stress, ανωμαλίες ανοσοκυττάρων φυσικών – φονέων NK αλλά και άλλοι παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν πλακουντιακή δυσλειτουργία, που να οδηγεί στην απελευθέρωση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως sFlt1 και sEng και άλλων διαμεσολαβητών φλεγμονής προκαλώντας υπέρταση, πρωτεϊνουρία και άλλες κλινικές επιπλοκές της προεκλαμψίας (12), Εικόνα 5.

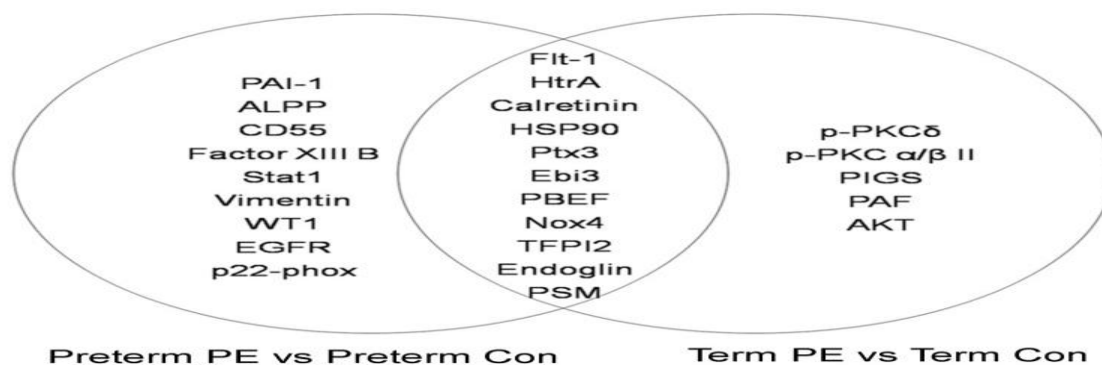


Εικόνα 5. Ο ρόλος των αγγειογενετικών παραγόντων

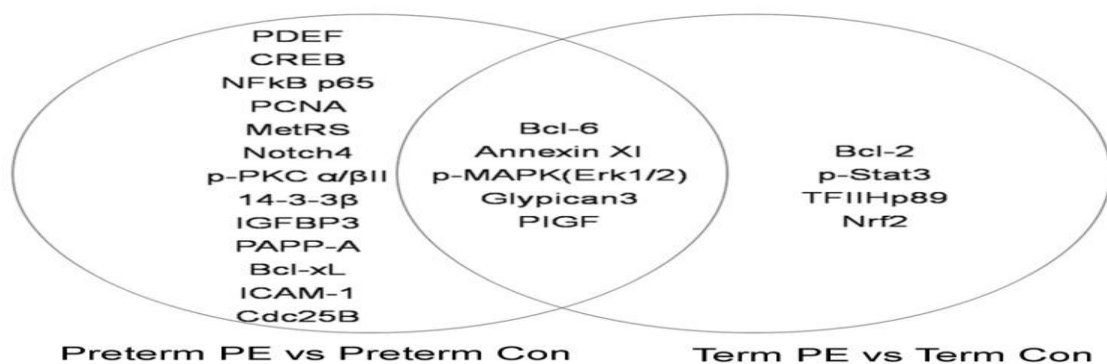
1.2.5 Πρωτεϊνικό προφίλ πλακουντιακού ιστού στη προεκλαμψία: Έχουν αναγνωρισθεί μεταβολές έκφρασης και φωσφορυλίωσης διάφορων ρυθμιστικών πρωτεϊνών της λειτουργίας των κυττάρων του πλακούντα σε πρώιμη αλλά και όψιμη προεκλαμψία. Προσδιορίστηκαν 38 τουλάχιστον πρωτεϊνικοί παράγοντες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στη πρώιμη και 25 τουλάχιστον στην όψιμη μορφή της προεκλαμψίας συγκριτικά με ανάλογες ομάδες γυναικών με φυσιολογική εγκυμοσύνη. Από όλες αυτές τις πρωτεΐνες, 16 μοιράζονται κοινά μονοπάτια έκφρασης και εκφράζονται και στις δύο μορφές της νόσου, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υπάρχει κοινός παθογενετικός μηχανισμός. Ταυτόχρονα όμως υπάρχουν και αρκετά

πρωτεϊνικά μόρια που αλλάζουν συγκέντρωση και έκφραση ανάλογα με την ύπαρξη και τη σοβαρότητα της πρώιμης ή της όψιμης μορφής της νόσου και μας δίνουν μια διαφορετική μοριακή βάση δεδομένων για τη κάθε μορφή της νόσου ξεχωριστά. Εικόνα 6. Η έκφραση συνεπώς των Papp-A, PIGF, PAI-1 και της Flt-1 αποτελεί κλινικό δείκτη πρόβλεψης της σοβαρότητας και του χρόνου εκδήλωσης της νόσου.(13) Εικ. 7.

A Up-regulated Proteins



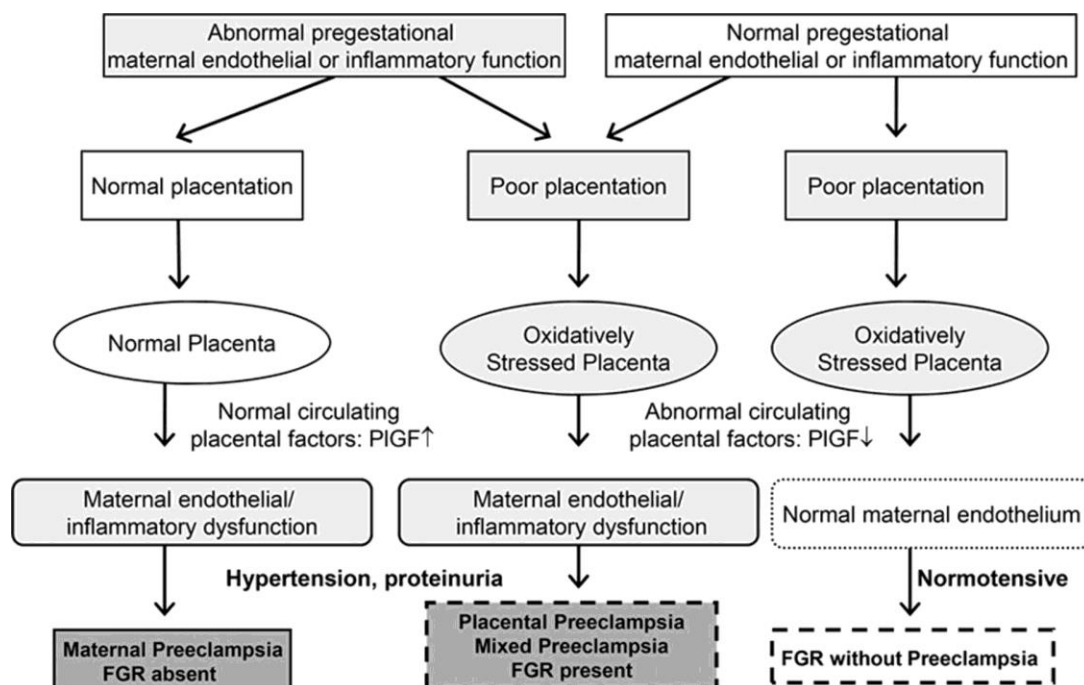
B Down-regulated Proteins



Εικόνα 6. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην εκδήλωση της προεκλαμψίας

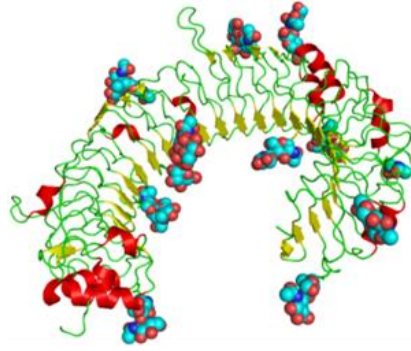
Η μοριακή βάση της πλακουντιακής δυσλειτουργίας από αγγειογενετικούς παράγοντες παραμένει άγνωστη και ο ρόλος των πρωτεϊνών αγγειογένεσης στην αρχική αγγειακή ανάπτυξη του πλακούντα και τη τροφοβλαστική διείσδυση άρχισε μόλις πρόσφατα να διερευνάται. Υποξία, άξονας ρενίνης-αλδοστερόνης-αγγειοτενσίνης II, υπερβάλλον οξειδωτικό στρες και συνκυτιοτροφοβλαστικά θραύσματα, ανοσολογική δυσλειτουργία και γενετική επιδεκτικότητα αναμένεται να ενέχονται στη παθογένεση της προεκλαμψίας. Η τάση επανεμφάνισης προεκλαμψίας σε επόμενη κύηση γυναικών που ήδη εμφάνισαν μια φορά προεκλαμψία, φανερώνει γενετική προδιάθεση των γυναικών

αυτών στην εκδήλωση προεκλαμψίας και ενισχύει το κληρονομικό υπόβαθρο της νόσου.



Εικόνα 7. Η έκφραση των PIGF και της Flt-1 χρησιμοποιείται κλινικά στη πρόβλεψη προεκλαμψίας

1.2.6 Ρόλος υποδοχέων TLR: Οι TLRs είναι μια ομάδα πρωτεϊνών με κεντρικό ρόλο στην εγγενή/φυσική ανοσία (innate/natural immunity). Είναι απλοί μεμβρανικοί μη-καταλυτικοί υποδοχείς που εκφράζονται σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα και αναγνωρίζουν δομικά συντηρημένα μοριακά μοτίβα προερχόμενα από μικροοργανισμούς. Μόλις τα μικρόβια διεισδύσουν από φραγμούς όπως η επιδερμίδα ή ο βλεννογόνος του εντερικού σωλήνα, αναγνωρίζονται από τους TLRs, που ενεργοποιούν τις κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις για την καταπολέμησή τους (14). Έχουν περιγραφεί 13 υποδοχείς TLRs, TLR1-TLR13. Το όνομά τους προέρχεται από το γονίδιο Toll της Δροσόφιλας, που ονομάστηκε από τον θαυμασμό, "Das ist ja toll!" που μεταφράζεται "That's great!", των Γερμανών ερευνητών που το ανακάλυψαν το 1985, Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Η πρωτεΐνη του γονιδίου toll που αναγνωρίστηκε στη *Drosophila* το 1985

Καθώς οι υποδοχείς TLR συνδέουν εγγενή και επίκτητη ανοσία, ελέγχουν την ανοσοφλεγμονώδη απόκριση και διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην εμφάνιση ενδοθηλιακής νόσου σε ασθενείς με επεισόδια εμφράγματος του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικού αγγειακού επεισοδίου, σε συνδυασμό και με τη γενετική προδιάθεση της προεκλαμψίας, θα αναμένονταν πολυμορφισμοί γονιδίων TLR κλινικής σημασίας να επηρεάζουν διαφορετικά τις συχνότητες εμφάνισης της νόσου σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες.

Ειδικότερα οι πολυμορφισμοί (Asp299Gly and Thr399Ile) του TLR4 που συνδέονται με εξασθενημένη απόκριση στην ενδοτοξίνη των gram(-) οργανισμών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχουν ενοχοποιηθεί στην αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας με αντικρουόμενα αποτελέσματα (15, 16)

1.2.7 Επιπλοκές: Η προεκλαμψία ανήκει στη κατηγορία ασθενειών κύησης με διαχρονικές επιπτώσεις στην υγεία των απογόνων. Απόγονοι κυήσεων προεκλαμψίας έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ευρέως φάσματος ασθενειών και κυρίως ενδοκρινολογικών, διατροφικών, μεταβολικών, καρδιαγγειακών, αναπνευστικών, νεφρολογικών και ανοσοαιματολογικών κατά τη νεογνική, παιδική, εφηβική και ενήλικη ζωή (17). Επιπλέον η προεκλαμψία της μητέρας επηρεάζει τις αδρές σωματομετρικές παραμέτρους και τη γενικότερη ανάπτυξη των απογόνων μέχρι τουλάχιστον και την ηλικία των 13 ετών (18). Προφανώς η έκθεση της μητέρας σε παθολογικό στρες κατά την εγκυμοσύνη, δημιουργεί αρνητικό αποτύπωμα στο ομοιοστατικό προφίλ του απογόνου.

1.2.8 Έλεγχος προεκλαμψίας: Η έγκαιρη πρόγνωση παθολογικής εγκυμοσύνης σε προσυμπτωματικό στάδιο σε συνδυασμό με την επιλογή του κατάλληλου χρόνου

περάτωσης της κύησης, θα περιορίζαν σημαντικά τη παθογένεια λόγω προεκλαμψίας. Η γονοτυπική κατανομή του πληθυσμού σε ομάδες υψηλού ή χαμηλού κινδύνου για εκδήλωση προεκλαμψίας, θα συνέβαλε αποτελεσματικά στο σκοπό αυτό. Καθώς μητέρα με φυσιολογικό τοκετό μπορεί να αναπτύξει προεκλαψία σε επόμενη εγκυμοσύνη και αντίστροφα, είναι προφανές ότι επιπλέον παράγοντες, πρέπει να συνυπάρχουν σε περιβάλλον γενετικής προδιάθεσης για την εκδήλωση της πάθησης. Σε πλήρη ταύτιση με το μοντέλο αυτό ανήκουν και πολυμορφισμοί γονιδίων που εξασθενούν την άμυνα του οργανισμού καθώς και η γενετική αυτή προδιάθεση, πρέπει να συνοδεύεται από κάποιο δεύτερο κτύπημα- ερέθισμα, όπως μόλυνση με λοιμογόνους παράγοντες, για την εκδήλωση παθογένειας. Η ομάδα υποδοχέων TLR πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις και επιλέχθηκε για γονοτυπικό έλεγχο προδιάθεσης για εκδήλωση προεκλαμψίας λόγω και του κεντρικού της ρόλου στη φυσική ανοσία. Καταγράφηκαν οι συχνότητες των πολυμορφισμών *TLR 2* (Asp677Trp, R677W; MIM: 603028.0001 and Arg753Gln, R753Q) and *TLR 4* (Asp299Gly, D299G; MIM: 603030.0001 and Thr399Ile, T399I; MIM: 603030.0002) σε παθολογικά και φυσιολογικά δείγματα, σαν πιθανοί προδιαθεσικοί δείκτες προεκλαμψίας στη Κεντρική Ελλάδα.

1.2.9 Επίλογος: Η προεκλαμψία σαν πολυπαραγοντική νόσος αναμένεται να διαθέτει ευρύ φάσμα προδιαθεσικών δεικτών παθογένειας. Οι πολυμορφισμοί *TLR 4* συνιστούν συνεπώς μικρό μόνο μέρος του προδιαθεσικού της δυναμικού αναφορικά κυρίως με το ανοσολογικό της υπόβαθρο. Επιπλέον προγνωστικοί δείκτες προδιάθεσης θα πρέπει να αναζητηθούν για πληρέστερη κάλυψη κλινικών περιστατικών υψηλού κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας προσυμπτωματικά. Η ανάδειξη της πλήρους αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS) σε έλεγχο ρουτίνας, σε συνδυασμό με συνεκτίμηση του προστατευτικού ή επιβαρυντικού ρόλου επιμέρους συσχετισμών, όπως το στίγμα στη Κεντρική Ελλάδα, θα συνέβαλαν αισθητά στη μείωση της παθογένειας του ζεύγους μητέρα-παιδί λόγω προεκλαμψίας. Σε κάθε περίπτωση η συμμετοχή των πολυμορφισμών *TLR 4* στον προσυμπτωματικό έλεγχο της πρώιμης προεκλαμψίας θα άξιζε να ενταχθεί στην στενή ομάδα προγνωστικών δεικτών που θα πρέπει να συνεκτιμώνται για την καλλίτερη πρόληψη της νόσου στην Κεντρική Ελλάδα.

1.3 Εισαγωγή Διατριβής

Η προεκλαμψία (PE) είναι σύνθετη πολυπαραγοντική νόσος πλακουντιακής προέλευσης και από τις κύριες αιτίες μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας και θνητότητας, που επηρεάζει το 3% έως 5% όλων των κυήσεων (19, 20). Η PE χαρακτηρίζεται από υπέρταση, πρωτεϊνουρία, περιφερικό οίδημα και δυσλειτουργία των βασικών οργάνων της μητέρας, η οποία ορίζεται από νέα εμφάνιση οποιουδήποτε από τα ακόλουθα: Νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική δυσλειτουργία, νευρολογικές επιπλοκές - εκλαμψία, εγκεφαλικό επεισόδιο, σύγχυση, σοβαρός πονοκέφαλος, τύφλωση ή επίμονα οπτικά σκοτώματα και αιματολογικές επιπλοκές, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (DIC) ή αιμόλυση (15, 21). Παρουσιάζεται συνήθως μετά από 20 εβδομάδες κύησης και όταν εμφανίζεται νωρίς (πριν τις 34 εβδομάδες), σχετίζεται με μεγαλύτερους κινδύνους της μητέρας και του εμβρύου, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης, της υποξίας και της απώλειας του εμβρύου (22, 23). Διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες πρόβλεψης, όπως ιστορικό PE σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, οικογενειακό ιστορικό PE, χρόνια υπέρταση, πρώτη εγκυμοσύνη, νέα πατρότητα, ηλικία με υψηλότερο κίνδυνο για πολύ νεαρές έγκυες γυναίκες καθώς και έγκυες γυναίκες άνω των 40 ετών, οι γυναίκες με μαύρη φυλή έχουν υψηλότερο κίνδυνο, παχυσαρκία, πολλαπλή εγκυμοσύνη, χρονικό διάστημα μεταξύ των κυήσεων (εάν είναι μικρότερο των δύο ετών ή περισσότερο από 10 χρόνια) και ιστορικό ορισμένων καταστάσεων όπως η χρόνια υψηλή αρτηριακή πίεση, οι ημικρανίες τύπου 1 ο διαβήτης τύπου 2, νεφρική νόσος και εξωσωματική γονιμοποίηση. Επηρεασμένη τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, η ανάπτυξη PE παρουσιάζει πολυπαραγοντική κληρονομικότητα, υποδεικνύοντας την πιθανή συμβολή του γονικού γενετικού προφίλ στην παθογένεσή της (16, 24-27).

Η προσαρμογή της μητέρας στην εγκυμοσύνη είναι απαραίτητη για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη του ημι-αλλογενούς εμβρύου. Απαιτεί ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα με κατάλληλα ρυθμισμένα εγγενή και επίκτητα συστατικά για αποτελεσματικό έλεγχο της ανοσοφλεγμονώδους αντίδρασης στα διάφορα ερεθίσματα-απειλές. Τα ακατάλληλα ανοσοφλεγμονώδη πρότυπα έχουν συσχετισθεί με ανώμαλη τροφοβλαστική διήθηση (28), ενδοθηλιακή βλάβη (29/13) και εμπλέκονται στην παθογένεση των κοινών πλακουντιακών και υπερτασικών διαταραχών της

εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένης της προεκλαμψίας, της πιο σοβαρής πρώιμης μορφής της και της καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης (16, 29).

Έγχυση χαμηλής δόσης ενδοτοξίνης ή λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ένα ισχυρό αντιγόνο που υπάρχει κανονικά στα αρνητικά κατά gram βακτήρια και επάγει συστηματική προ-φλεγμονώδη αντίδραση, σε αρουραίους, προκάλεσε σύνδρομο τύπου PE, με υπέρταση, πρωτεϊνουρία και σπειραματική ενδοθηλίωση (30). Η πρόκλησης φλεγμονής με τη μεσολάβηση LPS απελευθερώνει προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs) όπως οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), βασικά συστατικά της εγγενούς ανοσίας. Η αναγνώριση LPS από τους αισθητήρες TLR4 οδηγεί στην παραγωγή πυρηνικού παράγοντα κάπα Β και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1b, IL-6, TNF-a) που σηματοδοτούν τα κύτταρα του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος (κυρίως T κύτταρα) να προκαλέσουν ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση για την αποτελεσματική κάθαρση του επιβλαβούς παράγοντα. Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα TLR4 έχουν συσχετισθεί με εξασθενημένη ανοσοαπόκριση σε LPS καθώς και σε ποικίλες εξωγενείς και ενδογενείς παθογενετικές προσβολές, που οδηγούν σε ακατάλληλα ανοσοφλεγμονώδη πρότυπα που μπορεί να είναι αναποτελεσματικά στην αντιμετώπιση κάποιου μολυσματικού παράγοντα αλλά και να προκαλέσουν τις αρνητικές συνέπειες της ανεξέλεγκτης φλεγμονής (16, 31-36).

Το ανθρώπινο γονίδιο TLR4 (MIM C603030) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9q33.1 και τα πολυμορφικά του αλληλόμορφα Asp299Gly ή D299G ή (A896G) (MIM 603030.001) και Thr399Ile ή T399I ή (C1196T) (MIM 603030.002), που ως γνωστόν επηρεάζουν το σύστημα αναγνώρισης ενδοτοξίνης του TLR4 έχουν ενοχοποιηθεί στην σήψη (37), το πρόωρο τοκετό (38), την αθηρογένεση (39) και την πρώιμη προεκλαμψία (early-onset pre-eclampsia, EOP), αν και υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (15, 16, 23).

Κεφάλαιο 2 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2.1. Η ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ ΩΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

Η εκλαμψία αναγνωρίστηκε αρχικά σαν μία σπασμώδης διαταραχή της κυήσεως. Ο όρος προέρχεται από την ελληνική λέξη έκλαμψις, υποδηλώνοντας την ξαφνική έναρξη των σπασμών σε εγκυμονούσες γυναίκες. Ο όρος προεκλαμψία εισήχθη αργότερα για να περιγράψει την κατάσταση που προηγείται της εκλαμψίας (40).

Η προεκλαμψία εκδηλώνεται σαν επιπλοκή στο 3-5% όλων των εγκυμοσυνών και αποτελεί την κύρια αιτία της μητρικής θνησιμότητας, των πρόωρων γεννήσεων και κατ' επέκταση της νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας (8). Αριθμεί 8.5 εκατομμύρια περιπτώσεις (41) και περίπου 63.000 μητρικούς θανάτους ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα (42). Η προεκλαμψία μπορεί να προχωρήσει σε εκλαμψία, η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση έντονων γενικευμένων σπασμών και επηρεάζει 2.7-8.2 γυναίκες ανά 10.000 τοκετούς (8, 43). Είναι γεγονός ότι ούτε οι επιπτώσεις, ούτε η θεραπεία της ασθένειας έχουν αλλάξει ουσιωδώς μέσα στον τελευταίο αιώνα και σε σοβαρές περιπτώσεις, η μόνη αποτελεσματική θεραπεία παραμένει ο πρόωρος τοκετός (44, 45).

Μέχρι πρότινος η προεκλαμψία οριζόταν ως μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την ξαφνική εκδήλωση υπέρτασης (συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg) και πρωτεϊνουρίας (> 300 mg/24 h) μετά τις 20 εβδομάδες κύησης σε μία γυναίκα που μέχρι τότε παρουσίαζε φυσιολογική αρτηριακή πίεση. Πλέον, το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων προτείνει ότι η πρωτεϊνουρία δεν απαιτείται για τη διάγνωση της προεκλαμψίας. Καθώς η πρωτεϊνουρία δε θεωρείται υποχρεωτικό διαγνωστικό κριτήριο της προεκλαμψίας, αυτή μπορεί να διαγνωσθεί ως εμφάνιση υπέρτασης σχετιζόμενη με θρομβοκυτταροπενία, αυξημένες τρανσαμινάσες στο ήπαρ και βλάβη της νεφρικής λειτουργίας η οποία διαπιστώνεται με μέτρηση της κρεατινίνης του ορού (41). Αν και το οίδημα ιστορικά αποτελούσε κι αυτό μέρος της διαγνωστικής τριάδας για την προεκλαμψία, συνιστά παράλληλα κοινό χαρακτηριστικό της εγκυμοσύνης, γεγονός που εξαλείφει τη χρησιμότητά του σαν ειδικό παθολογικό σύμπτωμα. Ωστόσο, η ξαφνική εκδήλωση σοβαρού οιδήματος, ειδικά στο πρόσωπο και τα χέρια, μπορεί να είναι

σύμπτωμα λόγω προεκλαμψίας και πολλές φορές αποτελεί τη μοναδική ανιχνεύσιμη από την ασθενή αλλαγή (46).

Όντας ένα πολυσυστηματικό σύνδρομο, η προεκλαμψία στοχεύει αρκετά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του ήπατος και του εγκεφάλου. Οι επιπλοκές της προεκλαμψίας ή της εκλαμψίας περιλαμβάνουν αγγειο-εγκεφαλικά επεισόδια, ρήξη ήπατος, πνευμονικό οίδημα ή οξεία νεφρική ανεπάρκεια που μπορούν να οδηγήσουν σε μητρικό θάνατο. Η βλάβη του ενδοθηλίου των σπειραματικών σωληναρίων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των πρωτεϊνών στα ούρα και θεωρείται χαρακτηριστική βλάβη της προεκλαμψίας, αλλά μπορεί επίσης να προκύψει και σε υγιείς εγκύους (8). Στον εγκέφαλο, το ήπαρ και τα επινεφρίδια, η εξάπλωση της ενεργοποίησης της πήξης και της καταστροφής του ενδοθηλίου οδηγεί σε βλάβες που συνάδουν με υποξία των ιστών (45). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων που οδηγούνται σε θάνατο οφείλονται σε εγκεφαλική αιμορραγία, η οποία αποτελεί επακόλουθο της μη ελεγχόμενης υπέρτασης (42, 47). Άλλες επιπλοκές της προεκλαμψίας είναι οι επιληπτικές κρίσεις (στην εκλαμψία), η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, το σύνδρομο HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzyme levels, Low Platelet levels – αιμόλυση, αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων*), οι διαταραχές της όρασης και η αποκόλληση του πλακούντα (41).

Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται ως μία ετερογενής διαταραχή και κατηγοριοποιείται σε πρώιμη που εκδηλώνεται πριν τις 34 εβδομάδες ή όψιμη που εμφανίζεται στις ή και μετά τις 34 εβδομάδες, σύμφωνα με την ηλικία κύησης κατά τη διάγνωση ή τον τοκετό (48). Έχει παρατηρηθεί ότι ο σχετικός κίνδυνος για περιγεννητικό θάνατο και σοβαρή νεογνική νοσηρότητα αυξάνεται στην πρώιμη προεκλαμψία συγκριτικά με την όψιμη. Έτσι, οι ασθενείς που εμφανίζουν προεκλαμψία πρώιμα πριν τις 34 εβδομάδες κύησης αντιπροσωπεύουν περίπου μόνο το 10% των συνολικών περιστατικών, αλλά αποτελούν και τη μεγαλύτερη ομάδα μητρικών και περιγεννητικών επιπλοκών (49). Η πρώιμη προεκλαμψία σχετίζεται συχνά με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και παρουσιάζει μη φυσιολογικές τιμές Doppler για τις μητριάιες και ομφαλικές αρτηρίες (50). Επίσης, σημειώνεται ότι τα περιστατικά πρώιμης εμφάνισης προεκλαμψίας καταλήγουν πιο συχνά σε πρόωρο τοκετό και αναπτύσσουν σύνδρομο

HELLP, ενώ στην όψιμη προεκλαμψία η κατάσταση της μητέρας είναι συγκριτικά ηπιότερη και η πρόγνωση για το νεογνό ευνοϊκότερη συνήθως (49, 51).

Το εάν η πρώιμη και όψιμη προεκλαμψία διαθέτουν διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς ή είναι απλώς διαβαθμίσεις της ίδιας υποκείμενης πάθησης παραμένει ασαφές (8). Επιπρόσθετα, φαίνεται να διαφέρουν όσον αφορά σε αρκετούς παράγοντες κινδύνου και να οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα, επομένως θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως διαφορετικές οντότητες από αιτιολογικής και προγνωστικής πλευράς (49).

2.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Οι παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη προεκλαμψίας περιλαμβάνουν τη χρόνια υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη, την ηλικία της μητέρας (<20 ετών ή >35 ετών), την παχυσαρκία, το ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, τη θρομβοφιλία, αυτοάνοσες διαταραχές, αγγειακές παθήσεις, νεφροπάθειες, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, το οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας (μητέρα ή αδερφή), την εθνικότητα και τις πολύδυμες κυήσεις (8, 52, 53). Οπιοϋάρχοντες παράγοντες κινδύνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αλλάζοντας την ευαισθησία στις προσαρμοστικές αλλαγές που εμπλέκονται στην εγκυμοσύνη και αυξάνοντας έτσι την επιρρέπεια στην προεκλαμψία (54).

Η προεκλαμψία συχνά προκύπτει σε γυναίκες που διανύουν την πρώτη τους εγκυμοσύνη. Αυτή η παρατήρηση έχει αποδοθεί σε έναν ανοσολογικό μηχανισμό, καθώς το σύστημα ανοσίας της μητέρας αναπτύσσει ανοχή στα πατρικά αλλοαντιγόνα, μετά την έκθεση στο σπερματικό υγρό και/ή το σπέρμα. Η περιορισμένη έκθεση στο σπέρμα πιστεύεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της προεκλαμψίας, γεγονός που πιθανά να εξηγεί τον αυξημένο κίνδυνο αυτής της κατάστασης σε γυναίκες όπου μεσολαβεί σύντομο χρονικό διάστημα μεταξύ της πρώτης συνουσίας και της σύλληψης, σε αυτές που υποβάλλονται σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, σε γυναίκες που επιλέγουν ως μέθοδο αντισύλληψης το διάφραγμα και σε μητέρες που έχουν διαφορετικό σύντροφο στην επόμενη εγκυμοσύνη (55). Έχει προταθεί επίσης υπόθεση συμβολής του πατρικού παράγοντα στην πιθανότητα εμφάνισης

προεκλαμψίας. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι υπό ορισμένες προϋποθέσεις, διαφορετικοί σύντροφοι του ίδιου άνδρα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν προεκλαμψία, εφόσον αυτό έχει συμβεί ήδη μία φορά (56).

Όπως προαναφέρθηκε διαφορετικοί παράγοντες φαίνεται να σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με την προδιάθεση για εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας με έμφαση στην εμφάνιση προεκλαμψίας σε προηγούμενη εγκυμοσύνη, την προϋπάρχουσα υπέρταση και την εθνικότητα, ενώ για την όψιμη προεκλαμψία ο αυξημένος κίνδυνος μπορεί να συνδέεται με οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας, υψηλό δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία της μητέρας και την αφρικάνικη καταγωγή (57).

2.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Η προεκλαμψία έχει χαρακτηριστεί ως η «νόσος των θεωριών», γεγονός που υποδηλώνει τη σύγχυση που συνοδεύει την αιτιολογία και την παθοφυσιολογία της (44). Τα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας εμφανίζονται στο δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης, αλλά οι αρχικοί παθογενετικοί μηχανισμοί προκύπτουν πολύ νωρίτερα (41). Οι ρίζες της προεκλαμψίας είναι πολύπλοκες και φαίνεται να βασίζονται σε αναντιστοιχία των εμβρυοπλακουντιακών απαιτήσεων και της μητροπλακουντιακής παροχής (58), μια κατάσταση που επίσης προκύπτει στην ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (59). Ο πλακούντας κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη της διαταραχής. Η προεκλαμψία μπορεί να προκύψει και χωρίς την ύπαρξη εμβρύου στην περίπτωση υδατιδώδους μύλης κύησης (60). Στους παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην προεκλαμψία ανήκουν η ατελής πλακουντιοποίηση, το οξειδωτικό στρες, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα αυτοαντισώματα για τον υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης II, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η παρουσία αντι-αγγειογενετικών συνθηκών (8). Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι μία εκτεταμένη φλεγμονώδης απόκριση της μητέρας στην εγκυμοσύνη με έντονη ενεργοποίηση του συστήματος φυσικής ανοσίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας (61, 62).

2.3.1 Ατελής Πλακουντοποίηση - Μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης, η ροή αίματος στον πλακούντα αυξάνει για να διευκολύνει την αιμάτωση στο μεσολάχινο χώρο του πλακούντα και να

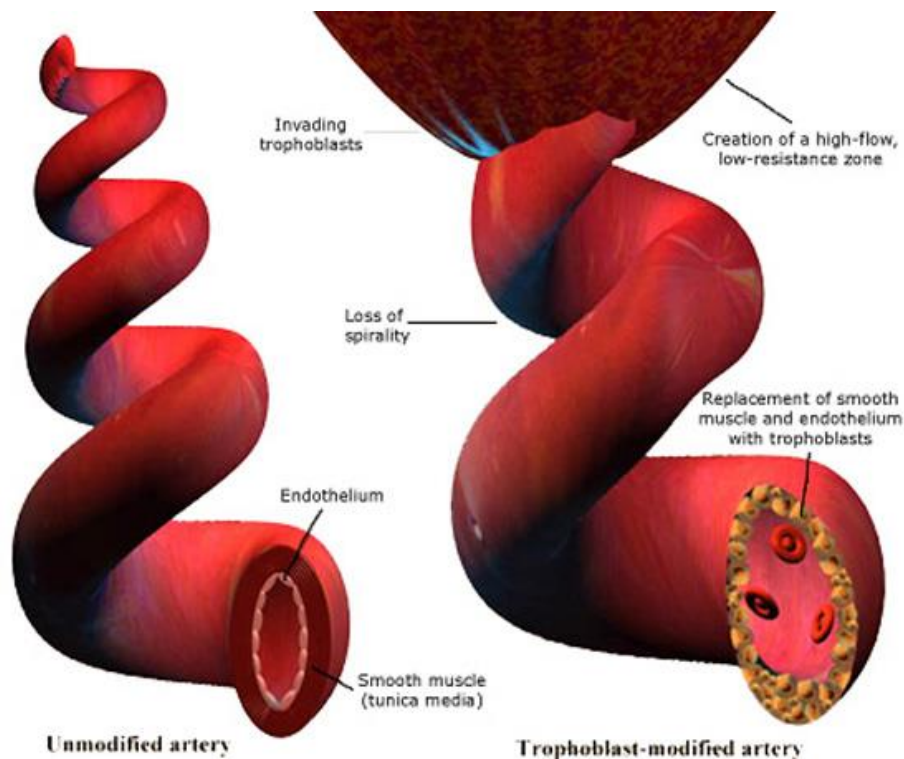
υποστηρίζει την ανάπτυξη του εμβρύου. Η αυξημένη ροή αίματος επιτυγχάνεται από τη φυσιολογική μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών του πλακούντα, μία διαδικασία που ξεκινά στο πρώτο τρίμηνο και ολοκληρώνεται στις 18-20 εβδομάδες κύησης (63, 64). Η τροφοβλάστη εισβάλλει στο αρτηριακό τοίχωμα και μετατρέπει τις σπειροειδείς αρτηρίες από αγγεία με μικρή διάμετρο σε αγγεία με μεγάλη διάμετρο, επιτρέποντας έτσι την επαρκή αιμάτωση του πλακούντα (63). Οι σπειροειδείς αρτηρίες, οι οποίες είναι στενά αγγεία, διαστέλλονται εντυπωσιακά στα άκρα τους προς το φθαρτό χιτώνα, χάνοντας το ενδοθήλιο, το λείο μυϊκό ιστό και το εσωτερικό ελαστικό στρώμα τους. Αυτές οι τροποποιήσεις εκτείνονται ενδότερα, στο 1/3 του μυομητρίου έχοντας ως αποτέλεσμα την μετατροπή του τελικού τμήματος των σπειροειδών αρτηριών σε μεγάλης διαμέτρου αγγεία που δε μπορούν να συσταθούν σε απόκριση σε χημικά ή νευρικά σήματα (65).

Η παθοφυσιολογική διαδικασία της προεκλαμψίας ξεκινά με ατελή εισβολή της τροφοβλάστης νωρίς στην εγκυμοσύνη, η οποία προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες συμβάλλοντας στην ανάπτυξη συστηματικής δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στις μεταγενέστερες φάσεις της ασθένειας, με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της προεκλαμψίας (66). Στην προεκλαμψία οι σπειροειδείς αρτηρίες δεν καταφέρνουν να πραγματοποιήσουν τη φυσιολογική μετατροπή που προαναφέρθηκε, γεγονός που θεωρείται ότι δικαιολογεί την μητροπλακουντιακή ισχαιμία κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου (8). Κάποια αγγεία υφίστανται αναδιαμόρφωση επιφανειακά, στα τμήματά τους που βρίσκονται στο φθαρτό αλλά αυτή η αλλαγή δε φτάνει ποτέ στο μυομήτριο και κάποια αγγεία δεν μετασχηματίζονται καθόλου (67).



Εικόνα 9. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής πλακουντιοποίησης, τα κύτταρα της κυτταροτροφολάστης σχηματίζουν μία άκρως εισβλητική εξωλαχνική τροφοβλάστη που μπορεί να μεταναστεύσει στο φθαρτό και να εισβάλει στο 1/3 του μυομητρίου, επάγοντας την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριδίων. Αυτές οι αλλαγές δε συμβαίνουν φυσιολογικά στην προεκλαμψία (66). © Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology

Επιπλέον, οι σπειροειδείς αρτηρίες που δεν έχουν υποστεί τη μετατροπή είναι επιρρεπείς σε αθηρωμάτωση, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία φορτωμένων με λιπίδια μακροφάγων μέσα στον αυλό, ινώδη νέκρωση του αρτηριακού τοιχώματος και περιαγγειακή διήθηση των μονοπύρηνων. Η αθηρωμάτωση μπορεί να παρακωλύει περαιτέρω τη ροή αίματος στον πλακούντα κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποτυχία της φυσιολογικής μετατροπής των αρτηριών δεν είναι ούτε ειδική για την προεκλαμψία, ούτε επαρκής για να την προκαλέσει, καθώς το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα γυναικολογικά σύνδρομα όπως η αυτόματη έκτρωση, η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, ο εμβρυϊκός θάνατος, η ρήξη του πλακούντα, ο πρόωρος τοκετός και η πρόωρη ρήξη των υμένων (8).



Εικόνα 10. Διαδικασία μετατροπής των σπειροειδών αρτηριών. Σταδιακή απώλεια της φυσιολογικής μυϊκής ελαστικής δομής του αρτηριακού τοιχώματος και αντικατάσταση του λείου μυϊκού ιστού από κύτταρα τροφοβλάστης (<http://www.rcdrg.sgu.ac.uk/research/trophoblasts>).

2.3.2 Ισχαιμία του πλακούντα

Η τροφοβλάστη αποτυγχάνει να αναδιαμορφώσει τις σπειροειδείς αρτηρίες, οδηγώντας σε υποαιμάτωση και ισχαιμία του πλακούντα (44), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην απελευθέρωση παραγόντων στη μητρική κυκλοφορία, οι οποίοι είναι ικανοί να επάγουν τις κλινικές εκδηλώσεις της ασθένειας. Αυτή η αντίληψη προήλθε από παρατηρήσεις του ότι αποφράξεις του πλακούντα αποτελούν κοινό φαινόμενο σε ασθενείς με εκλαμψία. Το 1914, οι ερευνητές πρότειναν ότι τα έμφρακτα του πλακούντα οφείλονται σε μείωση της μητρικής παροχής αίματος στον πλακούντα και ότι ένας νεκρωτικός πλακούντας απελευθερώνει διαλυτούς παράγοντες απευθείας στο μεσολάχνιο χώρο και τη μητρική κυκλοφορία. Αυτοί οι διαλυτοί παράγοντες πιστεύεται ότι προκαλούν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ενδοαγγειακή φλεγμονή και ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού (8).

2.3.3 Οξειδωτικό στρες

Μέχρι περίπου τις 10 εβδομάδες κύησης το έμβρυο βρίσκεται σε περιβάλλον χαμηλού οξυγόνου εφοδιαζόμενο με θρεπτικά συστατικά από τις εκκρίσεις των ενδομήτριων αδένων (68). Η φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου στον πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο είναι μόνο περίπου 3% O₂ (69). Στη φυσιολογική διαδικασία της πλακουντιοποίησης, η διείσδυση της τροφοβλάστης ρυθμίζεται από την διαφορά της συγκέντρωσης οξυγόνου μεταξύ του πλακούντα και των αρτηριών της μητέρας (70). Η τροφοβλάστη αποκρίνεται στο αρχικά χαμηλό οξυγόνο με πολλαπλασιασμό και στο ακόλουθο περιβάλλον υψηλού οξυγόνου λόγω αιμάτωσης, με μειωμένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση προς ένα διεισδυτικό φαινότυπο (71).

Το οξειδωτικό στρες είναι σχετικό με την παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας, αφού επάγει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, καθώς επίσης και κυτταρικών καταλοίπων από την τροφοβλάστη (72). Η αιτία του οξειδωτικού στρες στους πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία πιστεύεται ότι είναι η εναλλαγή υποξίας και επανοξυγόνωσης, που πιθανώς προκύπτει σαν αποτέλεσμα της ατελούς μετατροπής του τμήματος των σπειροειδών αρτηριών στο μυομήτριο (73). Η παραμένουσα κατάσταση υποαιμάτωσης δημιουργεί υποξία στον πλακούντα και τοπικό οξειδωτικό στρες, έχοντας ως αποτέλεσμα μια συστηματική φλεγμονώδη απόκριση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (74). Η έκθεση στις αυξημένες ρίζες οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε καρβοξυλίωση των πρωτεϊνών, υπεροξειδωση των λιπιδίων και οξείδωση του DNA, όλα εκ των οποίων έχουν παρατηρηθεί σε πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία (73). Έχει βρεθεί ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων αυξάνεται πριν και μετά τον τοκετό σε γυναίκες με προεκλαμψία, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται υπό συνεχές οξειδωτικό στρες που συμβάλλει σε φλεγμονώδη απόκριση (75). Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του πλακούντα διαταράσσονται σε ασθενείς με προεκλαμψία όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη (76).

2.3.4 Στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Οι στενές σπειροειδείς αρτηρίες δημιουργούν συνθήκες για ισχαιμία στο μεσολάχνιο χώρο. Η βλάβη αυτή μπορεί με τη σειρά της να οδηγήσει σε στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο ρυθμίζει την ομοιόσταση του κυττάρου μέσω της συμμετοχής του στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και τη σωστή δημιουργία μέσω ελίκωσης των πρωτεϊνών (77). Σε συνθήκες υποξίας, το ενδοπλασματικό δίκτυο αναστέλλει την ελίκωση των πρωτεϊνών (απόκριση μη ελικωμένης πρωτεΐνης, unfolded protein response - UPR). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι και απόπτωση (78). Η απόπτωση της τροφοβλάστης οδηγεί σε απελευθέρωση μικρο- και νανο- σωματιδίων στη μητρική κυκλοφορία, τα οποία μπορεί να διεγείρουν μια ενδοαγγειακή φλεγμονώδη απάντηση (79). Στοιχεία που υποστηρίζουν την εμπλοκή του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο στην προεκλαμψία και την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της απόκρισης UPR όπως φαίνεται από την αύξηση παραγόντων που εμπλέκονται σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, χαρακτηριστικά της ενεργοποίησης της UPR, που ακολουθεί μετά το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο στον πλακούντα (8, 78).

2.3.5 Δυσλειτουργία του Ενδοθηλίου

Αν και η προεκλαμψία φαίνεται να πηγάζει από τον πλακούντα ο ιστός που επηρεάζεται περισσότερο είναι το μητρικό ενδοθήλιο (46). Κοινή αντίληψη αποτελεί το γεγονός ότι το ενδοθήλιο των αγγείων συνιστά έναν πρώιμο στόχο της παθοφυσιολογικής τροποποίησης στην προεκλαμψία (81). Η καταστροφή ή δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου εμπλέκεται σε διάφορες παθογενείς καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης και η προεκλαμψία, όπου παρατηρούνται αλλαγές στη σύνθεση - απελευθέρωση από το ενδοθήλιο αγγειοδραστικών μεσολαβητών (όπως προστακυκλίνη, θρομβοξάνη, νιτρικό οξύ), κυτταρικών μορίων προσκόλλησης και κυτταροκινών και αλλαγές στη διαπερατότητα των αγγείων (82). Επιπρόσθετα, στην προεκλαμψία είναι πλέον καλά καθορισμένη η μορφολογική αλλαγή του ενδοθηλίου των σπειροειδών τριχοειδών στα σπειραματικά σωληνάρια των νεφρών που συνοδεύει τη διαταραχή και έχουν προσδιοριστεί αλλαγές

της ενδοθηλιακής λειτουργίας σε αγγεία που έχουν εξεταστεί *in vitro* από γυναίκες με προεκλαμψία (44).

2.3.6 Αντι-αγγειογενετικές συνθήκες

Η αγγειογένεση και ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα, είναι ουσιώδεις προϋποθέσεις για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη (83). Η μη σωστή αγγειογένεση έχει θεωρηθεί από παλιά ως ένα μονοπάτι προς την προεκλαμψία (84) και ενδελεχής έρευνα έδειξε ότι μία αντι-αγγειογενετική κατάσταση εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας (85).

Ο ανθρώπινος πλακούντας παράγει μια ποικιλία αγγειογενετικών παραγόντων, με πιο σημαντικούς τους VEGF και PlGF (86). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) είναι ειδικό για το ενδοθήλιο μιτογόνο που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην προώθηση της αγγειογένεσης και στα ώριμα αγγεία σταθεροποιεί το ενδοθήλιο (87). Ο VEGF αλληλεπιδρά με δύο υψηλής συγγένειας υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, τους KDR και Flt-1, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (88). Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (Placental Growth Factor – PlGF) είναι επίσης ένας αγγειογενετικός παράγοντας αύξησης που ενισχύει τη σηματοδότηση του VEGF αποσυνδέοντας τον VEGF από τον Flt-1 και επιτρέποντάς του έτσι να συνδεθεί με τον πιο ενεργό KDR (89, 90). Μελέτες έχουν δείξει ο πλακούντας απελευθερώνει διαλυτό Flt-1 (soluble Flt-1 - sFlt-1) στη μητρική κυκλοφορία, ο οποίος ανταγωνίζεται τόσο τον VEGF όσο και τον PlGF, προσδένοντάς τους και εμποδίζοντάς τους να αλληλεπιδράσουν με τους ενδογενείς υποδοχείς τους. Με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στην υπέρταση, την πρωτεϊνουρία και τη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζονται με την προεκλαμψία (91). Η κυρίαρχη πηγή των αυξημένων στο πλάσμα επιπέδων sFlt-1 στην προεκλαμψία είναι ο πλακούντας (85), αν και ο sFlt-1 μπορεί επίσης να παράγεται από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (92).

Ένας δεύτερος αντι-αγγειογενετικός παράγοντας που εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας είναι η διαλυτή ενδογλίνη (soluble endoglin–sEng), ένας συνυποδοχέας των TGF-β1 και TGF-β3 που επάγει τη μετανάστευση και τον

πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (93). Το μόριο αυτό παρεμβαίνει στη σύνδεση του TGF-β1 με τον υποδοχέα του και με τον τρόπο αυτό επηρεάζει την παραγωγή νιτρικού οξέος, την αγγειοδιαστολή και το σχηματισμό των τριχοειδών από ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* (94). Σε ζωικά μοντέλα, η sEng δρα μαζί με τον sFlt-1 επάγοντας μία σοβαρή κατάσταση που προσομοιάζει στην προεκλαμψία (95).

2.3.7 Αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη ανταποκρισιμότητα στην αγγειοτενσίνη II. Ωστόσο, οι εγκυμονούσες με προεκλαμψία έχουν αυξημένη ευαισθησία στις επιδράσεις της αγγειοτενσίνης II, μία διαφορά που μπορεί να εντοπιστεί στις 24 εβδομάδες κύησης (96). Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη φυσιολογική αντίσταση στην αγγειοτενσίνη II σε μία υγιή εγκυμοσύνη και για την ενισχυμένη απόκριση σε αυτή στην προεκλαμψία περιλαμβάνουν γενετική προδιάθεση, μη προσαρμοσμένες ανοσολογικές απαντήσεις και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (97). Μία υποκατηγορία γυναικών έχουν ανιχνεύσιμα στον ορό αντισώματα έναντι του υποδοχέα τύπου-1 της αγγειοτενσίνης II (αυτοαντισώματα AT₁) (98), τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα σε ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και μεσαγγειακά κύτταρα (8). Τα αυτοαντισώματα AT₁ μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση της οξειδάσης NADPH, ένα βασικό ένζυμο στη σύνθεση των δραστικών ριζών οξυγόνου, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες (99). Αυτά τα αυτοαντισώματα επίσης μπορούν να διεγείρουν τον sFlt-1 και επομένως να οδηγήσουν σε μια αντι-αγγειογενετική κατάσταση (100).

2.3.8 Συμμετοχή του συστήματος ανοσίας στην προεκλαμψία

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από ισχυρή ανοσολογική παρουσία στη διασύνδεση μητέρας – εμβρύου στην οποία κυριαρχούν κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας (101). Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης, το 70% των λευκοκυττάρων του φθαρτού είναι κύτταρα φυσικοί φονείς, 20-25% είναι μακροφάγα και 1.7% είναι δενδριτικά κύτταρα. Από το σύστημα της ειδικής ανοσίας απουσιάζουν τα Β κύτταρα αλλά τα Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν το 1-3% των ανοσοκυττάρων του φθαρτού. Η παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος

είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και τη δημιουργία ενός κατάλληλου περιβάλλοντος στο ενδομήτριο για επιτυχή εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου (102, 103).

Η εμφύτευση του εμβρύου αποτελείται από τρεις διαδοχικές φάσεις, την απόθεση, την προσκόλληση και την διείσδυση και σε κάθε ένα από αυτά τη βήματα η τροφοβλάστη αντιμετωπίζει διαφορετικού τύπου ανοσοκύτταρα και διαφορετικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος. Επομένως, η ορθή επικοινωνία ανάμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας και την τροφοβλάστη είναι κρίσιμη και αλλαγές σε αυτή την επικοινωνία μπορεί να έχουν επιπλοκές στην εγκυμοσύνη. Επιπλέον, ενδομήτριες λοιμώξεις έχουν συσχετισθεί με περιπτώσεις πρόωρου τοκετού, ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης και προεκλαμψίας (102).

Η ενεργοποίηση της απόκρισης του συστήματος φυσικής ανοσίας που παρατηρείται στη φυσιολογική εγκυμοσύνη εντείνεται στην προεκλαμψία (58, 104). Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα είναι παρόντα στην εμβρυική και πλακουντιακή κυκλοφορία σε υποξικές συνθήκες και μπορούν να συμβάλλουν στην αυξημένη αντίσταση των αγγείων και τη νοσηρότητα του εμβρύου που παρατηρείται στην προεκλαμψία (105). Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο αίμα μητέρων με προεκλαμψία (106). Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι κάποια χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας, όπως η υπέρταση και το οξειδωτικό στρες στον πλακούντα, μπορεί να προκαλούνται από μεσολάβηση του TNF, της IL-6 ή της IL-17 (107, 108). Η μη φυσιολογική έκφραση των κυτταροκινών σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην εκτεταμένη φλεγμονώδη απόκριση και στη γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρούνται στην προεκλαμψία (109). Σημαντική θεωρείται και η απελευθέρωση μικρο- και νανο- σωματιδίων από τη συγκυτιοτροφοβλάστη στη μητρική κυκλοφορία, που μαζί με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες που παράγονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες δημιουργούν ενδοαγγειακή φλεγμονή (72, 79). Επίσης, έχει προταθεί ότι η ελαττωματική πλακουντιοποίηση μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα συνδυασμών ανοσολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τόσο το φθαυτό όσο και την τροφοβλάστη. Πράγματι, η εμφύτευση επιφέρει συνθήκες στις οποίες τα εμβρυικά κύτταρα (τα οποία φέρουν

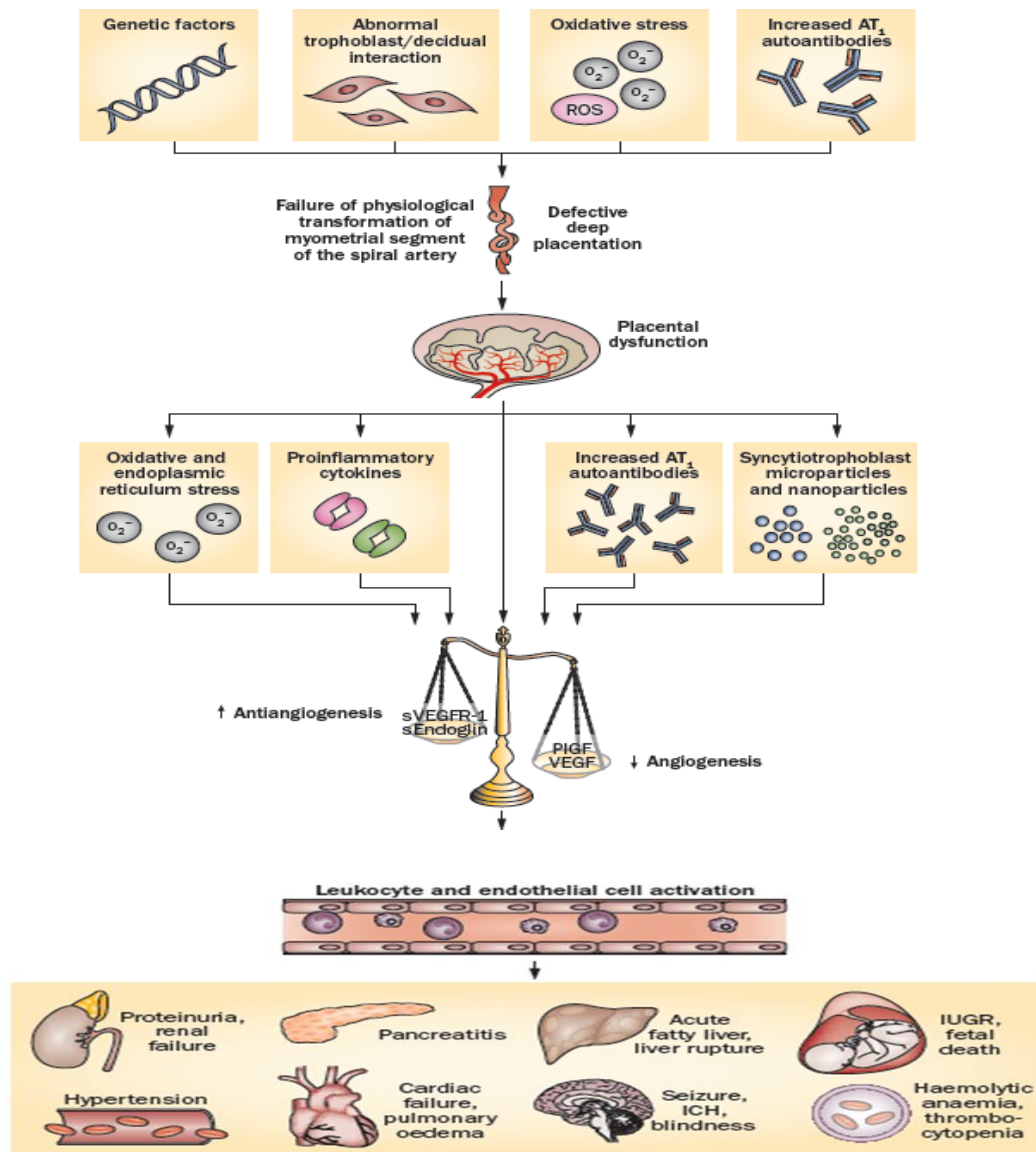
πατρικά αντιγόνα) έρχονται σε επαφή με τα μητρικά κύτταρα στο φθαρτό και είναι κρίσιμο το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας να μην απορρίψει την τροφοβλάστη. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς στο φθαρτό, τα μόρια HLA-C στην εμβρυική τροφοβλάστη και τα ρυθμιστικά T κύτταρα έχουν εμπλακεί στην κατάσταση ανοχής που σχετίζεται με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, καθώς επίσης και με την προεκλαμψία (55).

2.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Μια ποικιλία μοριακών παραγόντων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας (110). Η πολυπαραγοντική και ετερογενής φύση της νόσου απαιτεί στη χρήση συνδυασμού βιοχημικών και βιοφυσικών δεικτών για την -όσο είναι δυνατόν- έγκαιρη πρόβλεψη της (54). Κανένας βιοδείκτης μέχρι τώρα δεν έχει από μόνος του επαρκή προγνωστική αξία για την προεκλαμψία, προκειμένου να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων βιοδεικτών, καθένας από τους οποίους αντιπροσωπεύει μια διαφορετική παθοφυσιολογική διαδικασία, θα μπορούσε δυνητικά να αυξήσει την πιθανότητα δημιουργίας κατάλληλων προγνωστικών αλγορίθμων (50). Οι ερευνητές συνεχίζουν να βρίσκονται προς αναζήτηση ενός συνδυασμού βιοδεικτών που να δίνει καλύτερη πρόβλεψη για την εκδήλωση της νόσου, από το Doppler των μητριάων αρτηριών, είτε συσχετιζόμενος με αυτό να διατηρήσει την υψηλή ευαισθησία και να βελτιώσει την ειδικότητα (111). Παρακάτω παρουσιάζονται διάφοροι υποψήφιοι βιοδείκτες για την προεκλαμψία από τη διεθνή βιβλιογραφία.

2.4.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση

Όπως προαναφέρθηκε, στην προεκλαμψία, παρατηρείται μια ανισορροπία ανάμεσα στους αγγειογενετικούς (VEGF και PlGF) και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες (sFlt1 και sEng). Οι παράγοντες αυτοί σε συνδυασμό με βιοφυσικούς δείκτες όπως το Doppler μητριάων αρτηριών και τη μέση αρτηριακή πίεση έχουν αναλυθεί για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας (54). Ο ρόλος και ο πιθανός μηχανισμός δράσης τους περιγράφεται παραπάνω (βλ. σελ. 29).



Εικόνα 11. Προτεινόμενο μοντέλο της πολύπλοκης παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας. Γενετικοί (συμπεριλαμβανομένης της ασυμβατότητας μητρικού-εμβρυικού γονοτύπου) και περιβαλλοντικοί (έκθεση στα πατρικά αντιγόνα πριν τη σύλληψη) παράγοντες διαταράσσουν την ανοσορύθμιση που επάγεται φυσιολογικά στην κύηση, οδηγώντας στην παθολογία τροφωβλάστης και φθαρτού, την επιφανειακή εισβολή στο ενδομήτριο και την αποτυχία της φυσιολογικής μεταμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Ο βαθμός της ισχαιμίας της μήτρας καθορίζεται από τη σοβαρότητα της αποτυχίας της πλακουντοποίησης και τις απαιτήσεις του εμβρύου για παροχή αίματος. Οι μαιευτικές διαταραχές προκύπτουν όταν αυτοί οι δύο παράγοντες είναι ασύμφωνοι. Η χρονικότητα και η έκταση της ασυμφωνίας προσδιορίζουν την κλινική εκδήλωση (θάνατος του εμβρύου, προεκλαμψία με IUGR, IUGR μόνο και όψιμη προεκλαμψία). Η προεκλαμψία προκύπτει σαν αποτέλεσμα προσαρμοστικών απαντήσεων που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, αντι-AT₁ αντισώματα, αγγειογενετικούς και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες και σωματίδια προερχόμενα από τη συγκυτιοτροφοβλάστη στη μητρική κυκλοφορία. Συνολικά, αυτοί οι παράγοντες διεγείρουν την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, την ενδοαγγειακή φλεγμονή και τη δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι συνέπειες αυτών των διαδικασιών στα διάφορα όργανα, οδηγούν στα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας (8).

Ενώ στη φυσιολογική εγκυμοσύνη τα επίπεδα του sFlt-1 είναι σχετικά χαμηλά, υπό υποξικές συνθήκες ο πλακούντας απελευθερώνει sFlt-1 και sEng (112). Τα επίπεδα του sFlt-1 είναι υψηλότερα στην πρώιμη προεκλαμψία σε σχέση με την όψιμη, καθιστώντας το μόριο αυτό, πιθανό βιοδείκτη για την εμφάνιση προεκλαμψίας πριν τις 34 εβδομάδες (113). Η πλακουντιακή έκφραση και τα επίπεδα στον ορό του sFlt-1 σε προεκλαμπτικές γυναίκες είναι αυξημένα συγκριτικά με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, ενώ τα επίπεδα του PIGF είναι χαμηλά λόγω της πρόσδεσης στον sFlt-1. Αναλογία sFlt-1/PIGF ≥ 85 στο πλάσμα σχετίζεται με δυσμενή έκβαση και τοκετό μέσα σε δύο εβδομάδες παρουσίας (114). Ο συνδυασμός της αναλογίας sFlt-1/PIGF δευτέρου και τρίτου τριμήνου δίνει ένα ποσοστό ανίχνευσης 87,5% για την έγκαιρη πρόβλεψη της προεκλαμψίας σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (με πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων 10%) (115). Τα επίπεδα στον ορό του sFlt-1 είναι άμεσα συνδεδεμένα με τη βαρύτητα της νόσου, επομένως το κλάσμα sFlt-1/PIGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της βαρύτητας της προεκλαμψίας και να παρέχει επιπλέον πολύτιμες πληροφορίες για την αντιμετώπιση των ασθενών (116, 117). Όσον αφορά στη sEng, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδά της στην κυκλοφορία αυξάνονται σημαντικά 2-3 μήνες πριν την εμφάνιση προεκλαμψίας μαζί με αύξηση της αναλογίας sFlt-1/PIGF (95). Πρόσφατα, οι Sachan et al. επισήμαναν ότι τα μέσα επίπεδα sEng ήταν σχεδόν 7 φορές υψηλότερα σε σοβαρή προεκλαμψία αναφορικά με την ομάδα ελέγχου, προτείνοντας τη sEng ως ένα αποτελεσματικό πιθανό προγνωστικό δείκτη για την προεκλαμψία (118).

Ένας άλλος αντι-αγγειογενετικός παράγοντας είναι η ενδοστατίνη, η οποία *in vitro* εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, ενώ επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. *In vivo*, τα ίδια τα τροφοβλαστικά κύτταρα προκειμένου να καταστείλουν τη διείσδυσή τους, παράγουν πρωτεάσες που απελευθερώνουν τοπικά ενδοστατίνη από το φθαρό. Γυναίκες με ακόλουθη πρώιμη προεκλαμψία εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ενδοστατίνης από το πρώτο τρίμηνο, ωστόσο η ενδοστατίνη έχει φτωχή προγνωστική αξία για κλινική χρήση. Είναι απαραίτητες μεγαλύτερες έρευνες που θα αναλύουν το ρόλο της ενδοστατίνης σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες στην πρόβλεψη της προεκλαμψίας (119).

Πρωτεΐνες με αγγειογενετική δραστικότητα έχουν επίσης συσχετισθεί με την προεκλαμψία. Η αγγειοποιητίνη-1 και -2 εμπλέκονται στην εμφύτευση και την

πλακουντιακή αγγειογένεση και έχει προταθεί ότι τα επίπεδά τους στο πλάσμα διαφοροποιούνται πριν την εμφάνιση προεκλαμψίας (46).

2.4.2 Κορίνη

Το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP) είναι μια καρδιακή πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και της ομοιόστασης του νατρίου (120, 121). Η κορίνη είναι μία διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης και μετατρέπει το πρόδρομο ANP σε ενεργό ANP. Τόσο η κορίνη όσο και το ANP θεωρούνται βιοδείκτες για καρδιοαγγειακές παθήσεις και διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει αυξημένα επίπεδα ANP σε προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες (122). Έχει βρεθεί ότι η κορίνη προωθεί τη διείσδυση τροφοβλάστης και την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών και τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της κορίνης στη μήτρα είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με προεκλαμψία συγκριτικά με γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη (123). Πλέον η κορίνη θεωρείται από πολλούς ένας πιθανός χρήσιμος βιοδείκτης για την προεκλαμψία (122, 124).

2.4.3 Ελεύθερο Εμβρυικό DNA

Η αρχική πηγή του ελευθέρου εμβρυικού DNA (cell-free fetal DNA – cffDNA) θεωρείται η απόπτωση των κυττάρων του πλακούντα ως αποτέλεσμα της φυσιολογικής ανανέωσης των κυττάρων. Η αυξημένη ποσότητα cffDNA που παρατηρείται ανάμεσα στις γυναίκες που αναπτύσσουν προεκλαμψία μπορεί έμμεσα να παρέχει πληροφορίες για τις συνθήκες που επικρατούν στον πλακούντα. Τα επίπεδα cffDNA αυξάνονται πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων και μπορεί να οφείλονται σε υποξία και οξειδωτικό στρες που οδηγούν σε αυξημένη απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων του πλακούντα, αντανακλώντας την ανεπάρκεια του πλακούντα γυναικών που εμφανίζουν προεκλαμψία σε πρώιμη ηλικία κύησης. Επομένως, το cffDNA συνιστά έναν υποσχόμενο δείκτη πρόβλεψης προεκλαμψίας και ειδικά της πρώιμης (125).

2.4.4 Εμβρυική αιμοσφαιρίνη

Η εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF έχει προταθεί σαν ένας νέος προγνωστικός βιοδείκτης για την προεκλαμψία και ως υποψήφιος αιτιολογικός παράγοντας (50). Έχει

διαπιστωθεί αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της HbF και συσσώρευση εξωκυττάριας HbF στον αυλό των αγγείων σε πλακούντες με προεκλαμψία (126). Υπό υποξικές συνθήκες στον πλακούντα, η έκφραση των γονιδίων και των πρωτεϊνών HbF αυξάνεται και προκαλεί το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου, οξειδωτικής καταστροφής και διάσπασης του εμβρυομητρικού φραγμού, καταλήγοντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, υπέρταση και πρωτεϊνουρία, τα οποία είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της προεκλαμψίας (127). Οι Anderson et al. έχουν βρει σημαντικά αυξημένα επίπεδα της HbF σε γυναίκες με προεκλαμψία και την έχουν προτείνει σαν προγνωστικό βιοχημικό δείκτη πρώτου και δευτέρου τριμήνου (128-130).

2.4.5 PAPP-A

Η αύξηση του πλακούντα και του εμβρύου προωθούνται από την παρουσία της PAPP-A στον πλακούντα, η οποία είναι μία πρωτεάση της IGFBP4 (insulin-like growth factor binding protein 4) και παράγεται από τα αναπτυσσόμενα τροφοβλαστικά κύτταρα (131). Με την πρωτεολυτική της δράση η PAPP-A ρυθμίζει θετικά τη βιοδιαθεσιμότητα των insulin-like growth factors (131), των οποίων η διαφοροποιημένη δραστηριότητα νωρίς στην εγκυμοσύνη έχει συσχετισθεί με απώλεια της κύησης, υπέρταση, προεκλαμψία, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό και θάνατο του εμβρύου (132). Χαμηλά επίπεδα PAPP-A στον ορό σχετίζονται με την εμφάνιση προεκλαμψίας, αντανακλώντας πιθανώς βλάβη στην πλακουντιοποίηση (133). Τα επίπεδα της PAPP-A στο πρώτο τρίμηνο μαζί με αυτά των fhCGβ, AFP, PIGF, και sTNFR1 και σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά της μητέρας είναι προγνωστικά της ανάπτυξης πρώιμης προεκλαμψίας (132).

2.4.6 Βασοπρεσσίνη – Copeptin

Η προεκλαμψία διακρίνεται από μία χαμηλή σε ρεΐνη υπερτασική κατάσταση σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη. Καθώς άλλες ανάλογες υπερτασικές διαταραχές εκτός εγκυμοσύνης συχνά παρουσιάζουν και κάποιες φορές εξαρτώνται από την έκκριση αυξημένων επιπέδων βασοπρεσσίνης (arginine vasopressin - AVP), προέκυψε η υπόθεση πιθανής χρήσης των μετρήσεων της AVP στο πλάσμα για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας (133). Η AVP έχει μικρό χρόνο ημιζωής (5-20 min στην κυκλοφορία),

γεγονός που δυσχεραίνει την εκτίμηση της έκκρισής της με απευθείας μέτρηση της ορμόνης. Η *coreptin* είναι το αδρανές καρβοξυτελικό άκρο της πρόδρομης πρωτεΐνης από την οποία προκύπτει η AVP. Η *coreptin* βρίσκεται σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με την AVP και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από αυτή, πράγμα που την καθιστά ένα χρήσιμο βιοδείκτη για την έκκριση της AVP (133, 134). Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αύξηση της *coreptin* στην κυκλοφορία στο δεύτερο τρίμηνο και στις αρχές του τρίτου (135), αλλά και κατά τον τοκετό σε προεκλαμπτικές γυναίκες (136). Υπερέκκριση της AVP παρατηρήθηκε και στις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης σε γυναίκες που τελικώς εμφάνισαν προεκλαμψία και η *coreptin* βρέθηκε σημαντικά προγνωστική για την προεκλαμψία από την έκτη εβδομάδα της εγκυμοσύνης (133).

2.4.7 PP-13

Η PP-13 (γαλεκτίνη 13) είναι μέλος της υπεροικογένειας των γαλεκτινών στη συγκυτιοτροφοβλάστη (137). Ο ρόλος της στην ανάπτυξη του πλακούντα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως αλλά αρκετές μελέτες αναφέρουν τη συμμετοχή της στη διείσδυση τροφοβλάστης και πιθανώς στην αναδιαμόρφωση των μητρικών σπειροειδών αρτηριών μέσω της επαγωγής της απελευθέρωσης προστακυκλίνης (138). Η PP-13 στον ορό φτάνει σε διπλάσιες και τριπλάσιες τιμές πριν τον τοκετό στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (139). Έχει βρεθεί ότι από τις 5-7 εβδομάδες κύησης, τα επίπεδα της PP-13 στον ορό είναι σημαντικά χαμηλότερα σε γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία (140, 141). Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι και τα επίπεδα του mRNA της PP-13 είναι μειωμένα, ειδικά στην πρώιμη προεκλαμψία (142). Μία πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι τα μειωμένα επίπεδα της PP-13 από το πρώτο κιόλας τρίμηνο αντιπροσωπεύουν ένα παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη προεκλαμψίας και μπορεί να αποτελέσουν πρώιμο δείκτη για την εμφάνιση υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου (138).

2.4.8 Κυστατίνη C

Η κυστατίνη C είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης που χρησιμοποιείται ευρέως από τους κλινικούς σαν ένας ευαίσθητος δείκτης της λειτουργίας των νεφρών και για την εκτίμηση του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης (143). Η πλακουντιακή έκφραση της

κυστατίνης C αυξάνεται στην προεκλαμψία τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας αυξημένη σύνθεση και έκφραση του μορίου της κυστατίνης C, η οποία με τη σειρά της δικαιολογεί και τα αυξημένα επίπεδα της στο πλάσμα γυναικών με προεκλαμψία (144). Η κυστατίνη C έχει προταθεί ως ένας αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης πρώτου τριμήνου για την προεκλαμψία (145-147).

2.4.9 miRNAs

Τα miRNAs είναι μη κωδικοποιούντα για πρωτεΐνες RNAs που ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση των γονιδίων και η απορύθμιση της έκφρασης τους σχετίζεται με διάφορες ασθένειες αλλά και με δυσμενείς επιπλοκές στην εγκυμοσύνη όπως οι αυτόματες αποβολές (148). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα miRNAs μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας, χρησιμεύοντας παράλληλα και σαν πιθανοί βιοδείκτες για τη νόσο (149). Γενικά στον υγιή πλακούντα έχουν ταυτοποιηθεί πολλά miRNAs και αλλαγές στην έκφραση αυτών σε περιπτώσεις πλακουντιακής ανεπάρκειας υποδηλώνουν ένα πιθανό ρόλο για τη σηματοδότηση μέσω miRNA στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (50). Αρκετά miRNAs όπως τα miR-210, miR-155, miR-196, miR-195, miR-26 και miR-181a, έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στην προεκλαμψία ενώ σε άλλα όπως τα miR-144 και miR-223 παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση. Επιπλέον, έχουν παρουσιαστεί και αντικρουόμενα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη ρύθμιση άλλων miRNAs στην προεκλαμψία. Η διαφορετικότητα στην έκφραση των miRNAs φαίνεται επίσης να σχετίζεται με τη σοβαρότητα και την χρονική έναρξη της νόσου. Από τα 120 miRNAs που έχουν αναφερθεί σε μέχρι τώρα μελέτες να εμπλέκονται στην προεκλαμψία, το miR-210 είναι αυτό που δείχνει να έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική πλακουντιοποίηση και να αποτελεί ένα πολύ πιθανό βιοδείκτη για την προεκλαμψία (150). Το miR-210 αυξάνεται σε υποξικές συνθήκες και έχει συσχετισθεί με γεγονότα που αποτελούν αναπόσπαστα παθογενετικά στάδια της προεκλαμψίας όπως την απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην υποξία, τη δημιουργία τριχοειδών δομών, την καθοδηγούμενη από το VEGF μετανάστευση των κυττάρων, την κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση (151).

Τα miRNAs είναι ένας υποσχόμενος προγνωστικός δείκτης αλλά είναι η αξιοσημείωτη η αντιφατική φύση των προφίλ έκφρασής τους από τις διάφορες

ερευνητικές ομάδες. Υπάρχουν διαφορετικές μεταβλητές που χρειάζονται προσοχή για την τυποποίηση της μεθοδολογίας για τη μελέτη της έκφρασης των miRNAs και τη συσχέτισή τους με την προεκλαμψία (152).

2.4.10 Γενετικοί Δείκτες

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η προεκλαμψία είναι μια νόσος με ισχυρή οικογενειακή προδιάθεση, η οποία ποικίλει σύμφωνα με γεωγραφικά και φυλετικά χαρακτηριστικά. Φαίνεται να υπάρχει μία γενετική συσχέτιση με μία πολυπαραγοντική πολυγονιδιακή κληρονομικότητα στην ανάπτυξη αυτής της ασθένειας (66). Σε μελέτες διδύμων, οι εκτιμήσεις της κληρονομησιμότητας της προεκλαμψίας παρουσιάζουν ένα εύρος από 22-47% (153). Πολλά γονίδια και πολυμορφισμοί έχουν εξετασθεί σε ότι αφορά τη σχέση τους με την προεκλαμψία και οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία πρόβλεψης εμφάνισης της νόσου (66). Υποψήφια γονίδια από ποικίλα βιολογικά μονοπάτια όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, ο έλεγχος της αγγειακής αντίστασης, η πήξη του αίματος, καθώς και διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και τις μεταβολικές διαδικασίες, έχουν υπάρξει αντικείμενο μελέτης πολλών εργασιών γενετικής συσχέτισης (50).

Μπορεί κάποιοι πολυμορφισμοί να σχετίζονται με την προεκλαμψία, όμως δε σημαίνει ότι αυτό ισχύει για όλους τους πληθυσμούς (154). Για παράδειγμα, μία παραλλαγή του *MTHFR* είναι παρούσα σε προεκλαμπτικές γυναίκες στην Ιαπωνία και την Ιταλία αλλά όχι σε δύο πληθυσμούς των Ηνωμένων Πολιτειών όπου μελετήθηκε (155).

Γενετικοί πολυμορφισμοί των κυτταροκινών έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί δείκτες επιρρέπειας στην προεκλαμψία, ο C590T της IL-4, ο G1108A στο γονίδιο της IL-10, ο A874G της ιντερφερόνης γ και ο G308A του TNF- α (156).

Ο πολυμορφισμός G1377A στο γονίδιο του υποδοχέα Fas φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου (157) και ο γονότυπος Fas-1377AA εντοπίστηκε με στατιστικά σημαντική διαφορά σε ασθενείς με προεκλαμψία. Ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να κατέχει αιτιολογικό ρόλο στη δημιουργία προεκλαμψίας και περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να επιβεβαιώσει το ρόλο αυτό (158).

Το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης συμβάλλει στη διείσδυση τροφοβλάστης και τη μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το σύστημα έχει το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης και με βάση μία μελέτη όπου ελέγχθηκε ο γονότυπος 106 γυναικών με προεκλαμψία, ο πολυμορφισμός του γονιδίου *ACE I/D* σε γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας επηρεάζει τη μητροπλακουντιακή και ομφάλια ροή αίματος και την επανεμφάνιση προεκλαμψίας (159).

Έχουν βρεθεί στοιχεία γενετικής συσχέτισης με την προεκλαμψία για τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αμινοπεπτιδάσες του ενδοπλασματικού δικτύου 1 και 2 (*ERAP1* και 2). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος μέσω του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης μαζί με το σύστημα φυσικής ανοσίας. Το προϊόν του γονιδίου *ERAP1* κόβει τους υποδοχείς για τις ιντερλευκίνες 1 και 6 και τον TNF-α στην επιφάνεια των κυττάρων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη σηματοδότησή τους και έχοντας με αυτό τον τρόπο προφλεγμονώδεις επιδράσεις (160).

Το γονίδιο του υποδοχέα τύπου 2 της ακτιβίνης *ACVR2A* στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2q22) έχει συσχετισθεί με την επιρρέπεια στην προεκλαμψία. Το γονίδιο *ACVR2A* μπορεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα της ακτιβίνης A, η οποία εμπλέκεται στη διείσδυση της τροφοβλάστης στο φθαρτό και στις σπειροειδείς αρτηρίες καθώς επίσης και στην αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών (161).

Ο πολυμορφισμός Tyr113His στο εξώνιο 3 του *EPHX* (γονίδιο της μικροσωματικής εποξικής υδρολάσης) σχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου και έχει βρεθεί ότι μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ενδογενών ή εξωγενών ενώσεων, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει σε αυξημένη επιρρέπεια στην προεκλαμψία (162).

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η ορμονική αναπροσαρμογή οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου της λεπτίνης. Γυναίκες με προεκλαμψία εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης στον ορό από τις υγιείς εγκυμονούσες. Τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης σχετίζονται με την πίεση του αίματος (163). Ο υποδοχέας της λεπτίνης ανήκει στην υπεροικογένεια των υποδοχέων κυτταροκινών και το γονίδιο του (*LEPR*) μεταγράφεται στις λάχνες και την τροφοβλάστη. Τα επίπεδα του υποδοχέα στον ορό συσχετίζονται με τη συγκέντρωση της λεπτίνης στο περιφερικό αίμα (164).

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της λεπτίνης (165) αλλά και του υποδοχέα της (24) έχουν συνδεθεί με αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης προεκλαμψίας.

Τέλος, μελέτες υποψηφίων γονιδίων έχουν δείξει σημαντικές συσχετίσεις πολυμορφισμών και προεκλαμψίας για ακόμη κάποια γονίδια στο μητρικό γονιδίωμα. Στα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνονται η α1(I) και α2(IV) αλυσίδα του κολλαγόνου (COL1A1), η IL-1α (IL1A), η λυμφοτοξίνη α (LTA), ο παράγοντας von Willebrand (VWF), ο παράγοντας πήξης V (F5), η ομάδα των θρομβοφιλικών γονιδίων, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), ο αναστολέας πεπτιδάσης σερίνης 1 (SERPINE) (8, 50).

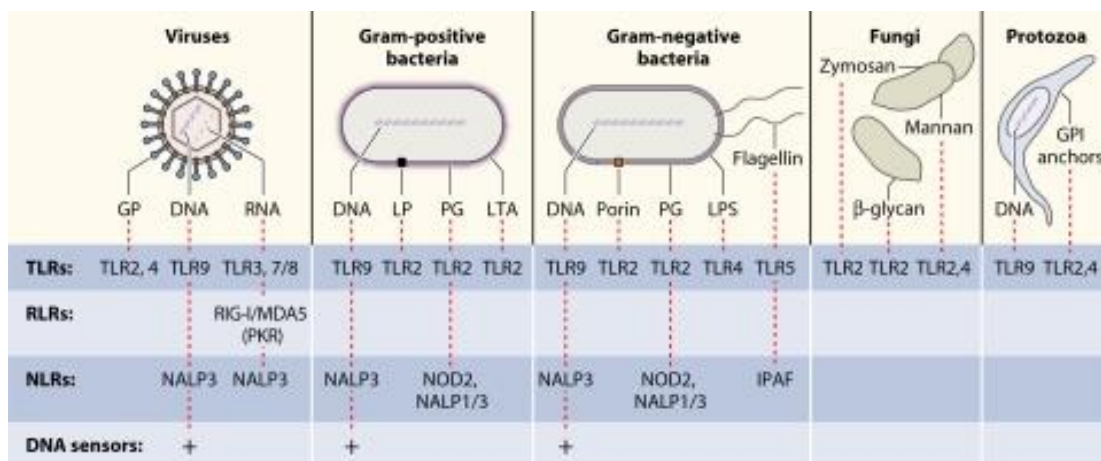
2.5 TOLL – LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Το γονίδιο *Toll* αρχικά ανακαλύφθηκε στη *Drosophila* με σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του ραχιαιοκοιλιακού άξονα κατά την εμβρυογένεση του εντόμου. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το *Toll* διαθέτει επίσης αντι-μυκητιασικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες στην ενήλικη μύγα (166). Στα θηλαστικά έχει ταυτοποιηθεί μια οικογένεια γονιδίων ομόλογων του *Toll*, τα οποία ονομάστηκαν υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors - TLRs) (167).

Οι TLRs αποτελούν μέρος του συστήματος φυσικής ανοσίας που παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι στα εισβάλλοντα παθογόνα. Αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν σε μία τάξη υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων (Pattern-Recognition Receptors - PRRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσω εξελικτικά συντηρημένων δομών που δεν υπάρχουν στον ξενιστή και είναι γνωστές ως «μοριακά πρότυπα παθογόνων μικροοργανισμών» (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) (168). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι PRRs αναγνωρίζουν και ενδογενή ιστικά σήματα κινδύνου (Danger Associated Molecular Patterns - DAMPs), όπως δραστικές ρίζες οξυγόνου, DNA, ATP, υαλουρονικό οξύ και ολιγοσακχαρίτες, ινωδογόνο, οξειδωμένη LDL και πρωτεΐνες θερμικού σοκ που προέρχονται από κύτταρα που βρίσκονται σε συνθήκες στρες ή έχουν υποστεί τραυματισμό (166, 169). Σύνδεση των TLRs με μικροβιακά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα μια φλεγμονώδη ανοσολογική απάντηση που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κυτταροκινών και αντιμικροβιακών παραγόντων (170).

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I που μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή αλλά και ετεροδιμερή και εκφράζονται σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και κυττάρων που δεν ανήκουν σε αυτό (168). Αποτελούνται από εξωκυττάρειες δομές που περιέχουν ποικίλους αριθμούς επαναλαμβανόμενων μοτίβων πλούσιων σε λευκίνη μέσω των οποίων αναγνωρίζονται τα παθογόνα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική σηματοδοτική επικράτεια ομόλογη με αυτή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (Toll/IL-1 receptor domain - TIR) (171). Η επικράτεια TIR είναι μια συντηρημένη αλληλουχία διακοσίων αμινοξέων (172) και είναι κρίσιμη στη σηματοδότηση μέσω των TLRs (168).

Πλέον γίνεται συζήτηση για μία αυξανόμενη οικογένεια δεκατριών TLRs στα θηλαστικά, δέκα από τους οποίους εκφράζονται στους ανθρώπους. Έχουν προσδιοριστεί όλοι οι συνδέτες για τους ανθρώπινους TLRs εκτός του TLR-10 (173). Κάθε υποδοχέας διαφέρει ως προς το συνδέτη που προσδένεται σε αυτόν. Έτσι ενώ, ξεχωριστά κάθε TLR απαντά σε περιορισμένους συνδέτες, συνολικά η οικογένεια των TLRs μπορεί να ανταποκριθεί σε ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που σχετίζονται με βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα (166).



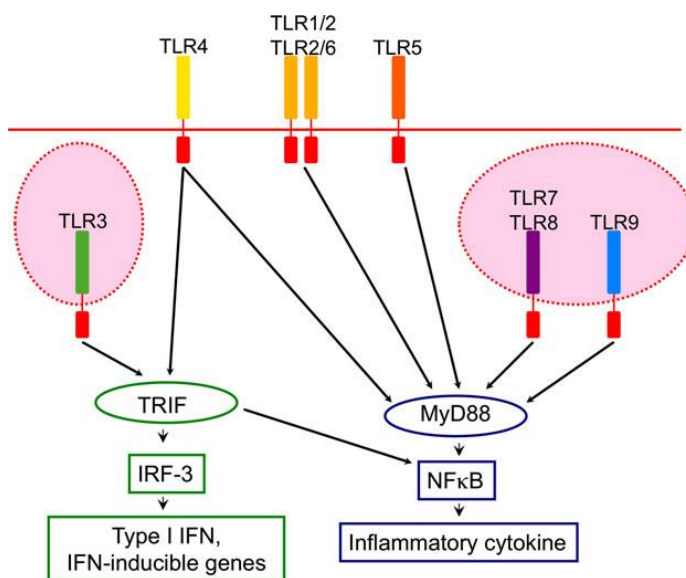
Εικόνα 12. Οι Toll-like υποδοχείς και οι συνδέτες τους. Χαρακτηριστικοί συνδέτες είναι τα νουκλεϊκά οξέα, όπως το DNA, το dsRNA, το ssRNA και το 5'-τριφωσφορικό RNA, καθώς και οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες-GP, λιποπρωτεΐνες-LP και τα συστατικά της μεμβράνης (πεπτιδογλυκάνη-PG, λιπoteichoϊκό οξύ-LTA, λιποσακχαρίτες LPS και άγκυρες GPI) (174).

Οι TLRs 1, 2, 4, 5, 6, και 10 βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και αναγνωρίζουν συστατικά της μεμβράνης των μικροβίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες. Οι TLRs 3, 7, 8, και 9 είναι παρόντες στο κυτταρόπλασμα, εντοπίζονται

αποκλειστικά σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα και τα ενδολυσοσώματα και διαδραματίζουν ρόλο κλειδί στην αναγνώριση κυττάρων μολυσμένων από ιό εντοπίζοντας ξένα νουκλεϊκά οξέα προκειμένου να πυροδοτήσουν την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (173, 175). Πιο συγκεκριμένα, ο TLR-3 αναγνωρίζει δίκλωνο RNA, οι TLR-7 και TLR-8 αναγνωρίζουν ιούς με μονόκλωνο RNA ενώ ο TLR-9 μεσολαβεί στις αποκρίσεις των κυττάρων στο βακτηριακό DNA μέσω αναγνώρισης ζευγαριών κυτοσίνης – γουανίνης και επιπλέον ενεργοποιείται από τον ιό του έρπητα (176).

Η πρόσδεση των συνδετών στους TLRs συχνά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών κι αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω ενός κοινού ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού. Με το που αναγνωρίζουν το μόριο συνδέτη, οι TLRs στρατολογούν την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη MyD88, που οδηγεί σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων κινασών, ο οποίος πυροδοτεί την ενεργοποίηση του NFκB μονοπατιού και τη δημιουργία φλεγμονώδους απόκρισης (177).

Οι TLR-3 και TLR-4 μπορούν επίσης να επάγουν σηματοδότηση μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από το MyD88, μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα TRIF, το οποίο όχι μόνο μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του NFκB, αλλά επίσης οδηγεί και στη φωσφορυλίωση του ρυθμιστικού παράγοντα 3 της ιντερφερόνης IRF-3. Αυτό το εναλλακτικό μονοπάτι δημιουργεί μία αντίική απάντηση που σχετίζεται με τη παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και γονίδια που επάγονται από ιντερφερόνες (178, 179)



Εικόνα 13. Μοριακή σηματοδότηση μέσω των TLRs (176).

2.5.1 Υποδοχέας TL-2 (TLR-2)

Από όλους τους TLRs που έχουν ταυτοποιηθεί, ο TLR-2 έχει την ευρύτερη ειδικότητα. Ο TLR-2 προσδένεται με λιποπρωτεΐνες Gram-θετικών, Gram-αρνητικών και μυκοβακτηρίων, με πεπτιδογλυκάνες Gram-θετικών βακτηρίων καθώς επίσης και με τη ζυμοσάνη των μυκήτων. Φαίνεται ότι η αναγνώριση ορισμένων μικροβιακών προϊόντων από τον TLR-2 υποδοχέα εξαρτάται από το σχηματισμό ετεροδιμερών είτε με τον TLR-1 είτε με τον TLR-6. Το σύμπλοκο TLR-2/TLR-1 αναγνωρίζει βακτηριακές τριακυλιωμένες πρωτεΐνες ενώ το ετεροδιμερές TLR-2/TLR-6 αναγνωρίζει διακυλιωμένες λιποπρωτεΐνες των μυκοβακτηρίων (166).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TLR-2 εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q32) (180). Ανάμεσα στους διάφορους πολυμορφισμούς του TLR-2, ο Arg753Gln (G2258A) είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος και έχει συσχετισθεί με ευαισθησία στη φυματίωση (181). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει ως αποτέλεσμα υποκατάσταση της αργινίνης σε γλουταμίνη στο κατάλοιπο 753, οδηγώντας σε εξασθενημένη απάντηση των μακροφάγων στα βακτηριακά πεπτίδια και κατ' επέκταση εξασθενημένη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (182). Ο πολυμορφισμός Arg677Trp του TLR-2 (C2029T) οδηγεί σε υπο-κατάσταση της αργινίνης σε τρυπτοφάνη στη θέση 677 και έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζει την ικανότητα του TLR-2 να μεσολαβεί στην απόκριση στα συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος (183).

2.5.2 Υποδοχέας TL-4 (TLR-4)

Ο TLR-4 εκφράζεται από πολλούς τύπους κυττάρων, κυρίως από τα κύτταρα που μετέχουν στη φυσική ανοσία όπως τα μακροφάγα, από τα κοκκιοκύτταρα και από τα δενδριτικά κύτταρα (184). Ο TLR-4 συμμετέχει στην αναγνώριση των λιποσακχαριτών, οι οποίοι αποτελούν βασικό συστατικό των Gram-αρνητικών βακτηρίων (185). Η αποτελεσματική ενεργοποίηση του TLR-4 από τους λιποσακχαρίτες απαιτεί την αλληλεπίδρασή τους με το CD14 και τη βοηθητική πρωτεΐνη MD-2. Ο TLR-4 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από άλλα είδη μορίων όπως το λιποτεχοϊκό οξύ των Gram-θετικών βακτηρίων, τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP60 και HSP70 και κυτταρικά θραύσματα φимπρονεκτίνης (176).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TLR-4 εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9q32–q33) (180). Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί για το ανθρώπινο γονίδιο του TLR-4, από τους οποίους οι Asp299Gly και Thr399Ile φαίνεται να έχουν λειτουργική σημασία και έχουν διερευνηθεί πιο εκτεταμένα σε μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly αντιστοιχεί σε μία μετάβαση από αδενίνη σε γουανίνη στο νουκλεοτίδιο 896 (A896G) οδηγώντας σε υποκατάσταση του ασπαρτικού οξέος από τη γλυκίνη στη θέση 299. Ο πολυμορφισμός Thr399Ile είναι μία μετάβαση από κυτοσίνη σε θυμίνη στο νουκλεοτίδιο 1196 (C1196T) που έχει ως αποτέλεσμα μια αμινοξική αλλαγή από θρεονίνη σε ισολευκίνη στη θέση 399 (14). Και οι δύο πολυμορφισμοί είναι λιγότερο δραστικοί από το φυσικού τύπου αλληλόμορφο. *In vitro* έλεγχοι έδειξαν μειωμένη δραστικότητα σε ποσοστό 5-10% για τον πολυμορφισμό Asp299Gly και 20-30% για τον Thr399Ile, συγκριτικά με το φυσικό τύπο (186). Οι δύο πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile φαίνεται να είναι συνδεδεμένοι και να συνκληρονομούνται στον πληθυσμό (187). Ειδικότερα, στους δυτικούς πληθυσμούς ο διπλά πολυμορφικός γονότυπος παρατηρείται σε ποσοστό 98%. Στοιχειομετρική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών έδειξε ότι καθένας από αυτούς οδηγεί σε ξεχωριστές δομικές αλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του υποδοχέα (188). Οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν συσχετισθεί με παθογενείς καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση (189) και η κολίτιδα (190). Ο πρόωρος τοκετός μπορεί να προκύψει ως συνέπεια ουρογεννητικής μόλυνσης, η οποία συχνά προκαλείται από Gram - αρνητικά βακτήρια. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό (186).

2.6 TOLL – LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ & ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας πρέπει να επιδείξει ανοχή στο αλλογενές κατά το ήμισυ έμβρυο, ενώ παράλληλα να υπερασπίζεται το σώμα έναντι στα παθογόνα. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν υποθέσει ότι μία ανεπαρκής ανοχή του εμβρύου από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να εκδηλωθεί ως προεκλαμψία. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλει στην αιτιολογία της προεκλαμψίας παραμένει απροσδιόριστος (191).

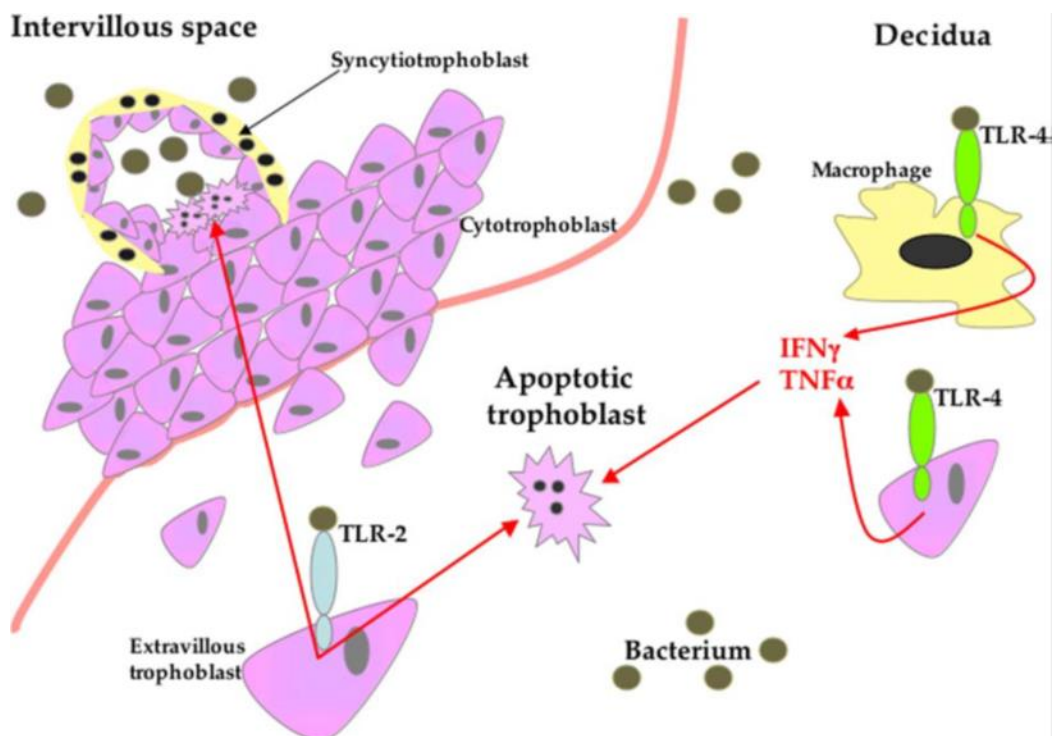
Το σύστημα φυσικής ανοσίας που εξαρτάται από τους TLRs έχει βασικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή, επομένως η ενεργοποίηση των TLRs στα τροφοβλαστικά κύτταρα επιδρά στη στρατολόγηση ανοσοκυττάρων, στην προφλεγμονώδη έκκριση κυτταροκινών και σε αποκρίσεις του φθαρτού στα εισβάλλοντα παθογόνα κατά την κύηση (173). Οι TLRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο κυτταρικό στρες κατά την εγκυμοσύνη λόγω πλακουντιοποίησης και τοκετού (192) και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η έκφραση τους ρυθμίζεται με ένα παροδικό και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (193). Η ενεργοποίησή τους από παράγοντες οι οποίοι συνδέονται με αυτούς, στα πλακουντιακά κύτταρα πρώτου και τρίτου τριμήνου επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και μετανάστευση των κυττάρων του συστήματος φυσικής ανοσίας (194). Παρόλο που τα κύτταρα του συστήματος φυσικής ανοσίας είναι απαραίτητα, όπως έχει αναφερθεί πιο πριν, για μία επιτυχή εμφύτευση και προστασία από μολύνσεις, τα ίδια αυτά κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν σε ορισμένες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένης και της προεκλαμψίας, η οποία χαρακτηρίζεται σαν μία κατάσταση συνεχούς φλεγμονής (102, 173).

Αλλαγές στην έκφραση των TLRs αποτελούν μία πιθανή σύνδεση μεταξύ του συστήματος φυσικής ανοσίας και της μη φυσιολογικής πλακουντιοποίησης στην προεκλαμψία (195). Αυξημένη έκφραση του mRNA του TLR-4 έχει αναφερθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα παθολογικών αγγείων του πλακούντα (196), καθώς επίσης έχει σημειωθεί και αυξημένη έκφραση του TLR-4 αλλά όχι του TLR-2 επίσης στα διάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα γυναικών με προεκλαμψία (195). Ωστόσο, αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Pineda et al., οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένη έκφραση στην τροφοβλάστη τόσο του TLR-4 όσο και του TLR-2 (197). Άλλοι TLRs που έχουν συσχετισθεί σε επίπεδο πρωτεϊνών με προεκλαμψία, είναι οι TLR-3, TLR-7 & TLR-8, των οποίων τα επίπεδα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε πλακούντες προεκλαμπτικών γυναικών κατά τον τοκετό (191).

Σε γυναίκες με προεκλαμψία η έντονη απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ που εκφράζονται υπό συνθήκες στρες όπως η ισχαιμία και η παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών, παρέχουν εύρος παραγόντων σύνδεσης, ικανών να οδηγήσουν σε πρόσδεση και ενεργοποίηση των TLRs, οδηγώντας

σε χρόνια φλεγμονή, η οποία θεωρείται από τους κύριους συντελεστές στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (30, 167, 198, 199). Επίσης και βακτηριακά συστατικά (λιποσακχαρίτες) που συνδέονται με τον TLR-2 και TLR-4 έχουν εμπλακεί στην αιτιολογία κάποιων μορφών προεκλαμψίας (191).

Δεδομένου ότι οι TLR-4 και TLR-2 εκφράζονται στα κύτταρα της τροφοβλάστης στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, επάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών και την απόπτωση αντίστοιχα, οι Abrahams et πρότειναν ότι ένα παθογόνο ή ενδογενές σήμα κινδύνου μπορεί μέσω του TLR-2 να επάγει αυξημένη απόπτωση στην τροφοβλάστη, μία κατάσταση που παρατηρείται σε διάφορες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, προτείνοντας ένα μηχανισμό παθογένεσης λόγω μόλυνσης και για την προεκλαμψία (166).



Εικόνα 14. Ένα μοντέλο για την επαγωγή της απόπτωσης της τροφοβλάστης σε εγκυμοσύνες που επιβαρύνονται από μολύνσεις. Η κυτταρική απόπτωση μπορεί να προκύπτει απευθείας από την ενεργοποίηση του TLR-2. Εναλλακτικά, η αυξημένη απόπτωση της τροφοβλάστης μπορεί να πυροδοτείται έμμεσα από την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών που παράγονται από τον TLR-4 που εκφράζεται στα ανοσιακά ή τροφοβλαστικά κύτταρα (166).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι σε ζωικά μοντέλα έχει δειχθεί ότι η συνεχής διέγερση μέσω TLR στα τροφοβλαστικά κύτταρα επάγει την παραγωγή μεσολαβητών φλεγμονής και ειδικά έκκριση του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα sFlt1 (200).

Γνωστές γενετικές διαφορές στους TLRs και/ή στους μεσολαβητές που ακολουθούν στο μονοπάτι μετά από αυτούς ίσως εξηγούν τη διαφορετικότητα ανάμεσα στην ανταπόκριση γυναικών στη μόλυνση και μπορεί να συμβάλλουν σε δυσμενείς εκβάσεις της εγκυμοσύνης (αποβολή, πρόωρος τοκετός, ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης, προεκλαμψία) (193, 201).

Οι van Rijn et al. πρώτοι το 2008 έδειξαν ότι η προδιάθεση της μητέρας για προεκλαμψία συνδέεται με παραλλαγές αλληλομόρφων γονιδίων που επηρεάζουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Οι ερευνητές συσχέτισαν τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *TLR-4*, Asp299Gly και Thr399Ile που επηρεάζουν το εξωκυττάριο πρότυπο αναγνώρισης του *TLR-4* και κατ' επέκταση τη φλεγμονώδη απόκριση στους λιποσακχαρίτες, με ιστορικό πρώιμης προεκλαμψίας και υπέθεσαν ότι γενετικά κωδικοποιούμενες ατομικές διαφορές στη φλεγμονώδη απόκριση μπορεί να επιδράσουν στην προδιάθεση στη διαταραχή (15). Από την άλλη πλευρά οι Molvarec et al. υπέθεσαν ότι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί μπορεί να σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο για προεκλαμψία όντας αλληλόμορφα του *TLR-4* με απώλεια λειτουργίας, την οποία δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν σε δείγμα πληθυσμού Καυκάσιων από την Ουγγαρία (16). Για τον πολυμορφισμό Arg753Gln του *TLR-2*, οι Fraser et al. δεν βρήκαν συσχέτιση με την παθογένεση της προεκλαμψίας οπότε δεν τον θεώρησαν σημαντικό δείκτη ανίχνευσης της νόσου (156). Οι Xie et al. βρήκαν αυξημένη έκφραση των *TLR-2* και *TLR-4* στα ουδετερόφιλα (202) και επιβεβαίωσαν την παρουσία των πολυμορφισμών Arg753Gln (*TLR-2*) και Asp299Gly και Thr399Ile (*TLR-4*) σε γυναίκες με πρώιμη αλλά όχι όψιμη προεκλαμψία (23).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του υποδοχέα *TLR-4* και Arg753Gln του υποδοχέα *TLR-2* έχουν συσχετιστεί και με τον πρόωρο τοκετό (193, 203), στον οποίο, όπως και στην προεκλαμψία, επίσης εμπλέκονται τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου και δημιουργίας φλεγμονής που ενεργοποιούν οι TLRs (204, 205).

2.7 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συγκριτική καταγραφή πολυμορφισμών αναγνωρισμένης κλινικής σημασίας των υποδοχέων TLR-2 (Arg753Gln, Arg677Trp) και TLR-4 (Asp299Gly, Thr399Ile) σε ομάδα γυναικών από την Κεντρική Ελλάδα με πρώιμη προεκλαμψία σε σχέση με ομάδα ελέγχου. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 84 γυναίκες που εμφάνισαν συστολική πίεση του αίματος ≥ 140 mmHg και/ή διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg και ποσότητα πρωτεΐνης > 300 mg σε ούρα εικοσιτετραώρου πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και 94 γυναίκες ανάλογου ηλικιακού εύρους με φυσιολογική εγκυμοσύνη ως ομάδα ελέγχου. Η στατιστική επεξεργασία των συχνοτήτων εμφάνισης των πολυμορφισμών TLR-4 μεταξύ των 2 ομάδων της μελέτης, αναμένεται να οδηγήσει σε αξιολογική σύνδεση μεταξύ πολυμορφισμών και ευαισθησίας εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας στην κεντρική Ελλάδα.

Κεφάλαιο 3 Κλινικό Μέρος

3.1 Συμμετέχουσες στη μελέτη

Οι συμμετέχουσες (N=176) στρατολογήθηκαν στο τριτοβάθμιο κέντρο αναφοράς της Κεντρικής Ελλάδος (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Θεσσαλίας). Κριτήρια επιλογής παθολογικών περιστατικών (N=84) ήταν ιστορικό πρώιμης προεκλαμψίας και τοκετός πριν τη 34^η εβδομάδα κύησης. Στην ομάδα ελέγχου (N=94) εντάχθηκαν γυναίκες αντίστοιχου ηλικιακού εύρους με αυτό της ομάδας πρώιμης προεκλαμψίας. Κλινικά δεδομένα και δείγμα ολικού αίματος για απομόνωση DNA συλλέχθηκαν από τις συμμετέχουσες κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ιατρικής Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Θεσσαλίας και ελήφθη γραπτή συναίνεση όλων των συμμετεχουσών στη μελέτη. Η πρόωρη προεκλαμψία ορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια της Διεθνούς Εταιρείας για τη Μελέτη της Υπέρτασης κατά την Κύηση για συμπτώματα προεκλαμψίας (206), που είναι: αυξημένη αρτηριακή πίεση (≥ 140 mmHg SBP ή ≥ 90 mmHg DBP σε δύο ή περισσότερες μετρήσεις με διαφορά 6 τουλάχιστον ωρών) πριν από 34 εβδομάδες κύησης σε γυναίκα με προηγούμενη κανονική αρτηριακή πίεση, συνοδευόμενη από πρωτεϊνουρία ($\geq 0,3$ g / 24 h). Η καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου διαγνώστηκε από το βάρος γέννησης του εμβρύου αν ήταν κάτω από το 10ο εκατοστημόριο για την ηλικία κύησης (207). Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν χρόνια υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, αυτοάνοση ασθένεια και νεφρική νόσος. Όλες οι συμμετέχουσες στη μελέτη ήταν Καυκάσιες, που κατοικούσαν στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας (Θεσσαλία). Τα κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχουσών στη μελέτη συνοψίζονται στους ακόλουθους Πίνακες 3.1α & 3.1β

Στον Πίνακα 3.1α καταχωρήθηκαν τα 94 φυσιολογικά περιστατικά (ομάδα ελέγχου) και στον Πίνακα 3.1β τα 84 περιστατικά πρώιμης προεκλαμψίας που μελετήθηκαν. Καταγράφηκαν μόνο τα απολύτως αντικειμενικά βιολογικά δεδομένα των συμμετεχουσών όπως: ο αριθμός γεννήσεων (ομάδας ελέγχου, Πιν. 3.1α & ομάδας πρώιμης προεκλαμψίας, Πιν. 3.1β), η ηλικία της μητέρας (σε έτη), το φύλο ή τα φύλα

του/των παιδιού/-ών σε περίπτωση δίδυμων, η εβδομάδα κύησης και το βάρος γέννησης ζωντανού ή νεκρού νεογνού (gr).

Πίνακας 3.1α: Ομάδα Ελέγχου

a/a	Ομάδα ελέγχου	Ηλικία (έτη)	φύλο	Εβδ.κύησης	Βάρος νεογνού (gr)
1	δευτεροτόκος	37	female	38w	3100
2	πρωτοτόκος	39	male	39w	3250
3	πρωτοτόκος	37	female	40w	4050
4	δευτεροτόκος	25	male	37w	3650
5	πρωτοτόκος	36	male	41w	4100
6	πρωτοτόκος	26	male	37w	3800
7	δευτεροτόκος	22	female	37w	3750
8	δευτεροτόκος	30	male	38w	3800
9	πρωτοτόκος	25	twins	40w	4000
10	τριτοτόκος	19	male	41w	3700
11	πρωτοτόκος	27	twins- female both	36w	2800, 2400
12	δευτεροτόκος	31	male	38w	3100
13	πρωτοτόκος	25	male	41w	3980
14	πρωτοτόκος	27	female	40w	4020
15	πρωτοτόκος	32	female	40w	3780
16	πρωτοτόκος	42	female	39w	3550
17	πρωτοτόκος	32	male	39w	3250
18	πρωτοτόκος	23	male	38w	3750
19	δευτεροτόκος	35	female	37w	3200
20	τριτοτόκος	40	female	37w	3850
21	πρωτοτόκος	30	male	41w	3300
22	πρωτοτόκος	37	female	40w	3100
23	πρωτοτόκος	34	male	39w	4180
24	πρωτοτόκος	35	female	38w	4060
25	πρωτοτόκος	27	twins- female- male	41w	2600 , 2200
26	πρωτοτόκος	40	male	40w	3050
27	πρωτοτόκος	32	female	39w	3700
28	τριτοτόκος	35	male	37w	3350
29	πρωτοτόκος	39	male	39w	3810
30	τριτοτόκος	35	female	37w	3130

31	πρωτοτόκος	28	female	38w	3550
32	πρωτοτόκος	19	female	39w	3530
33	πρωτοτόκος	36	male	40w	3900
34	πρωτοτόκος	33	male	41w	4100
35	πρωτοτόκος	37	male	38w	3460
36	πρωτοτόκος	40	female	38w	3540
37	πρωτοτόκος	39	male	39w	3540
38	πρωτοτόκος	28	male	37w	3980
39	πρωτοτόκος	28	female	41w	4150
40	πρωτοτόκος	27	twins-male both	40w	2540, 2130
41	πρωτοτόκος	37	female	40w	3980
42	τριτοτόκος	33	female	37w	3040
43	πρωτοτόκος	27	male	37w	3030
44	πρωτοτόκος	29	male	39w	3220
45	δευτεροτόκος	28	female	39w	3170
46	τριτοτόκος	36	male	40w	3340
47	πρωτοτόκος	34	female	39w	3080
48	δευτεροτόκος	37	female	38w	3100
49	πρωτοτόκος	39	male	39w	3250
50	πρωτοτόκος	37	female	40w	4050
51	δευτεροτόκος	25	male	37w	3650
52	πρωτοτόκος	36	male	41w	4100
53	πρωτοτόκος	26	male	37w	3800
54	δευτεροτόκος	22	female	37w	3750
55	δευτεροτόκος	30	male	38w	3800
56	πρωτοτόκος	25	twins	40w	4000
57	τριτοτόκος	19	male	41w	3700
58	πρωτοτόκος	27	twins- female both	36w	2800, 2400
59	δευτεροτόκος	31	male	38w	3100
60	πρωτοτόκος	25	male	41w	3980
61	πρωτοτόκος	27	female	40w	4020
62	πρωτοτόκος	32	female	40w	3780
63	πρωτοτόκος	42	female	39w	3550
64	πρωτοτόκος	32	male	39w	3250
65	πρωτοτόκος	23	male	38w	3750
66	δευτεροτόκος	35	female	37w	3200
67	τριτοτόκος	40	female	37w	3850

68	πρωτοτόκος	30	male	41w	3300
69	πρωτοτόκος	37	female	40w	3100
70	πρωτοτόκος	34	male	39w	4180
71	πρωτοτόκος	35	female	38w	4060
72	πρωτοτόκος	27	twins- female- male	41w	2600 , 2200
73	πρωτοτόκος	40	male	40w	3050
74	πρωτοτόκος	32	female	39w	3700
75	τριτοτόκος	35	male	37w	3350
76	πρωτοτόκος	39	male	39w	3810
77	τριτοτόκος	35	female	37w	3130
78	πρωτοτόκος	28	female	38w	3550
79	πρωτοτόκος	19	female	39w	3530
80	πρωτοτόκος	36	male	40w	3900
81	πρωτοτόκος	33	male	41w	4100
82	πρωτοτόκος	37	male	38w	3460
83	πρωτοτόκος	40	female	38w	3540
84	πρωτοτόκος	39	male	39w	3540
85	πρωτοτόκος	28	male	37w	3980
86	πρωτοτόκος	28	female	41w	4150
87	πρωτοτόκος	27	twins-male both	40w	2540, 2130
88	πρωτοτόκος	37	female	40w	3980
89	τριτοτόκος	33	female	37w	3040
90	πρωτοτόκος	27	male	37w	3030
91	πρωτοτόκος	29	male	39w	3220
92	δευτεροτόκος	28	female	39w	3170
93	τριτοτόκος	36	male	40w	3340
94	πρωτοτόκος	34	female	39w	3080

Πίνακας 3.1β: Ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας

a/a	πρώιμη προεκλαμψίας	Ηλικία (έτη)	φύλο	Εβδ.κύησης	Βάρος νεογνού (gr)
1	πρωτοτόκος	38	male	27w	750
2	πρωτοτόκος	39	twins-female both	32w	1650gr-1450
3	πρωτοτόκος	35	male	28w	750
4	πρωτοτόκος	22	male	32w	2315
5	πρωτοτόκος	37	female	35w	2600

6	πρωτοτόκος	24	twins-male both	33w	2115+1810
7	πρωτοτόκος	29	female	32w	1420
8	πρωτοτόκος	28	male	32w	1300
9	πρωτοτόκος	28	twins	23w	εμβρυικός θάνατος
10	πρωτοτόκος	18	male	34w	2360
11	πρωτοτόκος	29	male	31w	1340
12	πρωτοτόκος	32	male	31w	1215
13	πρωτοτόκος	26	male	33w	1890
14	πρωτοτόκος	25	female	30w	1130
15	δευτεροτόκος	34	female	33w	1540
16	πρωτοτόκος	41	twins-female-1 dead	27w	850, 850
17	τριτοτόκος	34	male	34w	2320
18	πρωτοτόκος	22	male	30w	1460
19	πρωτοτόκος	36	female	34w	1660
20	τριτοτόκος	41	male	28w	690
21	πρωτοτόκος	29	male	31w	1420
22	πρωτοτόκος	38	female	31w	1080
23	πρωτοτόκος	32	male	33w	1700
24	δευτεροτόκος	34	female	34w	2590
25	πρωτοτόκος	25	male	31w	2140
26	πρωτοτόκος	42	male	32w	1800
27	τριτοτόκος	30	male	32w	2400
28	τριτοτόκος	34	male	34w	2410
29	τριτοτόκος	38	male	34w	2390
30	τριτοτόκος	34	female	34w	1830
31	πρωτοτόκος	27	female	34w	2000
32	πρωτοτόκος	18	female	34w	2430
33	δευτεροτόκος	37	male	34w	2100
34	πρωτοτόκος	32	male	32w	1600
35	πρωτοτόκος	36	female	32w	1260
36	πρωτοτόκος	39	female	32w	1440
37	πρωτοτόκος	41	twins-female-male	32w	1630-1580
38	πρωτοτόκος	28	male	31w	890
39	πρωτοτόκος	29	male	34w	3260
40	πρωτοτόκος	26	male	29w	900
41	δευτεροτόκος	38	female	34w	1750
42	δευτεροτόκος	32	female-dead	27w	750
43	πρωτοτόκος	38	male	27w	750
44	πρωτοτόκος	39	twins-female both	32w	1650gr-1450

45	πρωτοτόκος	35	male	28w	750
46	πρωτοτόκος	22	male	32w	2315
47	πρωτοτόκος	37	female	35w	2600
48	πρωτοτόκος	24	twins-male both	33w	2115+1810
49	πρωτοτόκος	29	female	32w	1420
50	πρωτοτόκος	28	male	32w	1300
51	πρωτοτόκος	28	twins	23w	εμβρυικός θάνατος
52	πρωτοτόκος	18	male	34w	2360
53	πρωτοτόκος	29	male	31w	1340
54	πρωτοτόκος	32	male	31w	1215
55	πρωτοτόκος	26	male	33w	1890
56	πρωτοτόκος	25	female	30w	1130
57	δευτεροτόκος	34	female	33w	1540
58	πρωτοτόκος	41	twins-female-1 dead	27w	850, 850
59	τριτοτόκος	34	male	34w	2320
60	πρωτοτόκος	22	male	30w	1460
61	πρωτοτόκος	36	female	34w	1660
62	τριτοτόκος	41	male	28w	690
63	πρωτοτόκος	29	male	31w	1420
64	πρωτοτόκος	38	female	31w	1080
65	πρωτοτόκος	32	male	33w	1700
66	δευτεροτόκος	34	female	34w	2590
67	πρωτοτόκος	25	male	31w	2140
68	πρωτοτόκος	42	male	32w	1800
69	τριτοτόκος	30	male	32w	2400
70	τριτοτόκος	34	male	34w	2410
71	τριτοτόκος	38	male	34w	2390
72	τριτοτόκος	34	female	34w	1830
73	πρωτοτόκος	27	female	34w	2000
74	πρωτοτόκος	18	female	34w	2430
75	δευτεροτόκος	37	male	34w	2100
76	πρωτοτόκος	32	male	32w	1600
77	πρωτοτόκος	36	female	32w	1260
78	πρωτοτόκος	39	female	32w	1440
79	πρωτοτόκος	41	twins-female-male	32w	1630-1580
80	πρωτοτόκος	28	male	31w	890
81	πρωτοτόκος	29	male	34w	3260
82	πρωτοτόκος	26	male	29w	900
83	δευτεροτόκος	38	female	34w	1750

84	δευτεροτόκος	32	female-dead	27w	750
----	--------------	----	-------------	-----	-----

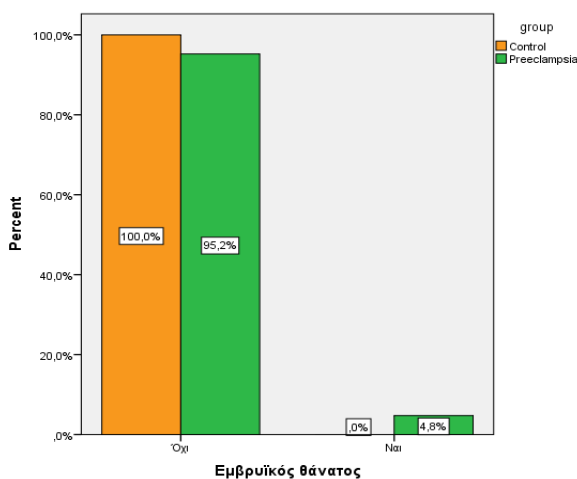
Ο Πίνακας 3.2 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχουσών στις δυο ομάδες μελέτης που αποτυπώνουν οι Πίνακες 3.1α & 3.1β

Πίνακας 3.2: Συγκριτική αξιολόγηση κλινικών χαρακτηριστικών φυσιολογικών (control) και παθολογικών (early-onset preeclampsia, EOP) περιστατικών

		Group				P Pearson's x ² test
		Control (N=94)		EOP (N=84)		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	68	72,3	62	73,8	0,826
	2ος	14	14,9	10	11,9	
	3ος	12	12,8	12	14,3	
Ηλικία (έτη), μέση τιμή (SD)		31,8 (5,8)		31,8 (6,3)		0,941 ⁺
Φύλο νεογνού	Αγόρι	48	51,1	48	57,1	0,661 [*]
	Κορίτσι	42	44,7	32	38,1	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	4	4,3	4	4,8	
Εμβρυϊκός θάνατος	Όχι	94	100,0	80	95,2	0,048[*]
	Ναι	0	0,0	4	4,8	
Δίδυμη κύηση	Όχι	86	91,5	74	88,1	0,453
	Ναι	8	8,5	10	11,9	
Εβδομάδα κύησης, διάμεσος (ενδ. εύρος)		39 (38 - 40)		32 (31 - 34)		<0,001^{**}
Πρόωρος τοκετός	Όχι	92	97,9	0	0,0	<0,001
	Ναι	2	2,1	84	100,0	
Βάρος γέννησης (gr), διάμεσος (ενδ. εύρος)		3550 (3170 - 3900)		1650 (1260 - 2140)		<0,001^{**}

^{*}Fisher's exact test ⁺Student's t-test ^{**}Mann-Whitney test

Συμφώνα με τον Πίνακα 3.2, οι γυναίκες με πρόωρη προεκλαμψία είχαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά εμβρυϊκού θανάτου ($p < 0,048$) (δες και Εικ. 3.1), πρόωρου τοκετού ($p < 0,001$) και μικρότερη διάρκεια εγκυμοσύνης, γέννησαν σε μικρότερη εβδομάδα κύησης ($p < 0,001$). Επίσης στην ομάδα πρόωρης προεκλαμψίας το βάρος των νεογνών ήταν σημαντικά μικρότερο συγκριτικά με το βάρος των νεογνών της ομάδας ελέγχου ($p < 0,001$).



Εικόνα 3.1: Ποσοστά εμβρυϊκού θανάτου στις δυο ομάδες μελέτης συμφώνα με τα στοιχεία του Πίνακα 3.2

Κεφάλαιο 4 Εργαστηριακό Μέρος

4.1 Υλικά: Χημικά Αντιδραστήρια, Χρωστικές Ουσίες, Όργανα – Συσκευές, Αναλώσιμα

Η λεπτομερής καταγραφή των υλικών και του εργαστηριακού εξοπλισμού της μελέτης περιγράφηκε αναλυτικά στις εκθέσεις προόδου της διατριβής

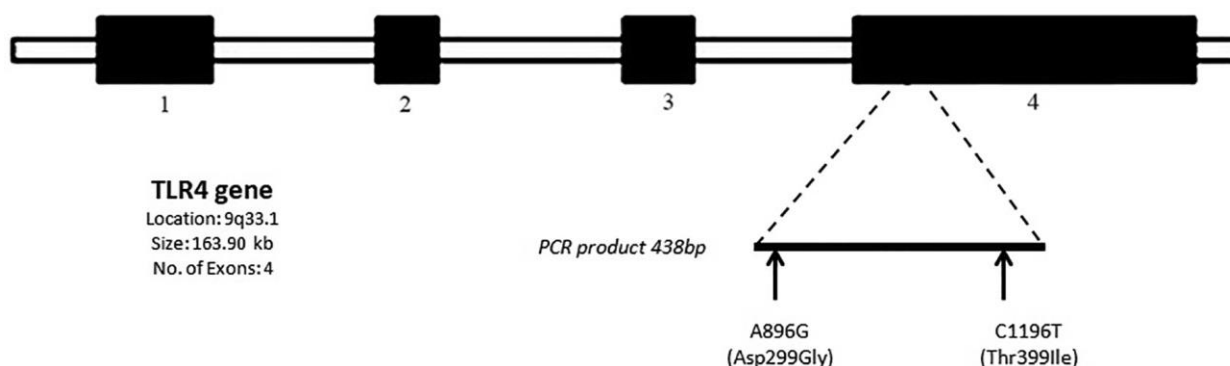
4.2 Μέθοδοι-Πρωτόκολλα: Απομόνωση DNA από ολικό αίμα (208-210), Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR (211, 212), Πρωτόκολλο PCR για TLR-2 με HOTSTART, Πρωτόκολλο PCR για TLR-4 με HOTSTART, Αλληλούχιση DNA κατά Sanger (213-216).

Η λεπτομερής περιγραφή των εργαστηριακών μεθόδων και πρωτοκόλλων της μελέτης μπορεί να αναζητηθεί στις καταχωρημένες εκθέσεις προόδου της διατριβής (208-216).

4.3 Διαδικασία Γονοτυπικής ανάλυσης πολυμορφισμών TLR-4 Επιγραμματικά

4.3.1 Απομόνωση DNA. Το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από 200 μί περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας το QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

4.3.2 PCR ενίσχυση. Γονιδιακό προϊόν PCR μήκους 438 bp, που περιέχει τους πολυμορφισμούς TLR4 Asp299Gly και Thr399Ile, βλέπε σχετικό διάγραμμα,



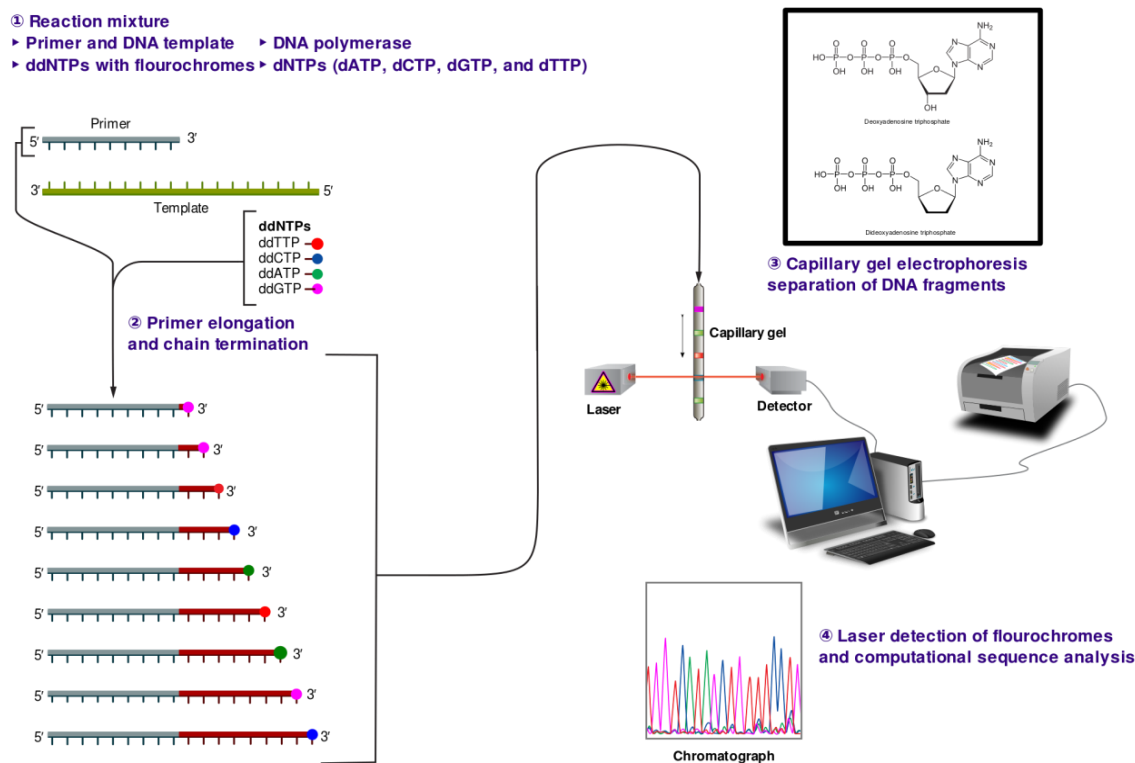
ενισχύθηκε από γονιδιωματικό DNA όπως περιγράφηκε προηγουμένως (212). Ειδικές αλληλουχίες ζευγών εκκινητών σχεδιάστηκαν με λογισμικό Primer 3 (www.justbio.com):

προς τα εμπρός 5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' και αντίστροφο 5'-TGAAACTCACTCATTTGTTTTCAA-3'. Τα μίγματα αντίδρασης PCR περιείχαν 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM από κάθε dNTP, 1,5 U Taq üNA πολυμεράση (In Vitrogen) και 15 pmol από κάθε εκκινητή. Τα προϊόντα ενίσχυσης που παράχθηκαν μετά από 35 κύκλους μετουσίωσης DNA στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, ξαναζευγαρώματος στους 55 °C για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα σε PTC-200 MJ Research Thermocycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA , ΗΠΑ).

4.3.3 Ανάλυση αλληλουχίας. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR διεξήχθη χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού PureLink PCR (Invitrogen). Η αυτοματοποιημένη αλληλουχία κύκλων πραγματοποιήθηκε με αμφοτέρους τους κλώνους σε έναν αναλυτή Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας το kit προσδιορισμού αλληλουχίας Cycle Sequencing BigDye Terminator (Applied Biosystems). Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίσθηκαν σε σχέση με τις αλληλουχίες ελέγχου από GenBank (αριθμός πρόσβασης GenBank: NM 138554), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Sequencer PC (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) και εξετάστηκαν για την παρουσία μεταλλαγών.

4.3.4 Αλληλούχιση περιοχής TLR-4 DNA με τη μέθοδο Sanger. Το προϊόν PCR των δειγμάτων της μελέτης μήκους 438bp του εξονίου 3 του γονιδίου *TLR-4* που επεκτάθηκε με το ζεύγος εκκινητών 5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' και 5'-TGAAACTCACTCATTTGTTTTCAA-3' σύμφωνα με μεθοδολογία και πρωτόκολλα που περιγράφηκαν διεξοδικά στις εκθέσεις προόδου, απεστάλη για αλληλούχιση (sequencing) σε εξωτερικό εργαστήριο (CeMIA SA), όπου ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA γίνεται με τη μέθοδο Sanger (213, 214) προκειμένου να ανιχνευθούν πολυμορφισμοί στα κλινικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας γίνεται σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης DNA ABI Prism 3700 Automated Sequencer (PE Biosystems) και προκύπτει απευθείας η παρουσία ή απουσία νουκλεοτιδικών μεταβολών στις αναμενόμενες θέσεις από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης. Το DNA αποδιατάσσεται και κάθε μονόκλωνη αλυσίδα λειτουργεί ως εκμαγείο και υποβάλλεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις πολυμερισμού. Σε κάθε

αντίδραση υπάρχουν ένα εκ των τεσσάρων τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων σε χαμηλή συγκέντρωση, καθώς επίσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις των φυσιολογικών τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων. Σε κάθε αντίδραση το εκάστοτε διδεοξυ-ριβονουκλεοσίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε θέση του αντίστοιχου δεοξυριβονουκλεοσιδίου. Αυτή η προσθήκη του διδεοξυριβονουκλεοσιδίου οδηγεί στον τερματισμό του πολυμερισμού καθώς η απουσία της 3'-υδροξυλομάδας εμποδίζει την προσθήκη επόμενου νουκλεοτιδίου. Τα νεοσυντιθέμενα τμήματα διαχωρίζονται μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και ανιχνεύονται με τη χρήση φθοριοχρωμάτων με τα οποία είναι σημασμένα τα διδεοξυριβονουκλεοσίδια μέσω laser σε αυτόματο αναλυτή (216). Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων από την αλληλούχιση του DNA και ο προσδιορισμός της ύπαρξης ή μη των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chromai (Technelysium).



Εικόνα 20. Αλληλούχιση DNA με τη μέθοδο Sanger (WikimediaCommons).

4.4 Στατιστική Ανάλυση

Οι μέσες τιμές (mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD) και οι διάμεσοι (median) και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη (interquartile range) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney. Για τη σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test όπου ήταν απαραίτητο. Για την διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ύπαρξη πρώιμης προεκλαμψίας λαμβάνοντας υπόψη και άλλους παράγοντες έγινε ανάλυση λογαριθμικής 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.

4.5 Ηθική και Δεοντολογία

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συγκατάθεση μετά από ενημέρωση λήφθηκε από όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη

Κεφάλαιο 5 Πειραματικό Μέρος

5.1 Αποτελέσματα

Από 178 συνολικά γυναίκες (84 με πρώιμη προεκλαμψία και 94 της ομάδας ελέγχου) συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από το οποίο απομονώθηκε ολικό DNA. Στη συνέχεια τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων *TLR-2* και *TLR-4* στα οποία υπάγονται οι προς μελέτη πολυμορφισμοί ενισχύθηκαν με PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Chromas και οι γονότυποι των περιοχών κλινικής σημασίας των υποδοχέων *TLR-2* και *TLR-4* τόσο, της ομάδας ελέγχου όσο και των ασθενών με πρώιμη προεκλαμψία, που ελέγχθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.1.1 & 5.1.2

Πιλοτικά μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί κλινικής σημασίας των υποδοχέων TLR 2 & TLR 4 σε 20 περιστατικά από κάθε ομάδα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.1.1 δεν βρέθηκε κανένας πολυμορφισμός TLR 2 ούτε στην ομάδα έλεγχου (Πίνακας 5.1.1α) ούτε στις γυναίκες με πρώιμη προεκλαμψία (Πίνακας 5.1.1β) και συνεπώς οι πολυμορφισμοί TLR 2 δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω. Αντίθετα πολυμορφισμοί TLR 4 καταγράφηκαν στο πιλοτικό δείγμα των πρώτων 20 περιστατικών της κάθε ομάδας και συνεπώς η μελέτη μας επικεντρώθηκε αποκλειστικά στη περαιτέρω διερεύνηση τους (Πίνακας 5.1.2).

Πίνακας 5.1.1: Πιλοτικός έλεγχος κατανομής πολυμορφισμών TLR 2 σε 20 παθολογικά και 20 υγιή περιστατικά

5.1.1α: Πολυμορφισμοί TLR 2 Ομάδας Ελέγχου

A/A	Genotype TLR2_a (C/T)*	Genotype TLR2_b (G/A)*
CONTROL GROUP	C/T	G/A
1	CC	GG
2	CC	GG
3	CC	GG
4	CC	GG
5	CC	GG
6	CC	GG
7	CC	GG

8	CC	GG
9	CC	GG
10	CC	GG
11	CC	GG
12	CC	GG
13	CC	GG
14	CC	GG
15	CC	GG
16	CC	GG
17	CC	GG
18	CC	GG
19	CC	GG
20	CC	GG

*Ως TLR2_a χαρακτηρίζεται ο πολυμορφισμός C2029T (Arg677Trp) ενώ η ονομασία TLR2_b αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό G2258A (Arg753Gln). Οι γονότυποι χωρίς τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται ως CC και GG αντίστοιχα.

5.1.1β: Πολυμορφισμοί TLR 2 Ομάδας Πρώϊμης Προεκλαμψίας

A/A	Genotype TLR2_a (C/T)*	Genotype TLR2_b (G/A)*
PREECLAMPSIA GROUP	C/T	G/A
1	CC	GG
2	CC	GG
3	CC	GG
4	CC	GG
5	CC	GG
6	CC	GG
7	CC	GG
8	CC	GG
9	CC	GG
10	CC	GG
11	CC	GG
12	CC	GG
13	CC	GG
14	CC	GG
15	CC	GG
16	CC	GG
17	CC	GG
18	CC	GG
19	CC	GG
20	CC	GG

*Ως TLR2_a χαρακτηρίζεται ο πολυμορφισμός C2029T (Arg677Trp) ενώ η ονομασία TLR2_b αντιστοιχεί στον πολυμορφισμό G2258A (Arg753Gln). Οι γονότυποι χωρίς τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται ως CC και GG αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της πιλοτικής αλληλούχισης DNA των 20 περιστατικών κάθε ομάδας (Πίνακας 5.1.1), έδειξαν ότι κανένας από τους δύο γονιδιακούς πολυμορφισμούς του υποδοχέα TLR-2 δεν ανιχνεύτηκε ούτε στην ομάδα ελέγχου (5.1.1α) ούτε στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας (5.1.1β) και συνεπώς δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Ο Πίνακας 5.1.2 συνοψίζει τα αποτελέσματα γονοτύπησης της περιοχής του γονιδίου TLR 4 που περιέχει τους πολυμορφισμούς κλινικής σημασίας του υποδοχέα, των 178 περιστατικών (84 με πρώιμη προεκλαμψία και 94 της ομάδας ελέγχου) που συνολικά μελετήθηκαν.

Πίνακας 5.1.2: Κατανομή Πολυμορφισμών TLR 4

5.1.2α: Ομάδα Ελέγχου (N=94)

Οι ετερόζυγοι για τους πολυμορφισμούς TLR4 Asp299Gly και Thr399Ile έχουν γονότυπο AG και CT αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι φυσιολογικοί γονότυποι είναι AA και CC, ενώ οι γονότυποι ομοζυγών με τον πολυμορφισμό είναι GG και TT αντίστοιχα.

a/a	TLR 4: A/G	TLR 4 : C/T
Ομάδα Ελέγχου		
1	AA	CC
2	AA	CC
3	AA	CC
4	AA	CC
5	AA	CC
6	AA	CC
7	AA	CC
8	AA	CC
9	GA	TC
10	AA	CC
11	AA	CC
12	AA	CC
13	AA	CC
14	AA	CC
15	GA	TC
16	AA	CC

17	AA	CC
18	AA	CC
19	AA	CC
20	AA	CC
21	AA	CC
22	AA	CC
23	AA	CC
24	AA	CC
25	AA	CC
26	AA	CC
27	AA	CC
28	AA	CC
29	GA	TC
30	AA	CC
31	AA	CC
32	AA	CC
33	AA	CC
34	AA	CC
35	AA	CC
36	AA	CC
37	AA	CC
38	AA	CC
39	AA	CC
40	AA	CC
41	AA	CC
42	AA	CC
43	AA	CC
44	AA	CC
45	AA	CC
46	AA	CC
47	AA	CC
48	AA	CC
49	AA	CC
50	AA	CC
51	AA	CC
52	AA	CC
53	AA	CC
54	AA	CC

55	AA	CC
56	GA	TC
57	AA	CC
58	AA	CC
59	AA	CC
60	AA	CC
61	AA	CC
62	GA	TC
63	AA	CC
64	AA	CC
65	AA	CC
66	AA	CC
67	AA	CC
68	AA	CC
69	AA	CC
70	AA	CC
71	AA	CC
72	AA	CC
73	AA	CC
74	AA	CC
75	AA	CC
76	GA	TC
77	AA	CC
78	AA	CC
79	AA	CC
80	AA	CC
81	AA	CC
82	AA	CC
83	AA	CC
84	AA	CC
85	AA	CC
86	AA	CC
87	AA	CC
88	AA	CC
89	AA	CC
90	AA	CC
91	AA	CC
92	AA	CC

93	AA	CC
94	AA	CC

5.1.2β: Ομάδα Πρώιμης Προεκλαμψίας (EOP) (N=84)

a/a PE	TLR 4: A/G	TLR 4 : C/T
1	AA	CC
2	AA	CC
3	AA	CC
4	AA	CC
5	GA	TC
6	AA	CC
7	AA	CC
8	GA	TC
9	AA	CC
10	AA	TC
11	AA	CC
12	AA	CC
13	AA	CC
14	AA	CC
15	AA	CC
16	GA	TC
17	AA	CC
18	AA	CC
19	AA	CC
20	AA	CC
21	GA	TC
22	AA	CC
23	GA	TC
24	AA	CC
25	AA	CC
26	AA	CC
27	AA	CC
28	AA	CC
29	AA	CC
30	AA	CC
31	AA	CC
32	AA	CC

33	AA	CC
34	AA	CC
35	AA	CC
36	AA	CC
37	AA	TC
38	AA	CC
39	GG	TT
40	AA	CC
41	AA	CC
42	GA	TC
43	AA	CC
44	AA	CC
45	AA	CC
46	AA	CC
47	GA	TC
48	AA	CC
49	AA	CC
50	GA	TC
51	AA	CC
52	AA	TC
53	AA	CC
54	AA	CC
55	AA	CC
56	AA	CC
57	AA	CC
58	GA	TC
59	AA	CC
60	AA	CC
61	AA	CC
62	AA	CC
63	GA	TC
64	AA	CC
65	GA	TC
66	AA	CC
67	AA	CC
68	AA	CC
69	AA	CC
70	AA	CC

71	AA	CC
72	AA	CC
73	AA	CC
74	AA	CC
75	AA	CC
76	AA	CC
77	AA	CC
78	AA	CC
79	AA	TC
80	AA	CC
81	GG	TT
82	AA	CC
83	AA	CC
84	GA	TC

a/a: αύξων αριθμός περιστατικού

Ανιχνευθήκαν συνολικά 20 φορείς πολυμορφισμών TLR 4 στα 174 περιστατικά της μελέτης, που ανήκουν σε τρεις ομάδες: Ετεροζυγώτες Asp299Gly (A/G) & Thr399Ile (C/T) (N=16), ετεροζυγώτες Thr399Ile (C/T) (N=2) και ομοζυγώτες Asp299Gly (A/G) & Thr399Ile (C/T) (N=2). Εξ αυτών 6 μόνο ετεροζυγώτες Asp299Gly (A/G) & Thr399Ile (C/T) ανιχνεύτηκαν στην ομάδα ελέγχου (N=94) και οι υπόλοιποι 14 στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας (N=84). Συνεπώς οι φορείς πολυμορφισμών αντιπροσωπεύουν το 6.38% των περιστατικών στην ομάδα ελέγχου και το 16.66% των περιστατικών στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας απαντούν δηλαδή 2.61 φορές συχνότερα στα παθολογικά από τα φυσιολογικά περιστατικά της μελέτης.

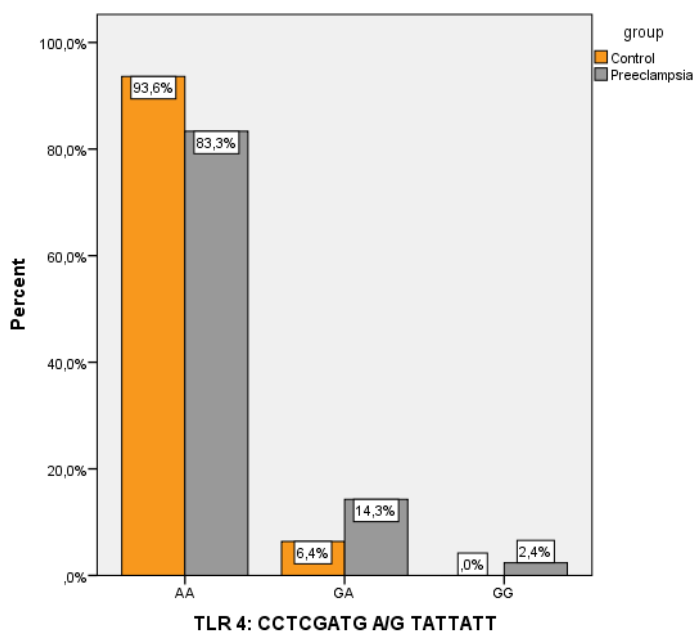
Ο στατιστικός έλεγχος της κατανομής των πολυμορφισμών TLR 4 στις 2 ομάδες μελέτης φαίνεται στον Πίνακα 5.1.3.

Πίνακας 5.1.3: Κατανομή πολυμορφισμών TLR 4 μεταξύ φυσιολογικών (control) και παθολογικών (early-onset preeclampsia, EOP) ομάδων

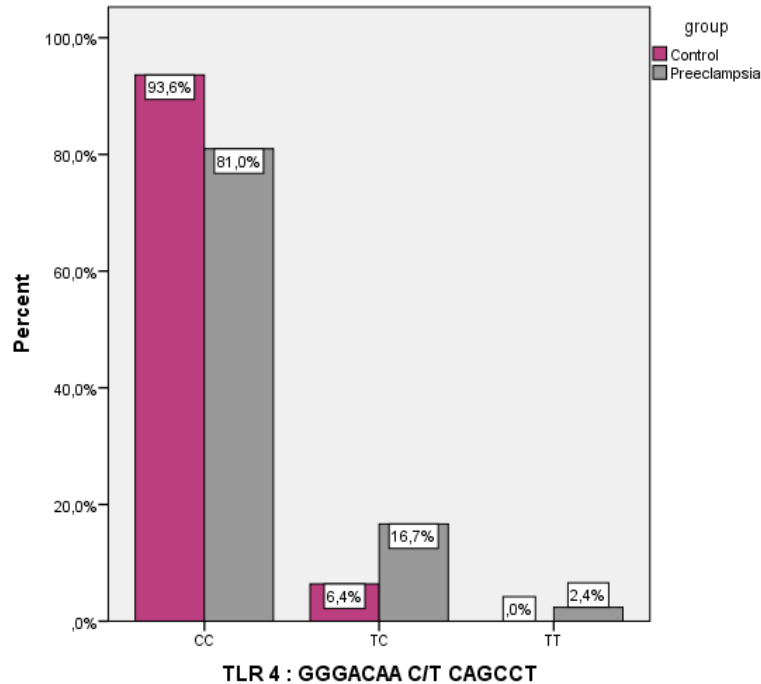
		Group				P Pearson's χ^2 test
		Control		EOP		
		N**	%	N**	%	
TLR 4: Asp299Gly (A/G)	AA	88	93,6	70	83,3	0,053*
	GA	6	6,4	12	14,3	
	GG	0	0	2	2,4	
TLR 4 : Thr399Ile (C/T)	CC	88	93,6	68	81,0	0,019*
	TC	6	6,4	14	16,7	
	TT	0	0	2	2,4	
TLR 4: Asp299Gly (A/G)	AA	88	93,6	70	83,3	0,030
	GA/GG	6	6,4	14	16,7	
TLR 4 : Thr399Ile (C/T)	CC	88	93,6	68	81,0	0,010
	TC/TT	6	6,4	16	19,0	

*Fisher's exact test, **αριθμός περιστατικών

Συμφώνα με τον Πίνακα 5.1.3, η ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας εμφανίζει στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά πολυμορφισμών TLR 4: Asp299Gly (A/G) ($p=0,030$) (δες και Εικ. 5.1.1) και Thr399Ile (C/T) ($p=0,010$) (δες και Εικ. 5.1.2) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 5.1.1: Κατανομή ποσοστών πολυμορφισμού TLR 4: Asp299Gly (A/G) στις δυο ομάδες μελέτης σύμφωνα με τα στοιχεία του Πίνακα 5.1.3



Εικόνα 5.1.2: Κατανομή ποσοστών πολυμορφισμού TLR 4: Thr399Ile (C/T) στις δυο ομάδες μελέτης σύμφωνα με τα στοιχεία του Πίνακα 5.1.3

Όπως αναμενόταν οι 2 πολυμορφισμοί TLR 4 συγκληρονομούνται καθώς η μεταξύ τους απόσταση είναι μόλις 300 βάσεις, ο μεν Thr399Ile (C/T) σε 20 στα 20 περιστατικά και ο Asp299Gly (A/G) σε 18 στα 20 περιστατικά. Εν τούτοις αν συνδυαστικά, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζονται σαν ζεύγος 2.61 φορές περίπου συχνότερα στα παθολογικά από τα φυσιολογικά περιστατικά της μελέτης μας, οι συχνότητες αυτοτελούς εμφάνισης του κάθε ενός πολυμορφισμού διαφοροποιούνται σημαντικά στις 2 ομάδες περιστατικών (Πίνακας 5.1.4)

Στον Πίνακα 5.1.4 δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας από την παρουσία των πολυμορφισμών TLR 4.

Πίνακας 5.1.4: Πιθανότητα εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας φορέων πολυμορφισμών TLR 4

		OR (95% ΔΕ) ⁺	P
TLR 4: Asp299Gly (A/G)	AA (αναφορά)		
	GA/GG	2,91 (1,07 – 8,03)	0,036
TLR 4 : Thr399Ile (C/T)	CC (αναφορά)		
	TC/TT	3,45 (1,28 – 9,29)	0,014

⁺Σχετικός λόγος (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης)

-Οι GA/GG Asp299Gly (A/G) περιπτώσεις είχαν 2,91 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα να ανήκουν στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

-Οι TC/TT Thr399Ile (C/T) περιπτώσεις είχαν 3,45 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Στον Πίνακα 5.1.5 δίνονται οι σχετικοί λόγοι για την πιθανότητα εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας από την παρουσία των πολυμορφισμών έχοντας λάβει υπόψη την ηλικία της μητέρας, τον τόκο και το αν ήταν δίδυμη κύηση.

Πίνακας 5.1.5: Πιθανότητα εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας φορέων πολυμορφισμών TLR 4 σύμφωνα και με την ηλικία της μητέρας, τον τόκο και το αν ήταν δίδυμη κύηση

		OR (95% ΔΕ)⁺	P
TLR 4: Asp299Gly (A/G)	AA (αναφορά) GA/GG	2,94 (1,06-8,18)	0,038
TLR 4 : Thr399Ile (C/T)	CC (αναφορά) TC/TT	3,52 (1,28-9,60)	0,014

⁺Σχετικός λόγος (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης)

-Οι GA/GG Asp299Gly (A/G) περιπτώσεις είχαν 2,94 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με προεκλαμψία.

-Οι TC/TT Thr399Ile (C/T) περιπτώσεις είχαν 3,52 φορές σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα για να ανήκουν στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Ο Πίνακας 5.1.6 παρουσιάζει τη σχέση του πολυμορφισμού TLR 4: Asp299Gly (A/G) με τον τόκο, το φύλο νεογνού, την ύπαρξη εμβρυϊκού θανάτου και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

Πινάκας 5.1.6: Σχέση πολυμορφισμού Asp299Gly (A/G) με τόκο, φύλο νεογνού, εμβρυϊκό θάνατο και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία.

		TLR 4 Asp299Gly				P Fisher's exact test
		AA		GA/GG		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	50	71,4	12	85,7	0,245
	2ος	8	11,4	2	14,3	
	3ος	12	17,1	0	0,0	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	40	57,1	8	57,1	1,000
	Κορίτσι	26	37,1	6	42,9	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	4	5,7	0	0,0	
Εμβρυϊκός θάνατος	Όχι	68	97,1	12	85,7	0,128
	Ναι	2	2,9	2	14,3	
Δίδυμη κύηση	Όχι	62	88,6	12	85,7	0,670
	Ναι	8	11,4	2	14,3	

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του πολυμορφισμού TLR 4: Asp299Gly (A/G) με τον τόκο, το φύλο νεογνού, την ύπαρξη εμβρυϊκού θανάτου και το αν η κύηση ήταν δίδυμη.

Ο Πίνακας 5.1.7 παρουσιάζει τη σχέση του πολυμορφισμού TLR 4: Thr399Ile (C/T) με τον τόκο, το φύλο νεογνού, την ύπαρξη εμβρυϊκού θανάτου και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία:

Πίνακας 5.1.7: Σχέση πολυμορφισμού Thr399Ile (C/T) με τόκο, φύλο νεογνού, εμβρυϊκό θάνατο και το αν η κύηση ήταν δίδυμη στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία

		TLR 4: Thr399Ile				P Pearson's x2 test
		CC		TC/TT		
		N	%	N	%	
Τόκος	1ος	48	70,6	14	87,5	0,221
	2ος	8	11,8	2	12,5	
	3ος	12	17,6	0	0,0	
Φύλο νεογνού	Αγόρι	38	55,9	10	62,5	0,905
	Κορίτσι	26	38,2	6	37,5	
	Αγόρι-Κορίτσι σε δίδυμη	4	5,9	0	0,0	
Εμβρυϊκός θάνατος	Όχι	66	97,1	14	87,5	0,162
	Ναι	2	2,9	2	12,5	
Δίδυμη κύηση	Όχι	60	88,2	14	87,5	1,000
	Ναι	8	11,8	2	12,5	

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του πολυμορφισμού TLR 4 :Thr399Ile (C/T) με τον τόκο, το φύλο νεογνού, την ύπαρξη εμβρυϊκού θανάτου και το αν η κύηση ήταν δίδυμη.

Ακολούθως παρουσιάζεται η σχέση όλων των πολυμορφισμών TLR 4 με την εβδομάδα κύησης στην ομάδα με πρώιμη προεκλαμψία:

Πίνακας 5.1.8: Σχέση πολυμορφισμών TLR 4 με εβδομάδα κύησης στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψία

		Εβδομάδα κύησης	p Mann-Whitney test
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
TLR 4 Asp299Gly	AA	32 (31 - 34)	0,750
	GA/GG	32 (27 - 34)	
TLR 4 Thr399Ile	CC	32 (31 - 34)	0,727
	TC/TT	32,5 (29 - 34)	

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση των πολυμορφισμών TLR 4 με την εβδομάδα κύησης στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας.

Ακολούθως παρουσιάζεται η σχέση όλων των πολυμορφισμών TLR 4 με το βάρος γέννησης στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας:

Πίνακας 5.1.9: Σχέση πολυμορφισμών TLR 4 με βάρος γέννησης νεογνού στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας

		Βάρος γέννησης (gr)	P Mann-Whitney test
		Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
TLR 4 Asp299Gly	AA	1655 (1260 – 2140)	0,675
	GA/GG	1420 (850 - 2600)	
TLR 4 Thr399Ile	CC	1650 (1260 - 2115)	0,833
	TC/TT	1560 (1075 - 2480)	

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση των πολυμορφισμών TLR 4 με το βάρος γέννησης νεογνού στην ομάδα πρώιμης προεκλαμψίας.

5.2 Συγκεντρωτικά Ευρήματα Διατριβής Επιγραμματικά

Όσον αφορά τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης αντίστοιχου ηλικιακού εύρους, μέση ηλικία 31,8 έτη (SD = 5,8) για EOP και 31,8 έτη (SD = 6,3) για την ομάδα ελέγχου, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικές διαφορές όσον αφορά τον αριθμό τοκετών, το εμβρυϊκό φύλο και τις δίδυμες κυήσεις. Όπως αναμενόταν, η μέση εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό και το βάρος γέννησης ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($p < 0,001$), ενώ ο εμβρυϊκός θάνατος από γυναίκες με EOP ήταν αυξημένος ($p < 0,048$) σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 5.2.1).

Table 5.2.1. Clinical characteristics of study groups

	Control N=94 N(%)	EOP N=84 N(%)	p
Parity			
1	68(72.3)	62(73.8)	0.826¶
2	14(14.9)	10(11.9)	
3	12(12.8)	12(14.3)	
Age (years), mean (SD)	31.8 (5.8)	31.8 (6.3)	0.941+
Fetal sex			
Boys	48(51.1)	48(57.1)	0.661*
Girls	42(44.7)	32(38.1)	
Boys-Girl (twins)	4(4.3)	4(4.8)	
Fetal loss			
No	94(100)	80(95.2)	0.048*
Yes	0(0)	4(4.8)	
Twins-pregnancy			
No	86(91.5)	74(88.1)	0.453¶
Yes	8(8.5)	10(11.9)	
Week of gestation, median (IQR)	39 (38 - 40)	32 (31 - 34)	<0.001++
Preterm delivary			
No	92(97.9)	0(0)	<0.001¶
Yes	2(2.1)	84(100)	
Birth weight (gr), median (IQR)	3550 (3170 - 3900)	1650 (1260 - 2140)	<0.001++

¶chi-square test; *Fisher's exact test; +Student's t-test; ++Mann-Whitney test

Η παρουσία "άγριου τύπου" (AA) και (CC) και "μεταλλαγμένων" Asp299Gly ή D299G (ετερόζυγων-GA & ομόζυγων-GG) & Thr399Ile ή T399I (ετεροTC & ομόζυγο-TT) αλληλουχιών του γονιδίου TLR4, καταγράφηκε σε 178 συμμετέχουσες στη μελέτη ανάλογου ηλικιακού εύρους, 84 με EOP και 94 χωρίς EOP (ομάδα μαρτύρων-ελέγχου), με άμεση αλληλούχιση (Πίνακας 5.2.2).

Table 5.2.2. Distribution of TLR 4 genotypes in study groups

		Group				P
		Control		EOP		
		N	%	N	%	
Asp299Gly	AA	88	93.6	70	83.3	0.053*
	GA	6	6.4	12	14.3	
	GG	0	0	2	2.4	
Thr399Ile	CC	88	93.6	68	81.0	0.019*
	TC	6	6.4	14	16.7	
	TT	0	0	2	2.4	
Asp299Gly	AA	88	93.6	70	83.3	0.030¶
	GA/GG	6	6.4	14	16.7	
Thr399Ile	CC	88	93.6	68	81.0	0.010¶
	TC/TT	6	6.4	16	19.0	

¶chi-square test;*Fisher's exact test

Οι ετερόζυγοι πολυμορφισμοί TLR4 ήταν πιο συχνοί σε γυναίκες με ιστορικό EOP παρά στις μάρτυρες (GA για Asp299Gly: 14,3% έναντι 6,4% για AA, $p = 0,053$ & CT για Thr399Ile: 16,7% έναντι 6,4% για CC, $p=0,019$) και η παραπάνω συσχέτιση ενισχύθηκε όταν συμπεριελήφθησαν και οι ομόζυγοι φορείς (GA / GG για Asp299Gly: 16,7% έναντι 6,4% για AA, $p = 0,03$ & TC / TT για Thr399Ile: 19,0% έναντι 6,4% , $p=0,01$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης, όπως ο αριθμός τοκετών, το εμβρυϊκό φύλο, η απώλεια εμβρύου, οι δίδυμες κύσεις, οι εβδομάδες κύησης και το βάρος γέννησης μεταξύ φορέων αλληλόμορφων άγριου τύπου (AA & CC) και μεταλλαγμένων (GA / GG & TC / TT) (Πίνακες 5.2.3 & 5.2.4).

Table 5.2.3. Association of Asp299Gly GA/GG with pregnancy outcomes

	TLR 4: Asp299Gly GA/GG		p
	AA	GA/GG	
	N(%)	N(%)	
Parity			
1	50(71.4)	12(85.7)	0.245¶
2	8(11.4)	2(14.3)	
3	12(17.1)	0(0)	
Fetal sex			
Boys	40(57.1)	8(57.1)	>0.999¶
Girls	26(37.1)	6(42.9)	
Boys-Girl (twins)	4(5.7)	0(0)	
Fetal loss			
No	68(97.1)	12(85.7)	0.128¶
Yes	2(2.9)	2(14.3)	
Twins			
No	62(88.6)	12(85.7)	0.670¶
Yes	8(11.4)	2(14.3)	
Week of gestation, median (IQR)	32 (31 - 34)	32 (27 - 34)	0.750 ⁺
Birth weight (gr) , median (IQR)	1655 (1260 – 2140)	1420 (850 - 2600)	0.675 ⁺

¶Fisher's exact test; ⁺Mann-Whitney test

Table 5.2.4. Association of Thr399Ile TC/TT with pregnancy outcomes

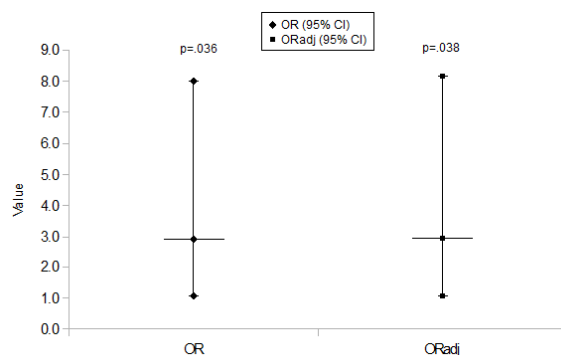
	TLR 4 : Thr399Ile TC/TT		p
	CC	TC/TT	
	N(%)	N(%)	
Parity			
1	48(70.6)	14(87.5)	0.221¶
2	8(11.8)	2(12.5)	
3	12(17.6)	0(0)	
Fetal sex			
Boys	38(55.9)	10(62.5)	0.905¶
Girls	26(38.2)	6(37.5)	
Boys-Girl (twins)	4(5.9)	0(0)	
Fetal loss			
No	66(97.1)	14(87.5)	0.162¶
Yes	2(2.9)	2(12.5)	
Twins			
No	60(88.2)	14(87.5)	>0.999¶
Yes	8(11.8)	2(12.5)	
Week of gestation, median (IQR)	32 (31 - 34)	32.5 (29 - 34)	0.727 ⁺
Birth weight (gr) , median (IQR)	1650 (1260 - 2115)	1560 (1075 - 2480)	0.833 ⁺

¶Chi-square test; ⁺Mann-Whitney test

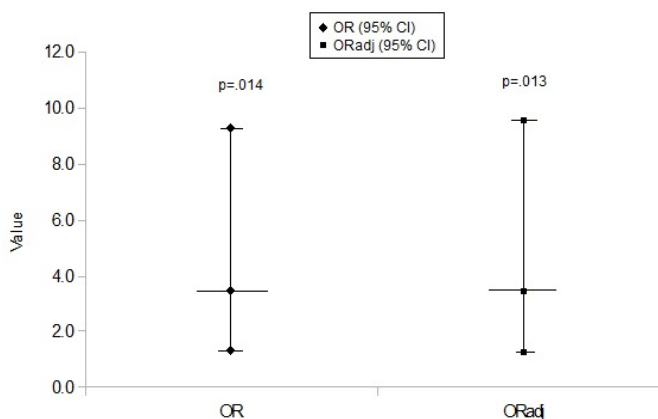
Όπως αναμένεται από τη στενή τους εγγύτητα (300bp), τα δύο πολυμορφικά αλληλόμορφα συγκληρονομούνται (15, 217). Παρατηρήθηκαν συνολικά 18 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα Asp299Gly και 20 Thr399Ile ομο- (GG / TT) και ετερόζυγα (AG / CT) στους 20 πολυμορφικούς φορείς της μελέτης (Πίνακας 5.2.2). Οι μη προσαρμοσμένες και οι προσαρμοσμένες για αναλογίες πιθανότητας από την ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι οι γυναίκες με γονότυπους GA / GG ή TC / TT στις αμινοξικές θέσεις 299 και 399 του υποδοχέα αντίστοιχα, είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης EOP. Οι μη προσαρμοσμένες αναλογίες πιθανότητας OR (95% CI) ήταν 2.91 (1.07-8.03) για φορείς GA / GG και 3.45 (1.28-9.29) για φορείς TC / TT, σε σύγκριση με φορείς άγριου τύπου AA και CC, αντίστοιχα. Όταν ρυθμίστηκαν για την ηλικία της μητέρας, τον αριθμό τοκετών και τις δίδυμες εγκυμοσύνες, οι αντίστοιχοι λόγοι

πιθανότητας βελτιώθηκαν οριακά στα 2,94 (1,06-8,18) και 3,52 (1,28-9,60), αντίστοιχα (Εικόνες 5.2.1 και 5.2.2).

Οι Εικόνες 5.2.1 & 5.2.2 απεικονίζουν γραφικά τα αποτελέσματα των Πινάκων 5.1.4 & 5.1.5 αντίστοιχα.



Εικόνα 5.2.1. Αποτελέσματα μετά από ανάλυση μέσω λογιστικής παλινδρόμησης που αφορούν τη συσχέτιση των γονότυπων Asp299Gly GA / GG με EOP: Μη προσαρμοσμένα-διορθωμένα και διορθωμένα-προσαρμοσμένα αποτελέσματα για το κλάσμα σχετικών πιθανοτήτων μετά από ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, έδειξαν ότι οι γυναίκες με γονότυπο GA / GG στη θέση υποδοχέα αμινοξέων 299 είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα για EOP. Το μη προσαρμοσμένο-διορθωμένο κλάσμα σχετικής πιθανότητας OR (95% CI) ήταν 2,91 (1,07-8,03) για το γονότυπο GA / GG, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που αφορά το γονότυπο άγριου τύπου AA. Όταν προσαρμόστηκε για την ηλικία της μητέρας, τον τόκο και τις δίδυμες εγκυμοσύνες, το αντίστοιχο κλάσμα σχετικής πιθανότητας βελτιώθηκε οριακά σε 2,94 (1,06-8,18)



Εικόνα 5.2.2. Αποτελέσματα μετά από ανάλυση μέσω λογιστικής παλινδρόμησης που αφορούν τη συσχέτιση των γονότυπων Thr399Ile TC/TT με EOP: Μη προσαρμοσμένα-διορθωμένα και διορθωμένα-προσαρμοσμένα αποτελέσματα για το κλάσμα σχετικών πιθανοτήτων μετά από ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, έδειξαν ότι οι γυναίκες με γονότυπο TC/TT στη θέση υποδοχέα αμινοξέων 399 είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα για EOP. Το μη προσαρμοσμένο-διορθωμένο κλάσμα σχετικής πιθανότητας OR (95% CI) ήταν 3.45 (1.28-9.29) για το γονότυπο TC/TT, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που αφορά το γονότυπο άγριου τύπου CC. Όταν προσαρμόστηκε για την ηλικία της μητέρας, τον τόκο και τις δίδυμες εγκυμοσύνες, το αντίστοιχο κλάσμα σχετικής πιθανότητας βελτιώθηκε οριακά σε 3.52 (1.28-9.60)

Κεφάλαιο 6 Γενικός Σχολιασμός

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *TLR-2* και της εμφάνισης πρώιμης προεκλαμψίας σε γυναίκες από την Κεντρική Ελλάδα, καθώς οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί (Arg753Gln και Arg677Trp) δεν εντοπίστηκαν ούτε στην ομάδα των ασθενών αλλά ούτε στην ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, στο γονίδιο *TLR-4*, διαφαίνεται μία τάση συσχέτισης των δύο πολυμορφισμών (Asp299Gly και Thr399Ile) με την εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας.

Οι TLRs θεωρούνται η πιο σημαντική τάξη υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων, που συμμετέχουν στη άμυνα του ξενιστή ενάντια σε ένα εύρος παθογόνων επάγοντας και ρυθμίζοντας το σύστημα φυσικής ανοσίας (218) και πλέον η άποψη ότι το σύστημα ανοσίας της μητέρας κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη σοβαρών υπερτασικών διαταραχών της κύησης, έχει πολλούς υποστηρικτές (15). Η φλεγμονή αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας. Δεδομένου ότι οι πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορεί να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι ίσως συμβάλλουν στην επιρρέπεια στην προεκλαμψία (219).

Είναι γεγονός ότι τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για το αν τελικά οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *TLR-2* και *TLR-4* συνδέονται με την εμφάνιση προεκλαμψίας είναι αντικρουόμενα.

Από τη μία πλευρά οι van Rijn et al. το 2008 μελέτησαν και συσχέτισαν τους δύο συνκληρονομούμενους πολυμορφισμούς του *TLR-4* με την εμφάνιση πρώιμης προεκλαμψίας. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Xie et al το 2010, που υποστήριξαν ότι οι συγκεκριμένες παραλλαγές των αλληλομόρφων του *TLR-4* αλλά και ο πολυμορφισμός Arg753Gln του *TLR-2*, συμβάλλουν σε ένα αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πρώιμης προεκλαμψίας αλλά όχι όψιμης.

Οι ερευνητές πρότειναν ένα πιθανό ρόλο της απόκρισης σε λιποσακχαρίτες στην επιρρέπεια για προεκλαμψία. Οι λιποσακχαρίτες μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδη απόκριση και διαταραχές στα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών όπως υπέρταση, πρωτεϊνουρία και ενδοθηλίωση των σπειραματικών σωληναρίων, μία κατάσταση που προσομοιάζει στο κλινικό σύνδρομο της προεκλαμψίας. Σε συνδυασμό με δεδομένα που δείχνουν αυξημένους διαλυτούς και κυτταρικούς δείκτες του

συστήματος φυσικής ανοσίας σε γυναίκες με πρώιμη προεκλαμψία, δημιουργείται το εύλογο ερώτημα αν γενετικά κωδικοποιούμενες διαφορές μεταξύ των ατόμων σε σχέση με τη φλεγμονώδη απόκριση στους λιποσακχαρίτες θα μπορούσε να επηρεάσει τη μητρική προδιάθεση στην ανάπτυξη προεκλαμψίας. Επιπλέον, η καταστροφή ιστού (είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς παράγοντες) περιλαμβάνει την απελευθέρωση σηματοδοτικών μορίων που είναι ικανά να προκαλούν μια άμεση αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην προεκλαμψία, τα αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία κυτταρικών και υποκυτταρικών υπολειμμάτων του πλακούντα όπως τμήματα από τη μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης, ελεύθερο εμβρυικό DNA και ο sFlt-1, προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο και προηγούνται της έναρξης του κλινικού συνδρόμου. Είναι πιθανό οι παράγοντες αυτοί να λειτουργούν σα συνδέτες για τους TLRs (15, 23).

Από την άλλη πλευρά, οι Franchim et al το 2011 μελέτησαν τους πολυμορφισμούς Arg753Gln (*TLR-2*) και Asp299Gly (*TLR-4*) μαζί με πολυμορφισμούς γονιδίων διαφόρων ιντερλευκινών αλλά δε βρήκαν κάποια συσχέτιση με την ανάπτυξη προεκλαμψίας. Συσχέτιση επίσης δε βρέθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου *TLR-4* και προεκλαμψίας στη μελέτη των Molvarec et al. το 2008 και στο ίδιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και οι Fraser et al (2008) για τον έναν πολυμορφισμό του γονιδίου *TLR-2* (Arg753Gln). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτές τις μελέτες δεν πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την πρώιμη ή όψιμη εμφάνιση προεκλαμψίας (16, 156, 219).

Οι γενετικές μελέτες είναι πολύπλοκες, ειδικά όταν πολυσυστηματικές ασθένειες, όπως η προεκλαμψία, βρίσκονται υπό ανάλυση. Ωστόσο μπορεί να αποκαλύψουν πληροφορίες που θα μπορούσαν πιθανώς να οδηγήσουν στην ανάπτυξη χρήσιμων προγνωστικών δοκιμασιών στο μέλλον. Ακόμη και τα αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να συμβάλλουν στην κατανόηση της παθογένεσης των ασθενειών. Η συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου και πολύπλοκων ασθενειών θα πρέπει να αναλύεται με προσοχή. Τα θετικά ευρήματα δε σημαίνουν απαραίτητα ότι η μεταβλητή που μελετάται κατέχει κάποια λειτουργική επίδραση. Ομοίως, τα αρνητικά αποτελέσματα δε θα πρέπει να ερμηνεύονται ως έλλειψη φυσιολογικού ρόλου για το μελετώμενο παράγοντα, αλλά σαν πιθανή έλλειψη στατιστικής συσχέτισης. Εκτός από

την αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων, συμπεριφορικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι πιθανό να επηρεάζουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην προεκλαμψία, οδηγώντας σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η πιθανή συμβολή του εμβρυϊκού γονοτύπου στην ανάπτυξη προεκλαμψίας (219).

Η έγκαιρη ταυτοποίηση γυναικών με ρίσκο ανάπτυξης προεκλαμψίας θα μπορούσε να διευκολύνει την άμεση παρέμβαση, τη στοχευμένη θεραπεία και την αυστηρή παρακολούθηση. Καθώς η αποτυχία της διείδυσης της τροφοβλάστης προκύπτει στο μέσο του δεύτερου τριμήνου, φαίνεται ότι οποιοδήποτε επιτυχές προληπτικό μέτρο πρέπει να εφαρμοσθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα. Έτσι, η πρόγνωση στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είναι υποχρεωτική για να διευκολύνει επαρκείς προφυλακτικές παρεμβάσεις στο μέλλον. Στην περίπτωση της προεκλαμψίας, ένας ιδανικός βιοδείκτης θα έπρεπε ήδη να επιτρέπει μια ακριβή πρόβλεψη κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, όταν η πλακουντιοποίηση βρίσκεται σε εξέλιξη και το σύστημα έχει την πλαστικότητα που απαιτείται για αναδιαμόρφωση ή τουλάχιστον επιτρέπει τη χρήση πιθανών φαρμακευτικών αγωγών όπως η ασπιρίνη (138).

Λόγω της πολύπλοκης αιτιολογίας της νόσου και της μη επάρκειας των μέχρι τώρα δεικτών, η εφαρμογή του δυναμικού των γενετικών δεικτών κερδίζει έδαφος, καθώς η χρήση τους θα επέτρεπε την πολύ έγκαιρη κλινικά παρέμβαση. Η γενετική ανίχνευση θα μπορούσε να ταυτοποιήσει γυναίκες υψηλού κινδύνου ακόμη και πριν την κύηση, επιτρέποντας πιθανώς καινοτόμες παρεμβάσεις όπως η ανοσορυθμιστική θεραπεία στο πρώτο τρίμηνο. Επιπλέον, η ταυτοποίηση τέτοιων γενετικών δεικτών θα μπορούσε ίσως να αποβεί χρήσιμη στην κατηγοριοποίηση της ασθένειας και την εφαρμογή πιο αποτελεσματικών στοχευμένων θεραπευτικών στρατηγικών (156).

Είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν στο μέλλον μεγάλες πολυκεντρικές προοπτικές μελέτες με πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων και μεγάλο αριθμό περιστατικών, χρησιμοποιώντας τελευταίες τεχνολογίες, όπως συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό συστοιχιών (array CGH) και μαζική παράλληλη αλληλούχιση, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι γενετικές αλλαγές που υπάρχουν σε ολόκληρο το γονιδίωμα γυναικών με προεκλαμψία. Οι μικροσυστοιχίες με υψηλό αριθμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών φαίνονται επίσης πολλά υποσχόμενες. Η χρήση των νουκλεϊκών

οξέων βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες που θα εφαρμόζουν μετρήσεις DNA, RNA, και miRNA. Είναι πιθανό ότι η μαζική παράλληλη αλληλούχιση μπορεί να συμβάλει σε καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας (54, 110).

Τα πιλοτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν τη διαφαινόμενη τάση συσχέτισης των πολυμορφισμών του *TLR-4* με την πρώιμη προεκλαμψία. Μεγαλύτερος αριθμός τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών δειγμάτων θα πρέπει να εξετασθεί για να ενισχυθούν τα πιλοτικά ευρήματα και να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Κεφάλαιο 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1. Ευρήματα Μελέτης

Η σχετική κατανομή των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων Asp299Gly και Thr399Ile του υποδοχέα TLR4, αξιολογήθηκε σε γυναίκες Καυκάσιας φυλής με και χωρίς EOP από την κεντρική Ελλάδα. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (15, 23), τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι φορείς αυτών των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία εκδήλωσης EOP. Αυτά τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα μεταβάλλουν τα εξωκυτταρικά πρότυπα μοτίβα αναγνώρισης αντιγονικών απειλών του υποδοχέα (PRR), προκαλώντας αναποτελεσματική ανοσοαπόκριση σε ποικίλες κοινές εξωγενείς και ενδογενείς παθογόνες προσβολές σε πρώιμα στάδια εμφύτευσης του πλακούντα και σε μετέπειτα ανάπτυξη μέχρι την 20η εβδομάδα κύησης (220). Για να γίνει κατανοητή η βιολογική σημασία των ευρημάτων, πρέπει να ληφθεί υπόψη το φυσικό ιστορικό - η προέλευση των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων TLR4.

Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο Asp299Gly TLR4 προέκυψε πρώτα στην Αφρική για να προσφέρει προστασία από τη θνησιμότητα λόγω ελονοσίας, αντισταθμίζοντας έτσι την αυξημένη ευαισθησία στις μολύνσεις και το σηπτικό σοκ που το συνόδευε (221, 222). Η μεταγενέστερη προσθήκη του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου Thr399Ile σε Ινδοευρωπαίους μείωσε τον κίνδυνο σηπτικού σοκ σε επίπεδα παρόμοια των αλληλόμορφων άγριου τύπου (221, 222) και ήταν μια χρήσιμη προσθήκη καθώς αν ήταν μόνο του το Asp299Gly, θα είχε προκαλέσει μεγαλύτερες απώλειες σε μείζονες πανδημίες πανώλης, τυφοειδούς πυρετού και γρίπης στην Ευρώπη.

Μέχρι τη δεκαετία του 1950 που εξαλείφθηκε, η ελονοσία ήταν ενδημική στην κεντρική Ελλάδα, τόπο προέλευσης των συμμετεχουσών της μελέτης, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση υψηλών συχνοτήτων στίγματος δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και μεταλλαγμένων αλληλόμορφων TLR4 σε ντόπιους-γηγενείς σε σχέση με άλλους ελληνικούς πληθυσμούς που δεν εκτέθηκαν σε απειλή ελονοσίας (217, 223). Η πρόσφατη μείωση της επίδρασης των μολύνσεων λόγω των επιθετικών αντιμικροβιακών πρακτικών στην κεντρική Ελλάδα αναμένεται να αναιρέσει το ρόλο ύπαρξης των προστατευτικών αλληλόμορφων κατά της ελονοσίας, όπως το Asp299Gly και να οδηγήσει σε ενδεχόμενη μείωση των συχνοτήτων τους. Ενώ η δυναμική της

γενετικής του πληθυσμού δρώντας συμπληρωματικά με το δραστικό διαγνωστικό έλεγχο και τη γενετική συμβουλευτική μείωσαν αισθητά τη συχνότητα των φορέων του στίγματος σε λιγότερο από το ήμισυ στην κεντρική Ελλάδα τα τελευταία πενήντα χρόνια (223), η αναμενόμενη μείωση της συχνότητας του Asp299Gly, κυρίως με γενετική τάση-απόκλιση, αναμένεται να ακολουθήσει πολύ μακρύτερη διαδρομή. Η απουσία του Asp299Gly σε δύο από τους 20 μεταλλαγμένους φορείς της μελέτης μας μπορεί να σηματοδοτεί την αρχή μιας τέτοιας πτωτικής τάσης στην Κεντρική Ελλάδα.

Στο παραπάνω πλαίσιο, μπορεί να ιεραρχηθεί ο σχετικός κίνδυνος των μεταλλαγμένων απλοτύπων TLR4 να αναπτύξουν EOP σε απάντηση μολυσματικών απειλών παθογένειας. Αρχικά προβλέπεται ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο GG / TT Asp299Gly / Thr399Ile, που είναι γνωστό ότι αλλοιώνει τη δέσμευση του υποδοχέα σε διάφορους παράγοντες σύνδεσης, μειώνει τα λειτουργικά επίπεδα TLR4 και αμβλύνει την ανοσοαπόκριση, θα προσδώσει τον υψηλότερο βαθμό επιδεκτικότητας-ευαισθησίας εκδήλωσης EOP μετά από πρόκληση με παθογενείς προσβολές που αναγνωρίζονται από TLR4 (188). Στη συνέχεια, σε φθίνουσα ευαισθησία, θα πρέπει να ακολουθούν οι διπλοί GA / TC Asp299Gly / Thr399Ile και οι μονοί TC Thr399Ile ετεροζυγώτες. Η στενή συσχέτιση αυτών των πολυμορφικών αλληλόμορφων με την EOP (Πίνακες 5.2.3 και 5.2.4), μαζί με τη μικρό σχετικά επηρεασμό τους από κοινές συνχυτικές παραμέτρους (Εικόνες 1 και 2), υποστηρίζει τον κεντρικό τους ρόλο στην ανάπτυξη παθογόνων υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης. Θα απαιτηθούν περαιτέρω αναλύσεις με μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών EOP από την κεντρική Ελλάδα για να επικυρωθούν οι παραπάνω προβλέψεις. Η εδραίωση αυτών των τάσεων και η καταχώρηση σχετικού κινδύνου σε διάφορους πολυμορφισμούς TLR4 θα δικαιολογούσε την πιθανή ενσωμάτωσή τους σε ένα τοπικό μοντέλο πρόβλεψης EOP.

Μέσα στα όρια του σχετικά μικρού δείγματος που εξετάστηκε, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ μεταλλαγμένων αλληλόμορφων TLR4 και EOP από παθογενή προσβολή, σε πληθυσμό από την κεντρική Ελλάδα. Δεδομένου ότι η EOP είναι σύνθετη υπερτασική διαταραχή της εγκυμοσύνης άγνωστης αιτιολογίας, με αρνητική επίδραση στη μητρική και εμβρυϊκή νοσηρότητα και θνητότητα (19-21), καθώς και στους απογόνους που γεννήθηκαν από μητέρες με EOP (17, 18), τα συμπεράσματά μπορούν να βοηθήσουν στη βελτίωση της πρόληψής της. Η αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων

κατευθυντήριων γραμμών για την πρόβλεψη EOP είναι πιθανό να ενισχυθεί από τον έλεγχο πληθυσμών με σχετικά υψηλές συχνότητες μεταλλαγών για πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την EOP, όπως των TLR4 στην κεντρική Ελλάδα (217, 223), που επιβαρύνουν με τουλάχιστον 3 πλάσιο κίνδυνο εκδήλωσης EOP τις τοπικές έγκυες-φορείς (Σχήματα 1 και 2).

Συμπερασματικά, τα πολλά υποσχόμενα πιλοτικά συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, υποστηρίζουν την άποψη ότι η πιθανή ενσωμάτωση των προγνωστικών εξετάσεων ανίχνευσης φορέων Asp299Gly και Thre399Ile του υποδοχέα TLR4 σε τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες EOP μπορεί να οδηγήσουν σε βελτιωμένη πρόληψη και αντιμετώπιση βαρέων υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης στην κεντρική Ελλάδα.

7.2. Στρατηγικές αντιμετώπισης προεκλαμψίας

7.2.1. το κλινικό πρόβλημα

Η προεκλαμψία είναι ειδική πολυσυστηματική διαταραχή της εγκυμοσύνης που εμφανίζεται σε περίπου 5% των κυήσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες (224, 225) Τα ποσοστά προεκλαμψίας αυξάνουν σταθερά τα τελευταία 30 χρόνια στις Ηνωμένες Πολιτείες με την προεκλαμψία να είναι η κύρια πλέον αιτία μητρικής και εμβρυϊκής / νεογνικής νοσηρότητας και θνητότητας (226). Οι γυναίκες με προεκλαμψία καθώς και οι απόγονοί τους, διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης χρόνιων ασθενειών, όπως καρδιαγγειακών παθήσεων και μεταβολικού συνδρόμου (CVD) αργότερα στη ζωή τους (227, 228). Αν και αποτελεί κύρια αιτία μητρικού θανάτου και σημαντικό παράγοντα μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας, η φαρμακευτική της αντιμετώπιση είναι στην καλύτερη περίπτωση ελάχιστα αποτελεσματική και η τρέχουσα θεραπευτική της διαχείριση έχει σημαντικούς περιορισμούς. Προς το παρόν, ο τοκετός θεωρείται η μόνη αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση (229) αν και πάλι η προεκλαμψία μπορεί να συνεχιστεί και μετά τον τοκετό ή και να παρουσιαστεί de novo (230). Η απουσία προόδου στον εντοπισμό νέων θεραπευτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση της προεκλαμψίας οφείλονται εν μέρει στην έλλειψη ζωικών μοντέλων για τη μελέτη της ετερογένειας που εμφανίζει στον άνθρωπο καθώς και στην ελλιπή κατανόηση βασικών μηχανισμών ασθενειών. Δεν υπάρχουν ζωικά μοντέλα αυθόρμητης εκδήλωσης

προεκλαμψίας. Η ανάπτυξη νέων ζωικών μοντέλων που να μιμούνται την ανθρώπινη προεκλαμψία, να εντοπίζουν τους προληπτικούς της βιοδείκτες, να υποστηρίζουν βασικές μελέτες για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της ασθένειας και να οδηγούν τελικά σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές, αποτελεί επιτακτική προτεραιότητα.

7.2.2. Στοχευμένες ερευνητικές κατευθύνσεις θεραπευτικής αντιμετώπισης της προεκλαμψίας και των παραλλαγών της

Οι προτεινόμενες ερευνητικές κατευθύνσεις ειδικής ομάδας εμπειρογνομόνων των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των ΗΠΑ για τη βελτιωμένη θεραπευτική αντιμετώπιση της προεκλαμψίας που ανακοινώθηκαν πρόσφατα (231) περιλαμβάνουν μελέτες: παθοφυσιολογίας, ανοσολογικής προέλευσης, τρόπων κατηγοριοποίησης, βιοδεικτών, γενετικής και επιγενετικής, ζωικών μοντέλων, διαχείρισης μεγάλων βάσεων δεδομένων, περιγενετικών συντελεστών παθοφυσιολογίας, κλινικών παραγόντων κίνδυνου, νέων θεραπειών πρόληψης και αντιμετώπισης, μακροχρόνιων καρδιαγγειακών επιπτώσεων και προοπτικών των ασθενών, που συγκλίνουν σε 4 γενικές παραμέτρους: 1. παθοφυσιολογία προεκλαμψίας, 2. μακροχρόνιες επιπτώσεις της προεκλαμψίας στην υγεία, 3. βιοδείκτες και διαγνωστικά εργαλεία και 4. έρευνα για νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

Από Παιδιατρική και Γυναικολογική σκοπιά ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας και του μελλοντικού κίνδυνου προεκλαμψίας έχουν οι έρευνες παρακολούθησης δυάδων, δηλαδή των μητέρων με προεκλαμψία και των απογόνων τους, λόγω του αυξημένου κίνδυνου καρδιαγγειοπαθειών και υπέρτασης που εμφανίζουν αργότερα στη ζωή τους (232, 233). Αυτό που δεν γνωρίζουμε είναι ποιες από αυτές τις δυάδες γυναικών και απογόνων τους θα νοσήσουν μελλοντικά. Μελέτες δυάδων, που να περιλαμβάνουν κλινικά και βιολογικά δεδομένα, θα συνέβαλλαν αποφασιστικά στον εντοπισμό ατόμων με αυξημένο κίνδυνο μελλοντικής ασθένειας, που θα επέτρεπε στοχευμένη πρόληψη, παρακολούθηση και κατανομή κλινικών πόρων. Οι μελέτες δυάδων δεν θα εντοπίζουν μόνο άτομα υψηλού κίνδυνου μελλοντικής νοσηρότητας, αλλά θα ενημερώνουν για την παθογένεια και τους

υποτύπους της προεκλαμψίας. Για παράδειγμα, μελετώντας τις γυναίκες που χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να μειώσουν την αυξημένη αρτηριακή τους πίεση ή την πρωτεϊνουρία ή τα βρέφη με πιο αυξημένες πιέσεις αίματος μπορεί να οδηγηθούμε σε κατάλληλα μονοπάτια παθογένειας και πιθανούς στόχους πρόληψης. Θα μπορούσαν επίσης να διευκρινίσουν διαφορετικούς υπότυπους ασθένειας που να σχετίζονται με μητρικούς, πλακουντιακούς και εμβρυικούς παράγοντες. Η προεκλαμψία που φαίνεται ίδια στην εγκυμοσύνη μπορεί να εμφανίσει διαφορές στις μακροπρόθεσμες συνέπειες της στην υγεία καθώς και στον κίνδυνο επόμενης εγκυμοσύνης. Οι μελέτες δυάδων μπορούν επίσης να δώσουν πληροφορίες στο ερώτημα της ανθεκτικότητας ως προς το γιατί μερικές γυναίκες δεν αναπτύσσουν αργότερα καρδιαγγειοπάθεια CVD.

7.2.3. Σύνδεση Καρδιαγγειοπαθειών και Προεκλαμψίας

Η προεκλαμψία αυξάνει τον άμεσο και το μακροπρόθεσμο καρδιαγγειακό κίνδυνο στις μητέρες και τους απογόνους τους, με σημαντικό αντίκτυπο στην υγεία μητέρας-παιδιού στις Ηνωμένες Πολιτείες και παγκοσμίως (234-237). Υπάρχει γενετική συμβολή στην προεκλαμψία (238, 239) και εκτιμάται ότι γενετικοί παράγοντες της μητέρας αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 35% της διακύμανσης του κινδύνου προεκλαμψίας (240). Καρδιαγγειακή νόσος (CVD), που είναι πλέον γνωστό πως συσχετίζεται με την προεκλαμψία, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως τόσο για άνδρες όσο και για γυναίκες (241) αλλά η επιδημιολογία και η παθοφυσιολογία της διαφέρει στα 2 φύλα (242-245). Γυναίκες με προεκλαμψία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και καρδιαγγειακής θνησιμότητας, και με πρόωρη προεκλαμψία (EOP) μέχρι και 8 φορές υψηλότερο σε σύγκριση με γυναίκες με κανονική εγκυμοσύνη (246, 247). Το 2011, η Αμερικανική Καρδιολογική ένωση αναγνώρισε επίσημα την προεκλαμψία ως κλινικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου στις γυναίκες (244). Ο συσχετισμός μεταξύ προεκλαμψίας και CVD πιθανώς αντανακλά τόσο τους κοινούς παράγοντες κινδύνου όσο και την εμφάνιση καρδιαγγειακού κινδύνου κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης με προεκλαμψία (248). Η προεκλαμψία σχετίζεται με διαστολική δυσλειτουργία (249-252) περιγεννητική καρδιομυοπάθεια (253) και αμφότερα προϋπάρχουσα και μεταγενέστερη καρδιαγγειακή νόσο (254).

Ασυμπτωματική διαστολική δυσλειτουργία και καρδιακή ανεπάρκεια με φυσιολογική διατήρηση του κλάσματος εξώθησης είναι σύνηθες σε γυναίκες και σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας (255).

Οι κλασικές μελέτες σύνδεσης παθογένειας με παραλλαγές γονιδιωμάτων, σχεδιάστηκαν να εντοπίζουν πολυμορφισμούς κλινικής σημασίας υψηλής συχνότητας (>1%) και μέτριας συνεπώς βαρύτητας. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί η διαπίστωση ότι οι υψηλές συχνότητες παραπέμπουν σε μακρινό χρονικό ορίζοντα αρχικής εγκατάστασης, της τάξης των χιλιάδων ετών στο παρελθόν, που προϋποθέτουν παράλληλη παρουσία πολυμορφισμών μετρίασης/εξουδετέρωσης του αρχικού αρνητικού τους δυναμικού ώστε να μετριάζεται η βαρύτητα και η γενικότερη κλινική τους αξία. Μεγάλης βαρύτητας πολυμορφισμοί παθογένειας αναμένεται να έχουν χαμηλή συχνότητα (<0.1%) λόγω αρνητικής επιλογής ή και πρόσφατης εγκατάστασης στο πληθυσμό, η μελέτη των οποίων απαιτεί ανάλυση υπερδεκαπλάσιων τουλάχιστον περιστατικών για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών κλινικών συσχετισμών..

Η αποσαφήνιση των παραπάνω γενικών περιορισμών των κλασικών μελετών ολοκλήρου του γονιδιώματος (256) εξηγεί και τα αντιφατικά ευρήματα ευρείας συσχέτισης όλου του γονιδιώματος με προεκλαμψία (257). Καθώς, όπως ήδη αναφέρθηκε, οι μελέτες ευρείας συσχέτισης γονιδιώματος σχεδιάστηκαν να εντοπίζουν μεταλλάξεις που προέκυψαν χιλιάδες χρόνια πριν, τέτοιες παραλλαγές των αλληλομόρφων γονιδίων έχουν συνήθως μέτριο αντίκτυπο στις μελέτες. Παραλλαγές του γονιδιώματος μεγάλης βαρύτητας που συνδέονται με προεκλαμψία και καρδιομυοπάθεια είναι πιθανόν να έχουν σχετικά χαμηλές συχνότητες στον πληθυσμό λόγω αρνητικής φυσικής επιλογής. Αναγνώριση σπάνιων παραλλαγών του γονιδιώματος που συνδέονται με προεκλαμψία και καρδιομυοπάθεια μπορεί να παρέχουν πληροφορίες για την κλινική ετερογένεια και τις παθοφυσιολογικές διεργασίες και των δύο διαταραχών. Σε πρόσφατη μελέτη της ιδιοπαθούς περιγεννητικής καρδιομυοπάθειας αξιολογήθηκαν οι σπάνιες γονιδιακές παραλλαγές που είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με ιδιοπαθή και κληρονομική διατατική καρδιομυοπάθεια.. Αυτή η μελέτη ανέδειξε κοινές γενετικές συσχετίσεις μεταξύ της περιγεννητικής

καρδιομυοπάθειας και της ιδιοπαθούς καρδιομυοπάθειας που δεν σχετίζεται με την εγκυμοσύνη. Παραλλαγές στο γονίδιο TTN, που κωδικοποιεί τη σαρκομερή πρωτεΐνη τιπίνη, ήταν ιδιαίτερα κοινές. Επιπρόσθετα, στη περιγεννητική καρδιομυοπάθεια ορισμένες παραλλαγές TTN συσχετίζονταν ειδικά με επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας κατά το έτος μετά τον τοκετό.(258)

Η καλύτερη κατανόηση της σχέσης μεταξύ προεκλαμψίας και καρδιακής νόσου μπορεί να έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη παρακολούθηση και φροντίδα των γυναικών τόσο κατά τη κύηση όσο και μετά τη γέννηση και να βελτιώσει τη καρδιαγγειακή υγεία των γυναικών. Η πρόσφατη ταυτοποίηση σπάνιων γονιδιακών παραλλαγών που σχετίζονται με την καρδιομυοπάθεια και παράλληλα εμφανίζονται συχνά στην προεκλαμψία, συμβάλλει στη συσχέτιση της προεκλαμψίας με καρδιακή διαστολική δυσλειτουργία και σε μια μικρότερη ομάδα γυναικών, με καρδιομυοπάθεια (259)

Οι γυναίκες που αναπτύσσουν προεκλαμψία είναι πιο πιθανό να φέρουν πρωτεϊνοτροποποιητικές μεταλλαγές γονιδίων που σχετίζονται με καρδιομυοπάθεια, ιδιαίτερα στο TTN. Οι μεταλλαγές που προάγουν την καρδιομυοπάθεια κυριαρχούν στην προεκλαμψία, την ιδιοπαθή και τη περιγεννητική καρδιομυοπάθεια και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για ένα ευρύ φάσμα καρδιαγγειακών διαταραχών. Η ανίχνευση αυτών των παραλλαγών θα οδηγήσει σε πιο συγκεκριμένη διάγνωση, ταξινόμηση, συμβουλευτική και αντιμετώπιση-διαχείριση των γυναικών σε κίνδυνο.

7.2.4 Διαγνωστικές προοπτικές

Οι κλασικές μελέτες σύνδεσης παθογένειας με παραλλαγές γονιδιωμάτων, σχεδιάστηκαν να εντοπίζουν πολυμορφισμούς κλινικής σημασίας υψηλής συχνότητας (>1%) και μέτριας συνεπώς βαρύτητας. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί η διαπίστωση ότι οι υψηλές συχνότητες πολυμορφισμών παραπέμπουν σε μακρινό χρονικό ορίζοντα αρχικής τους εγκατάστασης, της τάξης των χιλιάδων ετών στο παρελθόν, με την αυξητική τους επικράτηση να προϋποθέτει παράλληλη εμφάνιση πολυμορφισμών εξισορρόπησης του αρχικού αρνητικού τους δυναμικού μετριάζοντας προοπτικά τη βαρύτητα και η γενικότερη κλινική τους αξία. Μεγάλης βαρύτητας πολυμορφισμοί

παθογένειας αναμένεται να έχουν χαμηλή συχνότητα (<0.1%) λόγω αρνητικής επιλογής ή και πρόσφατης εγκατάστασης στο πληθυσμό, η μελέτη των οποίων απαιτεί ανάλυση τετραψήφιου τουλάχιστον αριθμού περιστατικών για την εξαγωγή στατιστικά αξιόπιστων κλινικών συσχετισμών (256, 257)..

Η παρούσα μελέτη εστίασε σε πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας που μέχρι πρόσφατα ενδημούσε η ελονοσία. Όπως είναι γνωστό, το στίγμα που εμφανίζει ιδιότυπη αύξηση συχνότητας σε περιβάλλον ελονοσίας φέρει μεταλλαγές μεγάλης βαρύτητας. Αντίστοιχα και οι μεταλλαγές TLR4 που δρουν υποβοηθητικά ενισχύοντας την επικράτησή του συμμετέχοντας παράλληλα σε υπερτασικές διαταραχές όπως η πρώιμη προεκλαμψία, θα είναι μεγάλης βαρύτητας και υψηλής συχνότητας ώστε διψήφιοι μόλις αριθμοί περιστατικών να επαρκούν για την αξιόπιστη στατιστικά ταυτοποίηση τους (190, 217, 260, 258). Η ταυτοποίηση τέτοιων πολυμορφισμών μεγάλης κλινικής βαρύτητας και υψηλής συχνότητας, θα ήταν εν δυνάμει αξιοποιήσιμη στη διάγνωση, ταξινόμηση, συμβουλευτική και διαχείριση του κινδύνου εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας στη Κεντρική Ελλάδα.

Ανεξάρτητα πάντως από τη μέθοδο εντοπισμού και τα κριτήρια επιλογής πολυμορφισμών μεγάλης κλινικής βαρύτητας και υψηλής συχνότητας και με δεδομένη τη συμμετοχή πολλών γονιδιακών συστημάτων στη διαμόρφωση σύνθετων παθολογικών φαινοτύπων, θα απαιτηθεί η χρήση ενός συστήματος-μοντέλου καταγραφής πολυγονιδιακής βαθμολογίας (polygenic scores) για την ανάδειξη ενός αντιπροσωπευτικού μίγματος διαγνωστικών βιοδεικτών πρώιμης προεκλαμψίας παγκόσμιας εμβέλειας (261, 259).

Κεφάλαιο 8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Αξιολογήθηκε η σχέση των κοινών πολυμορφισμών του υποδοχέα Toll 4 (TLR4), που είναι γνωστό ότι εξασθενούν την ανοσοφλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού σε πλήθος εξωγενών και ενδογενών παθογενετικών παραγόντων, με τον κίνδυνο εκδήλωσης πρώιμης προεκλαμψίας στην Κεντρική Ελλάδα.

- Συγκρίθηκαν κοινοί πολυμορφισμοί των αλληλομόρφων TLR4 σε 84 γυναίκες με πρώιμη προεκλαμψία και 94 γυναίκες αντίστοιχου ηλικιακού εύρους με φυσιολογικές εγκυμοσύνες και καταγράφηκαν οι συσχετισμοί μεταξύ των 2 ομάδων.

- Τα ευρήματα υποστηρίζουν:

α. τη συμμετοχή της εγγενούς ανοσίας της μητέρας σε σοβαρές υπερτασικές διαταραχές της εγκυμοσύνης και

β. την πιθανή αξία των πολυμορφισμών TLR4 της μητέρας ως αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες καθώς και δείκτες επικινδυνότητας για εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας στο γυναικείο πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας.

Ειδικότερα φαίνεται ότι στην κεντρική Ελλάδα:

1. η εγγενής ανοσία της μητέρας μπορεί να συμμετέχει στην εκδήλωση πρώιμης προεκλαμψίας (EOP, early-onset preeclampsia)
2. η αλλοίωση της ανοσοφλεγμονώδους αντίδρασης της μητέρας μπορεί να προκαλέσει EOP
3. οι μεταλλαγές του υποδοχέα toll-like 4 (TLR4) εξασθενούν την ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση σε εξωγενή και ενδογενή παθογενο-εξαρτώμενη πρόκληση και αν οι φορείς μεταλλαγών TLR4 προσβληθούν από κάποιο δεύτερο χτύπημα στην εγκυμοσύνη μπορεί να εκδηλώσουν EOP.
4. οι κοινοί γονιδιακοί πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thre399Ile του υποδοχέα TLR4 προσδίδουν ευαισθησία στην εκδήλωση EOP
5. Ο αναπροσαρμοσμένος κίνδυνος εκδήλωσης EOP των φορέων του αλληλόμορφου Asp299Gly του υποδοχέα TLR4 είναι 2,94
6. Ο αναπροσαρμοσμένος κίνδυνος εκδήλωσης EOP των φορέων του αλληλόμορφου Thre399Ile του υποδοχέα TLR4 είναι 3,52

Κεφάλαιο 9: Σύνοψη Διατριβής

Η προεκλαμψία και η πρώιμη μορφή της (EOP) είναι σύνθετες πλακουντιακής προέλευσης και άγνωστης αιτιολογίας πολυπαραγοντικές υπερτασικές παθήσεις της εγκυμοσύνης με σοβαρές συνέπειες για το ζεύγος μητέρας παιδιού αλλά και για την μετέπειτα υγεία των ζώντων απογόνων που γεννήθηκαν από μητέρες με EOP. Η πρόληψη EOP σε συνδυασμό με προσυμπτωματικό έλεγχο, είναι ο κύριος ενδεδειγμένα αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης του μείζονος αυτού προβλήματος. Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί κλινικής σημασίας είναι το κυριότερο εργαλείο κλινικής πρόληψης. Συγκριτικά με το εκτιμώμενα μεγάλο πλήθος γονιδιακών συντελεστών που αναμένεται να συμμετέχουν στην εκδήλωση πολυπαραγοντικής EOP, τα εμπλεκόμενα ομοιοστατικά βιολογικά συστήματα είναι σημαντικά λιγότερα. Μεταξύ δε αυτών, το σύστημα της εγγενούς ανοσίας έχει δεσπόζουσα θέση καθώς ελέγχει την ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού, η εξασθενημένη απόκριση της οποίας μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση σοβαρών υπερτασικών παθήσεων της εγκυμοσύνης όπως η EOP.

Στη βάση της εγγενούς ανοσίας βρίσκονται οι υποδοχείς Toll που αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα αντιγονικότητας σε ευρύ φάσμα συντελεστών παθογένειας. Ειδικότερα, ο υποδοχέας TLR4 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθόσον εκκινεί την ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση σε απόκριση κοινών απειλών εξωγενούς προέλευσης, όπως gram(-) βακτηρίων, ιών, μυκήτων, αλλά και ενδογενούς προέλευσης, όπως η υψηλής κινητικότητας-1 (HMGB1) πρωτεΐνη alarmin που εκκρίνουν τα αποθνήσκοντα καρκινικά κύτταρα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (217). Ιδιαίτερου κλινικού ενδιαφέροντος είναι και οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του υποδοχέα TLR4 που εξασθενούν την ανοσοφλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού σε απόκριση εξω- και ενδογενών παθογενών απειλών καθώς σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας της παρούσας μελέτης, οι γυναίκες φορείς των πολυμορφισμών αν προκληθούν κατά την εγκυμοσύνη θα εκδήλωναν EOP.

Η παραπάνω υπόθεση εργασίας επιβεβαιώθηκε από τα πιλοτικά ευρήματα της παρούσας μελέτης. Καταγράφηκε ποσοστό φορέων πολυμορφισμών TLR4 στην ομάδα γυναικών με EOP 19%, που προφανώς εκδήλωσαν EOP μετά από παθογενή

πρόκληση, με το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου 6.4%, που προφανώς δεν προκλήθηκαν να εκδηλώσουν ΕΟΡ και τριπλάσιος κίνδυνος εκδήλωσης ΕΟΡ σε γυναίκες φορείς των πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του υποδοχέα TLR4 συγκριτικά με τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Οι πολυμορφικοί δείκτες που διερευνήθηκαν καλύπτουν προγνωστικά το 19% των περιστατικών ΕΟΡ στην κεντρική Ελλάδα. Θα πρέπει συνεπώς να εμπλουτισθούν και με επιπλέον πολυμορφικούς δείκτες προκειμένου να ενισχυθεί η προγνωστική τους αξία σε τοπικό επίπεδο.

Η μελέτη διενεργήθηκε στο τριτοβάθμιο κέντρο παροχής υπηρεσιών υγείας, που καλύπτει πληθυσμό με μέση ποιότητα ζωής στη Κεντρική Ελλάδα. Περαιτέρω ενσωμάτωση της συμμετοχής κοινών προστατευτικών αλλά και επιβαρυντικών παραγόντων όπως, στίγμα, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, χρήση φαρμάκων, μεσογειακή διατροφή και ποιότητα ζωής γενικότερα στην εκδήλωση ΕΟΡ, θα ενίσχυε τη προγνωστική αξία των πολυμορφισμών TLR4 και θα συνέβαλε στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των υπέρτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης στη Κεντρική Ελλάδα.

Βιβλιογραφία

1. Grill, S, et al. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:70
2. ACOG Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obst & Gynecol* 2013;122:1122-1131
3. Uzan, J., et al. *Vasc Health Risk Manag* 2011;7:467-74
4. Dolea, G.B.P. (2000) WHO
5. NICE guidelines. Hypertension in pregnancy. January (2011);
6. Wagner, L. *Am Fam Physician* 2004;70:2317-2324 AAFP guidelines;
7. Pre-eclampsia Day Assessment Unit Guideline for midwives and PRECOG: The Preeclampsia Community Guideline (2009);
8. Chaiworapongsa, T., et al. *Nat Rev Nephrol* 2014;
9. Verlohren S et al. *Clin Sci* 2012; 122(2):43-52, 2. Perni U et al. *Hypertension* 2012; 59:740-6, 3.Garovic VD. *Hypertension* 2012;59:555-7
10. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005;46:1077–1085
11. PLoS One. 2014; 9(11): e112890. Published online 2014 Nov 13. Protein Profiling of Preeclampsia Placental Tissues Chang Shu, 1Emanuele Buratti, Editor
12. Alice Wang, Sarosh Rana, S. Ananth Karumanchi. Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *Physiology* Published 1 June 2009 Vol. 24 no. 3, 147-158
13. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int* 2007;71:959–961
14. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187–191
15. van Rijn BB, Franx A, Steegers EAP, de Groot CJM, Bertina RM, et al. Maternal TLR4 and NOD2 Gene Variants, Pro-Inflammatory Phenotype and Susceptibility to Early-Onset Preeclampsia and HELLP Syndrome. *PLoS ONE*. 2008; 3(4): e1865. doi:10.1371/journal.pone.0001865

16. Attila MOLVAREC, Ágnes JERMENDY, Margit KOVÁCS, Zoltán PROHÁSZKA, János RIGÓ. Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms and Preeclampsia: Lack of Association in a Caucasian Population. *Hypertens Res* 2008; 31: 859–864.
17. Wu CS, Nohr EA, Bech BH, et al. Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201:269.e1-10
18. Byberg KK, Øymar K, Eide GE, Forman MR, JuÅlõÅusson PB. Exposure to preeclampsia in utero affects growth from birth to late childhood dependent on child's sex and severity of exposure: Follow-up of a nested case-control study. *PLoS ONE* 2017;12(5)
19. Ana P. Boucas, Bianca M. de Souza, Andrea C. Bauer and Daisy Crispim. Role of Innate Immunity in Preeclampsia: A Systematic Review. *Reproductive Sciences*, 2017;24(10):1362-1370
20. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014;4(2):97-104.
21. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308:1592–1594.
22. Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P, Cardew S, Côté AM et al. Diagnosis, evaluation and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30(Suppl 1):S1–S48.
23. Fang Xie, Yuxiang Hu, David P. Speert, Stuart E. Turvey, Gang Peng, Deborah M. Money, Laura A. Magee, and Peter von Dadelszen. Toll-like Receptor Gene Polymorphisms and Preeclampsia Risk: A Case-Control Study and Data Synthesis *Hypertension in Pregnancy*. 2010;29:390–8
24. Rigo J, Szendei G, Rosta K, et al: Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:521–525.
25. Molvarec A, Ver A, Fekete A, et al: Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens Res*. 2007;30: 205–211.
26. Maruyama A, Nakayama T, Sato N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene for preeclampsia. *Hypertens Res*. 2004;27:903–909.

27. Ohkuchi A, Iwasaki R, Suzuki H, et al: Normal and highnormal blood pressures, but not body mass index, are risk factors for the subsequent occurrence of both preeclampsia and gestational hypertension: a retrospective cohort study. *Hypertens Res.* 2006;29:161–167.
28. Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, et al: Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia. *Hypertens Res.* 2007;30:151–159.
29. McMaster MT, Bass KE, Fisher SJ. Human trophoblast invasion. Autocrine control and paracrine modulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;734:122–131.
30. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):309-316.
31. Terrone DA, Rinehart BK, May WL, Moore A, Magann EF, et al. Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia. *South Med J* 2000;93:768–771.
32. 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;171:158–164.
33. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929–979.
34. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre´ F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G & Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine.* 2007;13:1050–1059.
35. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Molecular Medicine.* 2008;14:346–352. (doi:10.2119/2007-00135.Ferwerda)
36. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Ru´a C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS.* 2007;104:16645–16650. (doi:10.1073/pnas.07048 28104)

37. Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med.* 2001;29:S2–6; discussion S6–7.
38. Crider KS, Whitehead N, Buus RM. Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review. *Genet Med.* 2005;7:593–604.
39. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med.* 2002;347:185–192.
40. Lindheimer et al. The History of Preeclampsia and Eclampsia as Seen by a Nephrologist. *Seminar on History.* 2012
41. Lambert et al. Preeclampsia:an update.*Acta Anaesth.Belg.* 2014;65,137-9
42. Khan et al. WHO analysis of causes of maternal death: A systematic review. *Lancet* 2006;367:1066–1074.
43. Mahmoudi et al. Eclampsia:A 13-year experience at a United States tertiary care center. *J Womens Health Gender Based Med.* 1999;8:495-500.
44. Roberts et al. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 2001;357:53-56.
45. Roberts et al. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002;23:359-372.
46. Maynard et al. Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011;31(1): 33–46.
47. Cantwell et al. Saving Mothers' Lives : Reviewing maternal deaths to make motherhood safer:2006-2008. The Eighth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. *BJOG*, 2011;118 Suppl 1:1-203.
48. von Dadelszen et al. Subclassification of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy.* 2003;22(2):143-148.
49. Lisonkova et al. Incidence of pre-eclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2013
50. Park et al. Combined Screening for Early Detection of Pre-Eclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:17952-17974.
51. Xie et al. CMV Infection, TLR-2 and -4 Expression, and Cytokine Profiles in Early-Onset Preeclampsia with HELLP syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(4): 379–386.

52. Sibai. Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near-term) births. *Semin Perinatol.* 2006;30:16–19.
53. Sargent et al. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006;13:680–686.
54. Jadli et al. Promising prognostic markers of Preeclampsia: New avenues in waiting. *Thrombosis Research* 2015;136:189–195.
55. Redman et al. Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010;63: 534–543.
56. Dekker et al. The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J. Reprod. Immunol.* 2011;89:126–132.
57. Cetin et al. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta* 2011;32(Suppl. 1):4-16.
58. von Dadelszen et al. Activated protein C in normal human pregnancy and pregnancies complicated by severe preeclampsia: a therapeutic opportunity? *Crit Care Med.* 2002;30:1883–1892.
59. Khong et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049–1059.
60. Franzas et al. Hydatidiform mole and pre-eclampsia. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae.* 1958;47(81):11-16.
61. Redman et al. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:499–506.
62. Sacks et al. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* 1999;20:114-8.
63. Brosens et al. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J. Pathol. Bacteriol.* 1967;93:569–579.
64. Gerretsen et al. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *BJOG* 1981;88:876–881.
65. Pijnenborg et al. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006;27(9-10):939-958.
66. Valenzuela et al. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *Journal of Pregnancy.* 2012

67. Roberts et al. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*. 2012;2:72–83.
68. Burton et al. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):303–312.
69. Rodesch et al. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 1992;80(2):283–285.
70. Genbacev et al. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277(5332):1669–1672.
71. Zhou et al. Oxygen regulates for endovascular invasion in normal pregnancy and in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 1998;39(1-2):197–213.
72. Cindrova-Davies et al. Nuclear factor- κ B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am. J. Pathol*. 2007;170:1511–1520.
73. Burton et al. Oxidative stress. *Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2011;25:287–299.
74. Ness et al. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1996;175(5):1365–1370.
75. Barden et al. Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension* 2001;38:803–808.
76. Vaughan et al. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*. 2002;21:205–223.
77. Zhang et al. From endoplasmic reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454:455–462.
78. Burton et al. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):43–48.
79. Redman et al. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol*. 2007;76:61–67.

80. Lian et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*. 2011;32:823–829.
81. Roberts. Endothelial dysfunction in preclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16:5–15.
82. Roberts et al. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Obstet Gynecol*. 1989;161:1200-1204.
83. Ferrara et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439–442.
84. Torry et al. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1998;179:1539–1544.
85. Maynard et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest*. 2003;111:649–658.
86. Levine et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(7):672–683.
87. Maharaj et al. VEGF and TGF- β are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(2):491–501.
88. Dvorak. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(21):4368–4380.
89. Autiero et al. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(7):1356–1370.
90. Kendall et al. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;226(2):324–328.
91. Vitoratos et al. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Journal of Pregnancy*. 2012
92. Rajakumar et al. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* 2005;26: 563–573.

93. Venkatesha et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 2006;12:642–649.
94. Mutter et al. Molecular mechanisms of pre-eclampsia. *Microvasc.Res.* 2005;75:1-8.
95. Levine et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre-eclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:992–1005.
96. Gant et al. The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 1974;43.
97. Dechend et al. *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy.* Elsevier. 2009;287–296.
98. Wallukat et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J. Clin. Invest.* 1999;103:945–952.
99. Xia et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. *Circ. Res.* 2013;113:78–87.
100. Parrish et al. The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *Am. J. Hypertens.* 2010;23:911–916.
101. Moffett et al. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta* 2008;25:1–8.
102. Abrahams et al. Role for TLRs in the Regulation of Immune Cell Migration by First Trimester Trophoblast Cells. *The Journal of Immunology.* 2005;175:8096-8104
103. Koga et al. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J ObstetGynaecol Res.* 2009;35:191-202.
104. Redman et al. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol.* 2004;24:565–570.
105. Mellembakken et al. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension.* 2001;38:394–398.
106. Lau et al. Tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013;70:412–427.
107. McCarthy et al. Animal models of preeclampsia: uses and limitations. *Placenta.* 2011;32:413–419.

108. Dhillon et al. IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol.* 2012;303:53-58.
109. Sado et al. Inflammatory pattern recognition receptors and their ligands: factors contributing to the pathogenesis of preeclampsia. *Inflamm. Res.* 2011;60:509–520.
110. Haram et al. Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. *Journal of Pregnancy.* 2014
111. Harrington et al. Early screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2011;37:623–624.
112. Laresgoiti-Servitje et al. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Leukoc. Biol.* 2013;94:247–257.
113. Van de Merwe et al. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease—what does the placenta reveal? *Hypertens. Pregnancy* 2010;29:457–467
114. Rana et al. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63:198-202.
115. Park et al. Screening models using multiple markers for early detection of late-onset pre-eclampsia in low-risk pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014
116. Engels et al. Automated measurement of sFlt1, PIGF and sFlt1/PIGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. *Hypertens Pregnancy.* 2013;32:459-473.
117. Leañós-Miranda et al. Circulating Angiogenic Factors and Urinary Prolactin as Predictors of Adverse Outcomes in Women With Preeclampsia. *Hypertension.* 2013;61:1118-1125.
118. Sachan et al. Diagnostic and prognostic significance of serum soluble endoglin levels in preeclampsia and eclampsia. *Adv Biomed Res.* 2016;5
119. Thissier-Levy et al. Endostatin levels and the risk of subsequent preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2013;170: 396–400.
120. Wu et al. Corin: new insights into the natriuretic peptide system. *Kidney International.* 2009;75(2):142–146.
121. Zhou et al. Corin, atrial natriuretic peptide and hypertension. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:1071–1073.

122. Khalil et al. Longitudinal changes in maternal corin and mid-regional proatrial natriuretic peptide in women at risk of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:190–198.
123. Cui et al. Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature.* 2012;484:246–250.
124. Liu et al. Increased serum soluble corin in mid pregnancy is associated with hypertensive disorders of pregnancy. *J Womens Health (Larchmt).* 2015;24:572-577.
125. Martin et al. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenatal Diagnosis.* 2014;34:685–691.
126. Centlow et al. Placental expression profiling in pre-eclampsia: Local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertil. Steril.* 2008;90:1834–1843.
127. Olsson et al. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger $\alpha(1)$ -microglobulin in pre-eclampsia. *Free Radic. Biol. Med.* 2010;48:284–291.
128. Anderson et al. Fetal hemoglobin and $\alpha 1$ -microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for pre-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011;204:521-525.
129. Anderson et al. The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin is overwhelmed during pre-eclampsia-New biomarkers and potential targets for therapy. *Pregnancy Hypertens.* 2015;5.
130. Anderson et al. Free fetal hemoglobin and hemoglobin-scavenging proteins are predictive first and second trimester biochemical markers for pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2015;5.
131. Lawrence et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96:3149–3153.
132. Yliniemi et al. Combination of PAPP_A, fhCG β , AFP, PIGF, sTNFR1, and Maternal Characteristics in Prediction of Early-onset Reproductive Health. 2015;9:13–20.
133. Santillan et al. Vasopressin in Preeclampsia: A Novel Very-Early Human Pregnancy Biomarker and Clinically-Relevant Mouse Model. *Hypertension* 2014;64(4):852–859.
134. Dobša et al. Copeptin and its potential role in diagnosis and prognosis of various diseases. *Biochemia Medica.* 2013;23(2):172-192.

135. Zulfikaroglu et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in preeclampsia. *The journal of obstetrics&gynaecology research* 2011;37:1198-02
136. Foda et al. Maternal and neonatal copeptin levels at cesarean section and vaginal delivery. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2012;165:215-218.
137. Than et al. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106: 9731–9736.
138. De Muro et al. Plasma PP13 and urinary GAGs/PGs as early markers of pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2016.
139. Huppertz. Placental origins of pre-eclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008;51:970-975.
140. Huppertz et al. Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of pre-eclampsia. *Fetal Diagn. Ther.* 2008;24:230–236.
141. Gonen et al. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: A prospective longitudinal study. *BJOG.* 2008;115:1465–1472.
142. Than et al. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin.* 2008;453(4):387-400.
143. Grubb et al. Cystatin C-Properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 2000;35:63–99.
144. Kristensen et al. Increased cystatin C expression in the pre-eclamptic . *Mol. Hum. Reprod.* 2007;13:189–195.
145. Kolialexi et al. Validation of serum biomarkers derived from proteomic analysis for the early screening of preeclampsia. *Dis Markers.* 2015
146. Čabarkapa et al. CYSTATIN C - MORE THAN THE MARKER OF THE GLOMERULAR FILTRATION RATE. *Med Pregl.* 2015;68:173-179.
147. Lopez-Hernandez et al. Nested case-control study reveals increased levels of urinary proteins from human kidney toxicity panels in women predicted to develop preeclampsia. *Int Urol Nephrol.* 2016

148. Ventura et al. Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;169:28-32.
149. Gilad et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008;3.
150. Jairajpuri et al. MicroRNA expression pattern in pre-eclampsia (Review). *Molecular Medicine Reports.* 2016
151. Enquobahrie et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204:12-21.
152. Zhao et al. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem.* 2013;46:953–960.
153. Thornton et al. Twin mothers, pregnancy hypertension and preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1999;106:570–575.
154. Roberts et al. Preeclampsia: What We Know and What We Do Not Know. *Seminars in Perinatology.* 2000;24(1):24-28.
155. Powers et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate and susceptibility to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 1999;6:74-79.
156. Fraser et al. Interleukin-4 2590 (C>T), toll-like receptor-2 +2258 (G>A) and matrix metalloproteinase-9 -1562 (C>T) polymorphisms in pre-eclampsia. *BJOG.* 2008;1052–1056.
157. Huang et al. Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol.* 1997;34:577–582.
158. Masoumi et al. Relationship between Fas and Fas Ligand gene polymorphisms and pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2016
159. Mello et al. Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension.* 2003;41(4):932–937.
160. Johnson et al. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Human Genetics.* 2009;126(5):655–666
161. Roten et al. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *European Journal of Human Genetics.* 2009;17(2):250–257.
162. Zusterzeel et al. A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with preeclampsia. *J Med Genet.* 2001;38:234-7

163. Anim-Nyame et al. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Hum. Reprod.* 2000;15:2033–2036
164. Henson et al. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstetrics and Gynecology.* 1998;92:1020–1028.
165. Muy-Rivera et al. Leptin, soluble leptin receptor and leptin gene polymorphism in relation to preeclampsia risk. *Physiological Research.* 2005;54:167–174.
166. Abrahams et al. Toll-like Receptors and their Role in the Trophoblast. *Placenta.* 2005;26:540-547.
167. Kumazaki et al. Immunohistochemical Distribution of Toll-Like Receptor 4 in Term and Preterm Human Placentas From Normal and Complicated Pregnancy Including Chorioamnionitis. *HUMAN PATHOLOGY.* 2004;35.
168. Kawai et al. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009;21:317–337.
169. Μαυρούλη & συν. Ο ρόλος των Toll-like υποδοχέων στη φυσική ανοσία. *Ελληνική Μικροβιολογική και Υγιεινολογική Ένωση.* 2014;59, Τεύχος 4.
170. Medzhitov et al. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91:295 - 298.
171. Bowie et al. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000;67(4):508-514.
172. O'Neill et al. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;226:10–18.
173. Riley et al. Toll-like Receptors in Pregnancy Disorders and Placental Dysfunction. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2010;39:185–193.
174. Mogensen. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:240-273.
175. Amirchaghmaghi et al. The Role of Toll Like Receptors in Pregnancy. *Int J Fertil Steril.* 2013;7(3):147-154.
176. Koga et al. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy & pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72:192–205
177. Akira et al. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 2003;187(Suppl 2):356–363

178. Yamamoto et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301:640–643.
179. Takeuchi et al. Cutting edge:TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection.*J Immunol*. 2000;165:5392-5396
180. Rock et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2):588–593.
181. Ogus et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*. 2004;23:219-223.
182. Lorenz et al. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection *Infect Immun*. 2000;68:6398-6401
183. Bochud et al. Cutting edge: a toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol*. 2003;170:3451-3454.
184. Rehli. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*. 2002;23:375–378.
185. Hoshino et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR-4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR-4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999;162:3749-3752.
186. Dembic. The Function of Toll-Like Receptors. Στο Madame Curie Bioscience Database. 2013
187. Lorenz et al. Relevance of Mutations in the TLR4 Receptor in Patients With Gram-Negative Septic Shock. *Arch Intern Med*. 2002;162(9):1028-1032.
188. Rallabhandi et al. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4 /MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol*. 2006;177:322–332
189. Kiechl et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347:185–192.
190. Manolakis et al. Readressing the role of Toll-like receptor-4 alleles in inflammatory bowel disease: colitis, smoking, and seroreactivity. *Dig Dis Sci*. 2013;58:371-380.
191. Chatterjee et al. Activation Contributes to Preeclampsia in Humans and Mice. *PLoS ONE*. 2012;7(7).
192. Cindrova-Davies et al. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol*. 2007;171:1168-1179.

193. Koga et al. Toll-Like Receptors at the Maternal–Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:587-600.
194. Dabagh-Gorjan et al. Differences in the Expression of TLRs and Inflammatory Cytokines in Pre-Eclamptic Compared with Healthy Pregnant Women. *Iran J Immunol.* 2014;11:233-245.
195. Kim et al. Toll-like receptor 4: a potential link between ‘danger signals,’ the innate immune system and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005;921–27.
196. Wang et al. Placental vascular disease and toll-like receptor 4 gene expression. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005;192:961–966.
197. Pineda et al. Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 Is Increased in Placentas from Patients with Preeclampsia. *Archives of Medical Research* 2011;42:382e391.
198. Ishihara et al. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:158-166.
199. Kregel. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 2002;92:2177-2186.
200. Nakada et al. Toll-like receptor-3 stimulation upregulates sFLT-1 production by trophoblast cells. *Placenta.* 2009;30:774–779.
201. Gonzalez et al. Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197.
202. Xie et al. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG.* 2010;117:99–108.
203. Krediet et al. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res.* 2007;62(4):474-476.
204. Abrahams et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol.* 2004;173(7):4286-4296.
205. Kakinuma et al. Trophoblastic apoptosis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor. *Obstet Gynecol.* 1997;90:117-124
206. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement

- from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy*. 2001;20: IX–XIV.
207. Vandembosche, Robert C.; Kirchner, Jeffrey T. "Intrauterine Growth Retardation". *American Family Physician*. 1998;56 (6):1384–1390.
208. Birnboim et al. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-1523.
209. Matson. *Microarray Methods and Protocols*. Florida: Boca Raton. 2008
210. Kumar. *Genetic Engineering*. New York: Nova Science Publishers. 2006
211. Mullis et al. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.
212. Σάτρα. *Εργαστηριακός Οδηγός: Διαγνωστική Μεθοδολογία Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας*. Λάρισα: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. 2015
213. Sanger et al. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol*. 1975;94 (3):441–448.
214. Sanger et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1977;74 (12):5463–5467.
215. Lodish et al. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company. 2001
216. Smith et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321:674–679.
217. Manolakis A N, Kapsoritakis E K, Tiaka A, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M, Vamvakopoulou D, Tsiopoulos F, Papanas N, Skoularigis I, S P Potamianos S P and Vamvakopoulos N. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. *European Journal of Endocrinology*. 2011;165:261–267
218. Beutler et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:353–389.
219. Franchim et al. Inflammatory Mediators Gene Polymorphisms in Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2011;30:338–346.
220. Kim JJ & Sears DD. TLR4 and insulin resistance. *Gastroenterology Research and Practice*. 2010; 2010:139–149. (doi:10.1155/2010/ 212563)

221. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Molecular Medicine*. 2008;14:346–352. (doi:10.2119/2007-00135.Ferwerda)
222. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Ru'a C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW & Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS*. 2007;104:16645–16650. (doi:10.1073/pnas.07048 28104)
223. Samara M, Chiotoglou I, Kalamaras A, Likousi S, Chassanidis C, Vagena A, Vagenas C, Eftichiadis E, Vamvakopoulos N, Patrinos GP & Kollia P. Large scale-population genetic analysis for hemoglobinopathies reveals different mutation spectra in Central Greece compared to the rest of the country. *American Journal of Hematology*. 2007;82:634–636. (doi:10.1002/ajh.20889)
224. Roberts JM. The perplexing pregnancy disorder preeclampsia: what next? *Physiol Genomics*. 2018;50:459–467. doi: 10.1152/physiolgenomics.00017.2018
225. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33:130–137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010
226. Shih T, Peneva D, Xu X, Sutton A, Triche E, Ehrenkranz RA, Paidas M, Stevens W. The rising burden of preeclampsia in the United States impacts both maternal and child health. *Am J Perinatol*. 2016;33:329–338. doi: 10.1055/s-0035-1564881
227. Cain MA, Salemi JL, Tanner JP, Kirby RS, Salihu HM, Louis JM. Pregnancy as a window to future health: maternal placental syndromes and short-term cardiovascular outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:484. e1–484.e14. doi: 10.1016/j.ajog.2016.05.047
228. Davis EF, Newton L, Lewandowski AJ, Lazdam M, Kelly BA, Kyriakou T, Leeson P. Pre-eclampsia and offspring cardiovascular health: mechanistic insights from experimental studies. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123:53–72. doi: 10.1042/CS20110627
229. Sutton ALM, Harper LM, Tita ATN. Hypertensive disorders in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018;45:333–347. doi: 10.1016/j.ogc.2018.01.012
230. Sharma KJ, Kilpatrick SJ. Postpartum hypertension: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol Surv*. 2017;72:248–252. doi: 10.1097/OGX.0000000000000424

231. Christine Maric-Bilkan, Vikki M. Abrahams, S. Sonia Arteaga, Ghada Bourjeily, Kirk P. Conrad, Janet M. Catov, Maged M. Costantine, Brian Cox, Vesna Garovic, Eric M. George, Alison D. Gernand, Arun Jeyabalan, S. Ananth Karumanchi, Aaron D. Laposky, Menachem Miodovnik, Megan Mitchell, Victoria L. Pemberton, Uma M. Reddy, Mark K. Santillan, Eleni Tsigas, Kent L.R. Thornburg, Kenneth Ward, Leslie Myatt, James M. Roberts. Research Recommendations From the National Institutes of Health Workshop on Predicting, Preventing, and Treating Preeclampsia. (*Hypertension*. 2019;73:757-766. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11644.)
232. Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2014;101:579–586. doi: 10.1093/cvr/cvu018
233. Pinheiro TV, Brunetto S, Ramos JG, Bernardi JR, Goldani MZ. Hypertensive disorders during pregnancy and health outcomes in the offspring: a systematic review. *J Dev Orig Health Dis*. 2016;7:391–407. doi: 10.1017/S2040174416000209
234. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33:130–137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010
235. Creanga AA, Berg CJ, Ko JY, Farr SL, Tong VT, Bruce FC, Callaghan WM. Maternal mortality and morbidity in the United States: where are we now? *J Womens Health*. 2014;23:3–9. doi: 10.1089/jwh.2013.4617
236. Hirst JE, Villar J, Victora CG, Papageorgiou AT, Finkton D, Barros FC, Gravett MG, Giuliani F, Purwar M, Frederick IO, Pang R, Cheikh Ismail L, Lambert A, Stones W, Jaffer YA, Altman DG, Noble JA, Ohuma EO, Kennedy SH, Bhutta ZA; International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st). The antepartum stillbirth syndrome: risk factors and pregnancy conditions identified from the INTERGROWTH-21st Project. *BJOG*. 2018;125:1145–1153. doi: 10.1111/1471-0528.14463
237. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Barry MJ, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW Jr, Kemper AR, Krist AH, Kurth AE, Landefeld CS, Mangione CM, Phillips WR, Phipps MG, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW; US Preventive Services Task Force. Screening for preeclampsia: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA*. 2017;317:1661–1667. doi: 10.1001/jama.2017.3439
238. Fong FM, Sahemey MK, Hamed G, Eyitayo R, Yates D, Kuan V, Thangaratinam S, Walton RT. Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2014;180:335–345. doi: 10.1093/aje/kwu151

239. Triche EW, Uzun A, DeWan AT, Kurihara I, Liu J, Occhiogrosso R, Shen B, Parker J, Padbury JF. Bioinformatic approach to the genetics of preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2014;123:1155–1161. doi: 10.1097/AOG.0000000000000293
240. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med. Genet A.* 2004;130A:365–371. doi: 10.1002/ajmg.a.30257
241. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, NeuDownloaded from <http://ahajournals.org> by on September 7, 2019 Gammill et al Shared Genes in Preeclampsia and Cardiomyopathy 2366 November 20, 2018 *Circulation.* 2018;138:2359–2366. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031527 ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
242. mar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135:e146–e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485
243. Lawton JS. Sex and gender differences in coronary artery disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;23:126–130. doi: 10.1053/j.semctvs.2011.07.006
244. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, Newby LK, Piña IL, Roger VL, Shaw LJ, Zhao D, Beckie TM, Bushnell C, D'Armiento J, Kris-Etherton PM, Fang J, Ganiats TG, Gomes AS, Gracia CR, Haan CK, Jackson EA, Judelson DR, Kelepouris E, Lavie CJ, Moore A, Nussmeier NA, Ofili E, Oparil S, Ouyang P, Pinn VW, Sherif K, Smith SC Jr, Sopko G, Chandra-Strobos N, Urbina EM, Vaccarino V, Wenger NK. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123:1243–1262. doi:10.1161/CIR.0b013e31820faaf8
245. Bairey Merz CN, Shaw LJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Pepine CJ, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G; WISE Investigators. Insights from the NHLBI-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: part II: gender differences in presentation, diagnosis, and outcome with regard to gender-based pathophysiology of

- atherosclerosis and macrovascular and microvascular coronary disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(3 suppl):S21– S29. doi: 10.1016/j.jacc.2004.12.084
246. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 2001;323:1213–1217. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7323.1213>
247. Riise HKR, Sulo G, Tell GS, Igland J, Nygård O, Vollset SE, Iversen A-C, Austgulen R, Daltveit AK. Incident coronary heart disease after preeclampsia: role of reduced fetal growth, preterm delivery, and parity. *J Am Heart Assoc.* 2017;6:e004158. DOI: 10.1161/JAHA.116.004158
248. Romundstad PR, Magnussen EB, Smith GD, Vatten LJ. Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: common antecedents? *Circulation.* 2010;122:579–584. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943407
249. Alma LJ, Bokslag A, Maas AHEM, Franx A, Paulus WJ, de Groot CJM. Shared biomarkers between female diastolic heart failure and pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *ESC Heart Fail.* 2017;4:88–98. doi: 10.1002/ehf2.12129
250. Melchiorre K, Sutherland GR, Liberati M, Thilaganathan B. Preeclampsia is associated with persistent postpartum cardiovascular impairment. *Hypertension.* 2011;58:709–715. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.176537
251. Melchiorre K, Sutherland GR, Baltabaeva A, Liberati M, Thilaganathan B. Maternal cardiac dysfunction and remodeling in women with preeclampsia at term. *Hypertension.* 2011;57:85–93. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162321
252. Guirguis GF, Aziz MM, Boccia Liang C, Williams SF, Apuzzio JJ, Bilinski R, Mornan AJ, Shah LP. Is preeclampsia an independent predictor of diastolic dysfunction? A retrospective cohort study. *Pregnancy Hypertens.* 2015;5:359–361. doi: 10.1016/j.preghy.2015.10.001
253. Bello N, Rendon ISH, Arany Z. The relationship between pre-eclampsia and peripartum cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:1715–1723. doi: 10.1016/j.jacc.2013.08.717
254. Behrens I, Basit S, Lykke JA, Ranthe MF, Wohlfahrt J, Bundgaard H, Melbye M, Boyd HA. Association between hypertensive disorders of pregnancy and later risk of cardiomyopathy. *JAMA.* 2016;315:1026–1033. doi: 10.1001/jama.2016.1869
255. Udelson JE. Heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 2011;124:e540–e543. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.071696

256. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet.* 2012;90:7–24. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.11.029
257. Williams PJ, Broughton Pipkin F. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25:405–417. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011.02.007
258. Ware JS, Li J, Mazaika E, Yasso CM, DeSouza T, Cappola TP, Tsai EJ, Hilfiker-Kleiner D, Kamiya CA, Mazzarotto F, Cook SA, Halder I, Prasad SK, Pisarcik J, Hanley-Yanez K, Alharethi R, Damp J, Hsich E, Elkayam U, Sheppard R, Kealey A, Alexis J, Ramani G, Safirstein J, Boehmer J, Pauly DF, Wittstein IS, Thohan V, Zucker MJ, Liu P, Gorcsan J III, McNamara DM, Seidman CE, Seidman JG, Arany Z; IMAC-2 and IPAC Investigators. Shared genetic predisposition in peripartum and dilated cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 2016;374:233–241. doi: 10.1056/NEJMoa1505517
259. Hilary S. Gammill, Rakesh Chettier, Alina Brewer, James M. Roberts, Raj Shree, Eleni Tsigas, Kenneth Ward. Cardiomyopathy and Preeclampsia Shared Genetics? *Circulation.* 2018;138:2359–2366. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031527
260. Dimitra N. Vamvakopoulou, Maria Satra, Aggeliki Fegga, Maria Kourti, Andreas Sidiropoulos, Alexandros Daponte, Antonis Gounaris, George Syrogiannopoulos, Nikos C. Vamvakopoulos, Sotirios Sotiriou. Association of maternal Toll-like receptor-4 alleles with susceptibility to early-onset preeclampsia in central Greece. *Pregnancy Hypertension.* 2019;18:103–107
261. Morales, J., Welter, D., Bowler, E.H. et al. A standardized framework for representation of ancestry data in genomics studies, with application to the NHGRI-EBI GWAS Catalog. *Genome Biol* 2018;19: 21 doi:10.1186/s13059-018-1396-2

Πηγές Εγχρωμων Εικόνων & Διαγραμμάτων (Εικ. 1-20)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818954>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818961>

<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-0528.2009.02428.x>

https://books.google.gr/books?id=7zB1ernp3rsC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=tlr+polymorphisms+in+preeclampsia&source=bl&ots=fVsEZHVfmm&sig=hSm2pV_SLowrX0moEsRG7AkVNdc&hl=el&sa=X&ved=0ahUKEwiBmZauiv3bAhUN3qQKHRQUAIEQ6AEIajAH#v=onepage&q=tlr%20polymorphisms%20in%20preeclampsia&f=false

<https://academic.oup.com/femspd/article/70/1/3/450353>

https://www.google.gr/search?q=tlr+polymorphisms+in+preeclampsia&sa=N&rlz=1C1GGGE_enGR449GR484&biw=1024&bih=653&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=4MbZmZqDYy_B8M%253A%252C7gLpdvgaJbHb3M%252C_&usq=_4k9EkwXDLwpkIBIYduo_fmLepLw%3D&ved=0ahUKEwjV8qXnjv3bAhXrFJoKHfpNCaY4ChD1AQq6MAQ#imgrc=Lj_gk94XH64OFM:

<http://www.rcdrg.sgul.ac.uk/research/trophoblasts>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818954>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818961>

<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-0528.2009.02428.x>

https://books.google.gr/books?id=7zB1ernp3rsC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=tlr+polymorphisms+in+preeclampsia&source=bl&ots=fVsEZHVfmm&sig=hSm2pV_SLowrX0moEsRG7AkVNdc&hl=el&sa=X&ved=0ahUKEwiBmZauiv3bAhUN3qQKHRQUAIEQ6AEIajAH#v=onepage&q=tlr%20polymorphisms%20in%20preeclampsia&f=false

<https://academic.oup.com/femspd/article/70/1/3/450353>

https://www.google.gr/search?q=tlr+polymorphisms+in+preeclampsia&sa=N&rlz=1C1GGGE_enGR449GR484&biw=1024&bih=653&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=4MbZmZqDYy_B8M%253A%252C7gLpdvgaJbHb3M%252C_&usq=_4k9EkwXDLwpkIBIYduo_fmLepLw%3D&ved=0ahUKEwjV8qXnjv3bAhXrFJoKHfpNCaY4ChD1AQq6MAQ#imgrc=Lj_gk94XH64OFM:

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Ανάτυπο

Σύνοψης

Ευρημάτων

Διδακτορικής Διατριβής

Δήμητρας Ν. Βαμβακοπούλου


Παιδιάτρου



Pregnancy Hypertension

Volume 18, October 2019, Pages 103-107

Association of maternal Toll-like receptor-4 alleles with susceptibility to early-onset preeclampsia in central Greece

Dimitra N. Vamvakopoulou ^{a, 1}, Maria Satra ^b  , Aggeliki Fegga ^b, Maria Kourti ^b, Andreas Sidiropoulos ^b, Alexandros Daponte ^c, Antonis Gounaris ^a, [George Syrogiannopoulos](#) ^a, Nikos C. Vamvakopoulos ^b, Sotirios Sotiriou ^d

^a Dept. of Pediatrics and Neonatology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Viopolis, 41500 Larissa, Greece

^b Dept. of Biology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Viopolis, 41500 Larissa, Greece

^c Dept. of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Viopolis, 41500 Larissa, Greece

^d Dept. of Embryology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Viopolis, 41500 Larissa, Greece

Received 27 April 2019, Revised 5 September 2019, Accepted 22 September 2019, Available online 3 October 2019.



 Show less

<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.09.007>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Altered maternal inflammatory responses may confer increased risk of early-onset preeclampsia (EOP).
- Maternal TLR4 Asp299Gly and Thre399Ile alleles confer susceptibility to EOP.
- Adjusted EOP risk of TLR4 Asp299Gly carriers is 2.94.
- Adjusted EOP risk of TLR4 Thre399Ile carriers is 3.52.

Abstract

Introduction

Altered maternal inflammatory responses may play a role in the development of hypertensive disorders of pregnancy like preeclampsia, its more severe early-onset form and intrauterine growth restriction. We evaluated the relation of common allelic variants of Toll-like receptor 4 (TLR4), known to impair the inflammatory response, with the susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

Methods

We compared the occurrence of TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) alleles in heterozygous (A/G, C/T) and homozygous (G/G, T/T) states in 84 women with a history of early-onset preeclampsia and 94 age matched controls with a history of only uneventful pregnancies, by direct sequencing.

Results

Heterozygous TLR4 allelic variants were more common in women with a history of early-onset preeclampsia than in controls (GA for Asp299Gly: 14.3% vs 6.4% (AA), $p=0.053$ & CT for Thr399Ile: 16.7% vs. 6.4% (CC), $p=0.019$) and a stronger association was obtained when homozygous allelic carriers were also included (GA/GG for Asp299Gly: 16.7% vs. 6.4% (AA), $p=0.03$ & TC/TT for Thr399Ile: 19.0% vs. 6.4% (CC), $p=0.01$).

Discussion

We recorded association between common TLR4 gene variants and early-onset preeclampsia. Our findings support the involvement of maternal innate immune system in severe hypertensive disorders of pregnancy and point to the potential value of maternal TLR4 polymorphisms as predictors-risk factors of susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Ανάπτυπο

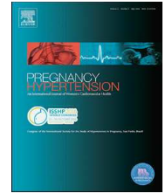
Δημοσίευσης

Ευρημάτων

Διδακτορικής Διατριβής

Δήμητρας Ν. Βαμβακοπούλου

Παιδιάτρου



Association of maternal Toll-like receptor-4 alleles with susceptibility to early-onset preeclampsia in central Greece



Dimitra N. Vamvakopoulou^{a,1}, Maria Satra^{b,*,1}, Aggeliki Fegga^b, Maria Kourti^b,
Andreas Sidiropoulos^b, Alexandros Daponte^c, Antonis Gounaris^a, George Syrogiannopoulos^a,
Nikos C. Vamvakopoulos^b, Sotirios Sotiriou^d

^a Dept. of Pediatrics and Neonatology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Vioplis, 41500 Larissa, Greece

^b Dept. of Biology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Vioplis, 41500 Larissa, Greece

^c Dept. of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Vioplis, 41500 Larissa, Greece

^d Dept. of Embryology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Vioplis, 41500 Larissa, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

TLR4
Early-onset preeclampsia
Gene polymorphism

ABSTRACT

Introduction: Altered maternal inflammatory responses may play a role in the development of hypertensive disorders of pregnancy like preeclampsia, its more severe early-onset form and intrauterine growth restriction. We evaluated the relation of common allelic variants of Toll-like receptor 4 (TLR4), known to impair the inflammatory response, with the susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

Methods: We compared the occurrence of TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) alleles in heterozygous (A/G, C/T) and homozygous (G/G, T/T) states in 84 women with a history of early-onset preeclampsia and 94 age matched controls with a history of only uneventful pregnancies, by direct sequencing.

Results: Heterozygous TLR4 allelic variants were more common in women with a history of early-onset preeclampsia than in controls (GA for Asp299Gly: 14.3% vs 6.4% (AA), $p = 0.053$ & CT for Thr399Ile: 16.7% vs 6.4% (CC), $p = 0.019$) and a stronger association was obtained when homozygous allelic carriers were also included (GA/GG for Asp299Gly: 16.7% vs. 6.4% (AA), $p = 0.03$ & TC/TT for Thr399Ile: 19.0% vs. 6.4% (CC), $p = 0.01$).

Discussion: We recorded association between common TLR4 gene variants and early-onset preeclampsia. Our findings support the involvement of maternal innate immune system in severe hypertensive disorders of pregnancy and point to the potential value of maternal TLR4 polymorphisms as predictors-risk factors of susceptibility to early-onset preeclampsia in Central Greece.

1. Introduction

Preeclampsia (PE) is a complex multi-system disease of placental origin and one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity and mortality, affecting 3%–5% of all pregnancies [1,2]. PE is characterized by hypertension and the coexistence of one or more of the following: proteinuria, maternal organ dysfunction, which is defined by new onset of any of the following (Renal insufficiency, hepatic dysfunction, neurological complications - eclampsia, stroke, confusion, hyperreflexia, severe headache, blindness or persistent visual scotomata and hematological complications, disseminated intravascular coagulation or hemolysis and uteroplacental dysfunction (fetal growth restriction) [3–5]. It usually presents after 20 weeks' gestation, and, when

of early-onset (defined as $< 34 + 0$ weeks), is associated with greater maternal and fetal risks, including intrauterine growth retardation, hypoxia and fetal loss [6,7]. Several risk factors have been used as predictors including family history of PE, PE in previous pregnancy, chronic hypertension, first pregnancy, new paternity, age and race (very young and older than 40 and black women have higher risk), obesity, multiple pregnancy, interval between pregnancies (less than two or more than 10 years apart), chronic migraines, diabetes type 1 or 2, kidney disease and IVF. Influenced by both genetic and environmental risk factors, the development of PE presents multi-factorial inheritance, indicating the potential contribution of parental genetic profile in its pathogenesis [8–12].

Maternal adaptation to pregnancy is essential for normal growth

* Corresponding author at: Department of Biology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Vioplis, 41500 Larissa, Greece.

E-mail address: mariasatra@yahoo.com (M. Satra).

¹ First and second author contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.09.007>

Received 27 April 2019; Received in revised form 5 September 2019; Accepted 22 September 2019

Available online 03 October 2019

2210-7789/ © 2019 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

and development of semi-allogeneic fetus. It requires properly regulated innate and adaptive immune components to effectively control the inflammatory response to various threats. Inappropriate inflammatory patterns have been related to abnormal trophoblastic invasion [13] and endothelial damage [14] and implicated in the pathogenesis of common placental and hypertensive disorders of pregnancy, including preeclampsia, its more severe early onset form and intra-uterine growth restriction [3,14,15].

Infusion of low-dose endotoxin or lipopolysaccharide (LPS), a potent antigen normally present in gram-negative bacteria known to induce a systemic pro-inflammatory reaction, in rats, induced a PE-like syndrome, including hypertension, proteinuria and glomerular endotheliosis [16]. LPS-mediated inflammation releases pro-inflammatory cytokines through activation of pattern recognition receptors (PRRs) like Toll-like receptors (TLRs), which are key elements of innate immunity. LPS recognition by TLR4 sensors leads to production of nuclear factor kappa B and release of pro-inflammatory cytokines (IL-1b, IL-6, TNF-a) that signal cells of the adaptive immune system (mainly T cells) to constitute an inflammatory response necessary for effective clearance of the harmful pathogen. Allelic variants of TLR4 have been associated with an attenuated immune response to LPS, as well as to exogenous and endogenous pathogenic insults, leading to inappropriate inflammatory patterns which can be both ineffective in dealing with an infectious agent, as well as cause the adverse effects of uncontrolled inflammation [17–21].

The human TLR4 (MIM C603030) gene, see also Diagram 1, is located on chromosome 9q33.1 and its polymorphic alleles Asp299Gly or D299G or (A896G) (MIM 603030.001) and Thr399Ile or T399I or (C1196T) (MIM 603030.002) known to influence the endotoxin TLR4-sensing system, have been related to sepsis [22], premature delivery [23], atherogenesis [24] and early-onset preeclampsia (EOP) albeit with conflicting results [4,7,25].

We assessed the susceptibility and relative risk of EOP in carriers of common TLR4 polymorphisms from Central Greece.

2. Materials and methods

2.1. Participants

Study participants (N = 178) were recruited in the tertiary referral center of Central Greece (Thessalia University Hospital). Inclusion criteria for cases (N = 84) were a history of EOP and delivery before 34 weeks of gestation and for healthy age matched women controls (N = 94), a history of one or more uneventful pregnancies. At inclusion, clinical and demographic data and whole blood samples for DNA isolation were obtained from all participants. The study was approved by the Medical Ethics Committee of Thessalia University Hospital, and written informed consent was obtained from all participants. EOP was defined according to the criteria of the International Society for the

Table 1
Clinical characteristics of study groups.

	Control N = 94 N (%)	EOP N = 84 N (%)	p
Parity			
1	68 (72.3)	62 (73.8)	0.826 [‡]
2	14 (14.9)	10 (11.9)	
3	12 (12.8)	12 (14.3)	
Age (years), mean (SD)	31.8 (5.8)	31.8 (6.3)	0.941 ⁺
Fetal sex			
Boys	48 (51.1)	48 (57.1)	0.661 [*]
Girls	42 (44.7)	32 (38.1)	
Boy-Girl (twins)	4 (4.3)	4 (4.8)	
Fetal loss			
No	94 (100)	80 (95.2)	0.048 [*]
Yes	0 (0)	4 (4.8)	
Twins-pregnancy			
No	86 (91.5)	74 (88.1)	0.453 [‡]
Yes	8 (8.5)	10 (11.9)	
Week of gestation, median (IQR)	39 (38–40)	32 (31–34)	< 0.001 ⁺⁺
Preterm delivery			
No	92 (97.9)	0 (0)	< 0.001 [‡]
Yes	2 (2.1)	84 (100)	
Birth weight (gr), median (IQR)	3550 (3170–3900)	1650 (1260–2140)	< 0.001 ⁺⁺

[‡] chi-square test.

^{*} Fisher's exact test.

⁺ Student's *t*-test.

⁺⁺ Mann-Whitney test.

Study of Hypertension in Pregnancy for preeclampsia symptoms [5], which is: increased blood pressure (≥ 140 mmHg SBP or ≥ 90 mmHg DBP on two or more occasions at least 6 h apart) that occurred before 34 weeks of gestation in a woman with previously normal blood pressure, accompanied by proteinuria (≥ 0.3 g/24 h). Fetal growth restriction was diagnosed if the fetal birth weight was below the 10th percentile for gestational age [26]. Exclusion criteria were chronic hypertension, diabetes mellitus, autoimmune disease and renal disease. All study participants were Caucasians, inhabiting the area of central Greece (Thessalia). The clinical characteristics of study participants are summarized in Table 1.

2.2. Genotypic analysis

DNA isolation. Genomic DNA was extracted from 200 μ l peripheral blood using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

PCR amplification. A 438bp-long fragment containing both TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms, see also Diagram 1, was amplified from genomic DNA as previously described. Specific primer

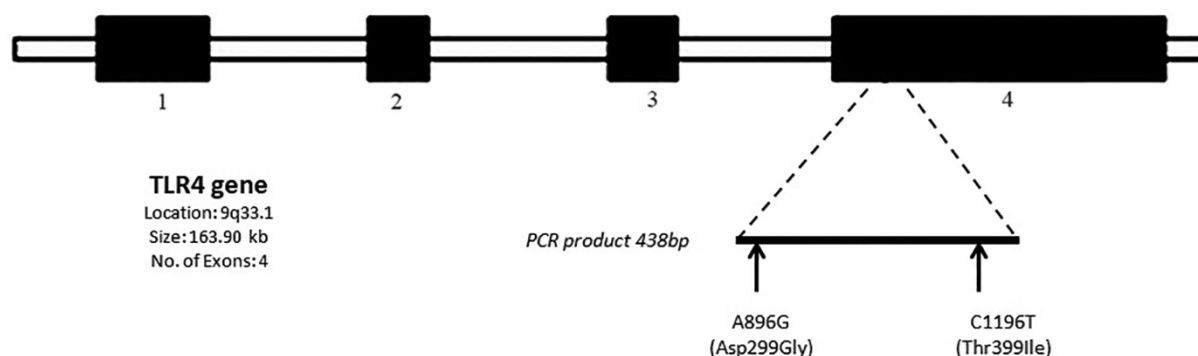


Diagram 1. TLR4 gene organization. Broken lines point the location of PCR product and arrows the location of the two common polymorphic alleles studied (adapted from Ref. [33]).

pair sequences were designed by Primer 3 software (www.justbio.com): forward 5'-TCTAGAGGGCCTGTGCAATT-3' and reverse 5'-TGAAACTC ACTCAATTTGTTTTCAA-3'. PCR reaction mixtures contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, 1.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 15 pmol of each primer. Amplification products were generated following 35 cycles of DNA denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 30 sec in a PTC-200MJ Research Thermocycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA).

Sequence analysis. Purification of the PCR products was performed using the PureLink PCR purification kit (Invitrogen). Automated cycle sequencing was performed with both strands in an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analyzer using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequences were aligned relative to control sequences from GenBank (GenBank accession number: NM 138554), using Sequencer PC software (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) and examined for the presence of mutations.

2.3. Statistical analysis

Normal distributed variables are expressed as mean and standard deviation (SD); while variables with skewed distribution are expressed as median and interquartile range (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. The normality assumption was evaluated using Kolmogorov-Smirnov test. If the normality assumption was satisfied for the comparison of means between two groups, Student's *t*-test was used. Mann-Whitney test was used for the comparison of continuous variables between two groups when the distribution was not normal. For the comparisons of proportions chi-square tests and Fisher's exact tests were used. A logistic regression analysis was performed to associate genotypes with the likelihood of EOP. Unadjusted and adjusted odds ratios with 95% confidence intervals were computed from the results of the logistic regression analyses. Statistical significance was set at 0.05 and analyses were conducted using SPSS statistical software (version 22.0).

3. Results

Regarding the basic clinical characteristics between the two age-matched study groups, mean age, 31.8 years (SD = 5.8) for EOP and 31.8 years (SD = 6.3) for control, no statistical differences were detected in terms of parity, fetal sex and twin pregnancies. As expected, mean gestational week at delivery and birth weight were significantly lower ($p < 0.001$), while fetal death was elevated ($p < 0.048$) in EOP relative to control cases (Table 1).

The presence of "wild type" (AA) and (CC) and "mutant" Asp299Gly or D299G (hetero-GA & homozygous-GG) & Thr399Ile or T399I (hetero-TC & homozygous-TT) sequences at position 896 and 1196 of the TLR4 gene, was recorded in 178 age matched study participants, 84 with EOP and 94 without EOP (controls), by direct sequencing (Table 2). Heterozygous TLR4 allelic variants were more common in women with a history of EOP than in controls (GA for Asp299Gly: 14.3% vs 6.4% for AA, $p = 0.053$ & CT for Thr399Ile: 16.7% vs. 6.4% for CC, $p = 0.019$) and a stronger association was observed when homozygous allelic carriers were also included (GA/GG for Asp299Gly: 16.7% vs. 6.4% for AA, $p = 0.03$ & TC/TT for Thr399Ile: 19.0% vs. 6.4% for CC, $p = 0.01$). No statistically significant differences with pregnancy outcomes, like parity, fetal sex, fetal loss, twins, week of gestation and birth weight were recorded in women with EOP between wild type (AA & CC) and mutant (GA/GG & TC/TT) TLR 4 allelic carriers (Tables 3 and 4).

As expected by their close proximity (300bp), the two polymorphic alleles co-segregate (4, 28). We observed a total of 18 Asp299Gly and 20 Thr399Ile homo (GG/TT) & heterozygous (AG/CT) mutant alleles in the 20 polymorphic carriers of our study (Table 2). Unadjusted and adjusted for odds ratios from logistic regression analysis showed that women with GA/GG or TC/TT genotypes in amino acid receptor

Table 2
Distribution of TLR 4 genotypes in study groups.

		Group				p
		Control		EOP		
		N	%	N	%	
Asp299Gly	AA	88	93.6	70	83.3	0.053*
	GA	6	6.4	12	14.3	
	GG	0	0	2	2.4	
Thr399Ile	CC	88	93.6	68	81.0	0.019*
	TC	6	6.4	14	16.7	
	TT	0	0	2	2.4	
Asp299Gly	AA	88	93.6	70	83.3	0.030 [†]
	GA/GG	6	6.4	14	16.7	
Thr399Ile	CC	88	93.6	68	81.0	0.010 [†]
	TC/TT	6	6.4	16	19.0	

[†] chi-square test.

* Fisher's exact test.

Table 3
Association of Asp299Gly GA/GG with EOP pregnancy outcomes.

	TLR 4: Asp299Gly GA/GG		p
	AA N (%)	GA/GG N (%)	
Parity			
1	50 (71.4)	12 (85.7)	0.245 [†]
2	8 (11.4)	2 (14.3)	
3	12 (17.1)	0 (0)	
Fetal sex			
Boys	40 (57.1)	8 (57.1)	> 0.999 [†]
Girls	26 (37.1)	6 (42.9)	
Boys-Girl (twins)	4 (5.7)	0 (0)	
Fetal loss			
No	68 (97.1)	12 (85.7)	0.128 [†]
Yes	2 (2.9)	2 (14.3)	
Twins			
No	62 (88.6)	12 (85.7)	0.670 [†]
Yes	8 (11.4)	2 (14.3)	
Week of gestation, median (IQR)	32 (31–34)	32 (27–34)	0.750 ⁺
Birth weight (gr), median (IQR)	1655 (1260–2140)	1420 (850–2600)	0.675 ⁺

[†] Fisher's exact test.

⁺ Mann-Whitney test.

positions 299 and 399 respectively, had greater likelihood for EOP. Unadjusted odds ratios OR (95% CI) were 2.91 (1.07–8.03) for those with GA/GG and 3.45 (1.28–9.29) for those with TC/TT, as compared to their wild type controls AA and CC, respectively. When adjusted for mother's age, parity and twin pregnancies, the corresponding odds ratios were marginally improved to 2.94 (1.06–8.18) and 3.52 (1.28–9.60), respectively (Fig. 1).

4. Discussion

The relative distribution of mutant TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile alleles was assessed in women with and without EOP in a Caucasian population from central Greece. In agreement with previous reports (4, 6), our findings suggest that carriers of these mutant alleles are more susceptible to EOP. These mutant alleles alter extracellular PRR motifs, causing inefficient immune response to diverse common exogenous and endogenous pathogenic insults in early stages of placental implantation and later development up to 20 weeks of gestation [27]. To understand the biological significance of our findings, the natural history of mutant TLR4 alleles must be taken into account.

Table 4
Association of Thr399Ile TC/TT with EOP pregnancy outcomes.

	TLR 4: Thr399Ile TC/TT		p
	CC N (%)	TC/TT N (%)	
Parity			
1	48 (70.6)	14 (87.5)	0.221 [†]
2	8 (11.8)	2 (12.5)	
3	12 (17.6)	0 (0)	
Fetal sex			
Boys	38 (55.9)	10 (62.5)	0.905 [†]
Girls	26 (38.2)	6 (37.5)	
Boys-Girl (twins)	4 (5.9)	0 (0)	
Fetal loss			
No	66 (97.1)	14 (87.5)	0.162 [†]
Yes	2 (2.9)	2 (12.5)	
Twins			
No	60 (88.2)	14 (87.5)	> 0.999 [†]
Yes	8 (11.8)	2 (12.5)	
Week of gestation, median (IQR)	32 (31–34)	32.5 (29–34)	0.727 ⁺
Birth weight (gr), median (IQR)	1650 (1260–2115)	1560 (1075–2480)	0.833 ⁺

[†] chi-square test.

⁺ Mann-Whitney test.

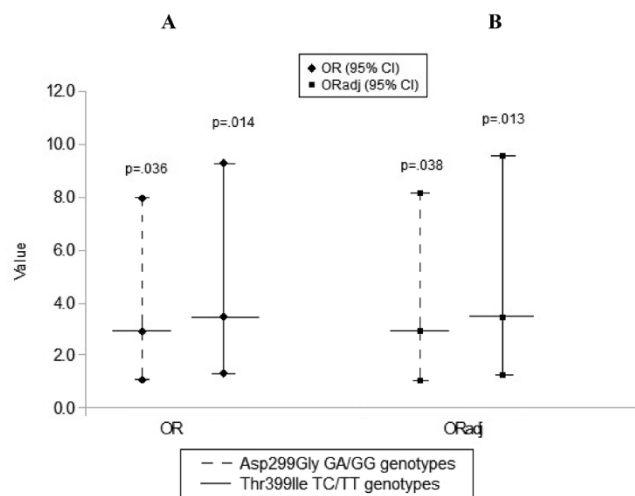


Fig. 1. Results from logistic regression analysis for the association of: A. Asp299Gly GA/GG genotypes with EOP: Unadjusted and adjusted for odds ratios from logistic regression analysis showed that women with GA/GG genotype in amino acid receptor position 299, had greater likelihood for EOP. Unadjusted odds ratio OR (95% CI) was 2.91 (1.07–8.03) for those with GA/GG, as compared to their wild type controls AA. When adjusted for mother's age, parity and twin pregnancies, the corresponding odds ratio was marginally improved to 2.94 (1.06–8.18). B. BThr399Ile TC/TT genotypes with EOP: Unadjusted and adjusted for odds ratios from logistic regression analysis showed that women with TC/TT genotype in amino acid receptor positions 399, had greater likelihood for EOP. Unadjusted odds ratio OR (95% CI) was 3.45 (1.28–9.29) for those with TC/TT, as compared to their wild type controls CC. When adjusted for mother's age, parity and twin pregnancies, the corresponding odds ratio was marginally improved to 3.52 (1.28–9.60).

Mutant Asp299Gly TLR4 allele originated first in Africa to offer protection from malaria associated mortality, counterweighing the increased susceptibility to infections and septic shock [19,20]. Later addition of Thr399Ile mutant allele in Indo-Europeans reduced the risk for septic shock to rates similar to wild type allelic carriers [19,20] and was a useful addition as Asp299Gly alone, would have caused a bigger threat to major plaque, typhoid fever and influenza outbreaks in Europe.

Until its extinction in late 1950s, malaria was endemic in central Greece, site of origin of our study participants, resulting in the fixation

of high frequencies of sickle trait and mutant TLR4 alleles in locals relative to other native Greek populations not exposed to malaria threat [28,29]. Recent relief of selective pressures from infections by aggressive antimicrobial practices in central Greece is expected to negate the role of malaria protective alleles, like Asp299Gly leading to eventual reduction in their frequencies. While the forces of population genetics complemented by active carrier screening and genetic counseling reduced the frequency of sickle trait to less than half in central Greece over the last fifty years [29], the anticipated reduction of Asp299Gly frequency, mainly by genetic drift, is expected to follow a much longer path. The absence of Asp299Gly in two of the 20 mutant carriers of our study may mark the beginning of such declining trend in central Greece.

On these grounds, we may speculate on the relative risk of mutant TLR4 haplotypes to develop EOP in response to pathogenic threats. First we predict that the double GG/TT mutant Asp299Gly/Thr399Ile allele known to alter receptor binding to ligands, reduce functional TLR4 levels and mount blunt immune response would confer the highest degree of susceptibility to EOP following TLR4 sensed pathogenic insults [30]. Next in descending susceptibility should follow double GA/TC Asp299Gly/Thr399Ile and single TC Thr399Ile heterozygotes. The tight association of these polymorphic alleles with EOP (Tables 3 and 4), along with its minor influence by common confounders (Fig. 1), supports their pivotal role in the development of pathogenic insult-triggered hypertensive disorders of pregnancy. Further analyses with greater numbers of EOP cases from central Greece will be required to validate our predictions. Consolidation of these trends and assignment of relative risk to various TLR4 polymorphisms may justify their potential incorporation and refine the local panel of predictive EOP guidelines.

Within the limits of our relatively small sample size, we observed association between mutant TLR4 alleles and pathogenic insult-triggered EOP, in a population from central Greece. Given that EOP is a complex hypertensive disorder of pregnancy of unknown etiology, with negative impact on maternal and fetal morbidity and mortality [1–3] as well as on off-springs of EOP pregnancies [31,32], our findings may aid to improve its prevention. The performance of available guidelines for EOP prediction, is likely to be enhanced by screening populations with relatively high mutant carrier frequencies for EOP-associated polymorphisms, like those for TLR4 in central Greece [28,29], shown to confer an over 3 fold elevated risk for EOP to local carriers (Fig. 1).

In conclusion, our promising pilot findings support provisional inclusion of prognostic TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile screening to local EOP guidelines for improved management and prevention of major hypertensive disorders of pregnancy in central Greece.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

References

- [1] A.P. Boucas, B.M. de Souza, A.C. Bauer, D. Crispim, Role of innate immunity in preeclampsia: a systematic review, *Reprod. Sci.* 24 (10) (2017) 1362–1370.
- [2] A.L. Tranquilli, G. Dekker, L. Magee, J. Roberts, B.M. Sibai, W. Steyn, G.G. Zeeman, M.A. Brown, The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP, *Pregnancy Hypertens.* 4 (2) (2014) 97–104.
- [3] C.W. Redman, I.L. Sargent, Latest advances in understanding preeclampsia, *Science* 308 (2005) 1592–1594.
- [4] B.B. van Rijn, A. Franx, E.A. Steegers, C.J. de Groot, R.M. Bertina, G. Pasterkamp, H.A. Voorbij, H.W. Bruinse, M. Roest, Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome, *PLoS ONE* 3 (4) (2008) e1865.

- [5] A.L. Tranquilli, G. Dekker, L. Magee, J. Roberts, B.M. Sibai, W. Steyn, G.G. Zeem, M.A. Brown, The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP, *Pregnancy Hypertens.: An Int J. Women's Cardiovasc Health* (2014) 97–104.
- [6] L.A. Magee, A. Pels, M. Helewa, E. Rey, P. von Dadelszen, Diagnosis, evaluation and management of the hypertensive disorders of pregnancy, *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 30 (2008) S1–S48.
- [7] F. Xie, Y. Hu, D.P. Speert, S.E. Turvey, G. Peng, D.M. Money, L.A. Magee, P. von Dadelszen, Toll-like receptor gene polymorphisms and preeclampsia risk: a case-control study and data synthesis, *Hypertens. Pregnancy* 29 (2010) 390–398.
- [8] J. Rigo, G. Szendei, K. Rosta, A. Fekete, K. Bögi, A. Molvarec, Z. Rónai, A. Vér, Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women, *Gynecol. Endocrinol.* 22 (2006) 521–525.
- [9] A. Molvarec, A. Ver, A. Fekete, K. Rosta, L. Derzbach, Z. Derzsy, I. Karádi, J. Rigó Jr., Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia, *Hypertens. Res.* 30 (2007) 205–211.
- [10] A. Maruyama, T. Nakayama, N. Sato, Y. Mizutani, K. Furuya, T. Yamamoto, Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene for preeclampsia, *Hypertens. Res.* 27 (2004) 903–909.
- [11] A. Ohkuchi, R. Iwasaki, H. Suzuki, C. Hirashima, K. Takahashi, R. Usui, S. Matsubara, H. Minakami, M. Suzuki, Normal and high normal blood pressures, but not body mass index, are risk factors for the subsequent occurrence of both preeclampsia and gestational hypertension: a retrospective cohort study, *Hypertens. Res.* 29 (2006) 161–167.
- [12] A. Ohkuchi, C. Hirashima, S. Matsubara, H. Suzuki, K. Takahashi, F. Arai, T. Watanabe, K. Kario, M. Suzuki, Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early-onset severe preeclampsia, *Hypertens. Res.* 30 (2007) 151–159.
- [13] M.T. McMaster, K.E. Bass, S.J. Fisher, Human trophoblast invasion. Autocrine control and paracrine modulation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 734 (1994) 122–131.
- [14] A.M. Borzychowski, I.L. Sargent, C.W. Redman, Inflammation and pre-eclampsia, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 11 (2006) 309–316.
- [15] D.A. Terrone, B.K. Rinehart, W.L. May, A. Moore, E.F. Magann, J.N. Martin Jr., Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia, *South. Med. J.* 93 (2000) 768–771.
- [16] M.M. Faas, G.A. Schuiling, J.F. Baller, C.A. Visscher, W.W. Bakker, A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171 (1994) 158–164.
- [17] N.C. Arbour, E. Lorenz, B.C. Schutte, J. Zabner, J.N. Kline, M. Jones, K. Frees, J.L. Watt, D.A. Schwartz, TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, *Nat. Genet.* 25 (2000) 187–191.
- [18] S. Pestka, C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, P.B. Fisher, Interleukin-10 and related cytokines and receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 929–979.
- [19] L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, L. Zitvogel, Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy, *Nat. Med.* 13 (2007) 1050–1059.
- [20] B. Ferwerda, M.B. McCall, K. Verheijen, B.J. Kullberg, A.J. van der Ven, J.W. van der Meer, M.G. Netea, Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms, *Mol. Med.* 14 (2008) 346–352.
- [21] B. Ferwerda, M.B. McCall, S. Alonso, E.J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, N. Izagirre, D. Syafruddin, G. Kibiki, T. Cristea, A. Hijmans, L. Hamann, S. Israel, G. ElGhazali, M. Troye-Blomberg, O. Kumpf, B. Maiga, A. Dolo, O. Doumbo, C.C. Hermsen, A.F. Stalenhoef, R. van Crevel, H.G. Brunner, D.Y. Oh, R.R. Schumann, C. de la Rúa, R. Sauerwein, B.J. Kullberg, A.J. van der Ven, J.W. van der Meer, M.G. Netea, TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans, *PNAS* 104 (2007) 16645–16650.
- [22] B. Beutler, A. Poltorak, Sepsis and evolution of the innate immune response, *Crit. Care Med.* 29 (2001) S2–6.
- [23] K.S. Crider, N. Whitehead, R.M. Buus, Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review, *Genet. Med.* 7 (2005) 593–604.
- [24] S. Kiehl, E. Lorenz, M. Reindl, C.J. Wiedermann, F. Oberhollenzer, E. Bonora, J. Willeit, D.A. Schwartz, Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 185–192.
- [25] A. Molvarec, A. Jermendy, M. Kovacs, Z. Prohaszka, J. Rigo, Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and preeclampsia: lack of association in a caucasian population, *Hypertens. Res.* 31 (2008) 859–864.
- [26] R. Vandenbosche, C. Kirchner, T. Jeffrey, Intrauterine growth retardation, *Am. Fam. Physician* 56 (1998) 1384–1390.
- [27] J.J. Kim, D.D. Sears, TLR4 and insulin resistance, *Gastroenterol. Res. Pract.* (2010) 139–149.
- [28] A.N. Manolakis, E.K. Kapsoritakis, A. Tiaka, A. Sidiropoulos, A. Gerovassili, M. Satra, D. Vamvakopoulou, F. Tsiopoulos, N. Papanas, I. Skoularigis, S.P. Potamianos, N. Vamvakopoulos, TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease, *Eur. J. Endocrinol.* 165 (2011) 261–267.
- [29] M. Samara, I. Chiotoglou, A. Kalamaras, S. Likousi, C. Chassanidis, A. Vagenas, C. Vagenas, E. Eftichidis, N. Vamvakopoulos, G.P. Patrinos, P. Kollia, Large scale-population genetic analysis for hemoglobinopathies reveals different mutation spectra in Central Greece compared to the rest of the country, *Am. J. Hematol.* 82 (2007) 634–636.
- [30] P. Rallabhandi, J. Bell, M. Ss Boukhvalova, A. Medvedev, E. Lorenz, M. Ardit, V.G. Hemming, J.C. Blanco, D.M. Segal, S.N. Vogel, Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling, *J. Immunol.* 177 (2006) 322–332.
- [31] C.S. Wu, E.A. Nohr, B.H. Bech, M. Vestergaard, J.M. Catov, J. Olsen, Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201 (2009) 1–10.
- [32] K.K. Byberg, K. Øymar, G.E. Eide, M.R. Forman, P.B. JuÅlÅusson, Exposure to preeclampsia in utero affects growth from birth to late childhood dependent on child's sex and severity of exposure: follow-up of a nested case-control study, *PLoS ONE* 12 (2017) 1–15.
- [33] P. Davoodi, P.A. Mahesh, A.D. Holla, N. Ramachandra, A preliminary study on the association of single nucleotide polymorphisms of interleukin 4 (IL4), IL13, IL4 receptor alpha (IL4Rα) & Toll-like receptor 4 (TLR4) genes with asthma in Indian adults, *Indian J. Med. Res.* 142 (2015) 675–680.