



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ»

*«Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης
κυήσεων υψηλού κινδύνου για προεκλαμψία»*

Μεταπτυχιακή εργασία

Φέξη Δήμητρας

Γ' Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,

Νοσοκομείο «Αττικόν»

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Παπαντωνίου



ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Π. Γ. Ν «Αττικόν»

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Παπαντωνίου

**«Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης
κυήσεων υψηλού κινδύνου για προεκλαμψία»**

Μεταπτυχιακή εργασία Φέξη Δήμητρας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ»

Διεύθυνση Προγράμματος: Καθηγητής Νικόλαος Παπαντωνίου

ΑΘΗΝΑ 2017

Για τη γυναίκα,

την έγκυο,

τη μητέρα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	5
1.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1.ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ.....	11
1.1.1.Ορισμός- Προδιαθεσικοί παράγοντες.....	11
1.1.2.Παθοφυσιολογία.....	13
1.1.2.1. Εμβρυοπλακουντικός παράγοντας.....	13
1.1.2.2. Παράγοντες της μητέρας.....	17
1.1.2.3. Η θεωρία της ταυτόχρονης δράσης παραγόντων της μητέρας και του πλακούντα.....	18
1.1.2.4. Η Προεκλαμψία ως γενετική νόσος.....	18
1.1.3. Θεραπεία.....	19
1.1.4. Ανίχνευση κύσεων υψηλού κινδύνου για Προεκλαμψία με συνδυασμό υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών.....	19
1.2.ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ.....	24
1.2.1 Πρωτεωμική ανάλυση.....	25
1.2.1.1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE).25	
1.2.1.2. Ανίχνευση των πρωτεϊνών.....	26
1.2.1.3. Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματογραφία μάζας (MS analysis).....	26
1.2.2. Φασματογραφία μάζας - Αρχή λειτουργίας.....	27
1.2.3. Εφαρμογή της πρωτεωμικής στην ανίχνευση βιολογικών δεικτών.....	27
1.2.3.1. Βιολογικοί δείκτες στην κύηση.....	28
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
2.1. ΣΚΟΠΟΣ.....	32
2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	33
2.2.1. Μέθοδοι.....	34
2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων.....	34
2.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και ανάλυση εικόνων.....	34

2.2.1.3. Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα πηκτώματα 2DE-Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων με φασματογραφία μάζας.....	35
2.2.2. Επιβεβαίωση της διαφοροποιημένης έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών.	37
2.2.3. Στατιστική ανάλυση.....	37
2.2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	38
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
2.3.1. Κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη.....	38
2.3.2. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	39
2.3.3. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	43
2.3.4. Επιβεβαίωση της διαφοροποιημένης έκφρασης επιλεγμένων υποψήφιων βιολογικών δεικτών με τη μέθοδο ELISA.....	45
2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	55
ABSTRACT.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1-Έντυπο συγκατάθεσης.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 –Έντυπο ενημέρωσης.....	68
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3-Διαλύματα.....	72

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μία από τις σοβαρότερες επιπλοκές της κύησης με συνέπειες τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο είναι η προεκλαμψία. Υπολογίζεται ότι επιπλέκει 3-5% των κύσεων και όσο νωρίτερα εμφανίζεται στη διάρκεια της κύησης (πριν τις 34 εβδομάδες) τόσο σοβαρότερες είναι οι επιπλοκές ειδικά για το έμβρυο λόγω προωρότητας και συχνά σοβαρής υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης. Η αντιμετώπιση έγκειται ουσιαστικά στην περάτωση του τοκετού, ενώ όλες οι σύγχρονες μελέτες έχουν καταλήξει στην προστατευτική δράση που ασκεί η έγκαιρη έναρξη προφυλακτικής αγωγής με ασπιρίνη χαμηλής δόσης σε εγκύους υψηλού κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας.

Η χρήση δεικτών για πρόωμη ανίχνευση των εγκύων υψηλού κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας μπορεί να προσφέρει σημαντική βοήθεια στην αποτροπή της επιπλοκής ή/και στην καλύτερη αντιμετώπιση των επιπτώσεων αυτής.

Υπάρχουν στην παρούσα φάση αξιόπιστοι βιολογικοί και υπερηχογραφικοί δείκτες που συνδυαστικά προβλέπουν την προεκλαμψία με μεγάλη ευαισθησία. Οι μελέτες, όμως, συνεχίζονται για την ανεύρεση δεικτών απλών, εύκολα μετρήσιμων, χωρίς ανάγκη χρήσης εξειδικευμένου προσωπικού, οι οποίοι να μπορούν περαιτέρω να φανούν χρήσιμοι στην έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία της προεκλαμψίας.

Η παρούσα μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση ως «Αριστεία» μέσω των προγραμμάτων ΕΣΠΑ (επιστημονικός υπεύθυνος Καθηγητής Ν. Παπαντωνίου) και από το πρόγραμμα του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Παθολογία της Κύησης».

Στο σημείο αυτό οφείλω, καταρχάς, ευχαριστίες στην τριμελή επιτροπή των υπεύθυνων καθηγητών για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, τον κ. Νικόλαο Παπαντωνίου, Καθηγητή Μαιευτικής- Γυναικολογίας, Διευθυντή του

Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, Διευθυντή της Γ΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, τον κ. Δημήτριο Κασσάνο, Ομότιμο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και τον κ. Χαράλαμπο Χρέλια, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να παρακολουθήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα και να εκπονήσω αυτή την ερευνητική διπλωματική εργασία.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Γραμματικάκη, Επιμελητή Α΄ της Γ΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν. «Αττικόν», χωρίς τη συμβολή του οποίου δε θα υπήρχε αυτή η επιτυχημένη και ανελλιπής παρουσία του μεταπτυχιακού «Παθολογία της Κύησης» επί σειρά ετών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Δρ. Αγγελική Κολιαλέξη, για την αμέριστη βοήθειά της στη συλλογή του υλικού, την εκτέλεση σημαντικού τμήματος των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό από το Τμήμα Εμβρυομητρικής Ιατρικής (ειδικά τους ιατρούς κ. Γεώργιο Παπαϊωάννου, κα Μαρία Σίμου, κ. Στέφανο Παπαδόπουλο και κ. Νικόλαο Ευαγγελινάκη) για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης, αλλά και όλους τους συναδέλφους ιατρούς και το νοσηλευτικό-μαιευτικό προσωπικό της Γ΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής με τους οποίους ήταν ιδιαίτερα ευχάριστη η πολύμηνη συνεργασία.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΟΝΟΜ/ΜΟ: Δήμητρα Φέξη

ΗΜ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 16/06/1982

ΔΙΕΥ/ΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Τζαβέλλα 20, 13231 Πετρούπολη, ΑΘΗΝΑ

E-mail: demifexi@gmail.com

Τηλ. : +30 6974905113, 210-5010512

ΒΑΣΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2000-2006 : ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Βαθμός: 7,80 «Λίαν Καλώς»

1997-2000 : 1^ο ΛΥΚΕΙΟ ΠΕΤΡΟΥΠΟΛΗΣ

Βαθμός αποφοίτησης: 19,7/20

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Νοέμ 2015: Απόκτηση Τίτλου Ειδικότητας Μαιευτικής-Γυναικολογίας
(Ελληνικός/Ευρωπαϊκός Τίτλος Ειδικότητας και Ελβετικός FMH)

2014-2015: *DIU (Διαπανεπιστημιακό Δίπλωμα): «Μαιευτικό και Γυναικολογικό Υπερηχογράφημα-Φυσιολογία-Παθολογία», Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο COCHIN-site PORT ROYAL, PARIS*

2013-2014 : DU (Πανεπιστημιακό Δίπλωμα): « Διερεύνηση υπογονιμότητας και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή», Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο COCHIN- PARIS.

2014-2017 : Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα « Παθολογία της Κύησης », Παν/μιο Αθηνών, Π.Γ.Ν ΑΤΤΙΚΟΝ.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Μάιος 2016-έως σήμερα: Μαιευτήρας-Γυναικολόγος, Hôpital de la Broye, site Payerne, Ελβετία

Ιαν 2016- Απρ 2016: Επιστημονικός Συνεργάτης στο Τμήμα Υπερήχων, Γ'ΜΓ, Π.Γ.Ν ΑΤΤΙΚΟΝ

Μαρτ 2015- Δεκ 2015: Ειδικευόμενη Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Π.Γ.Ν ΑΤΤΙΚΟΝ

Μάιος 2014- Φεβρ2015: Ειδικευόμενη Μαιευτικής-Γυναικολογίας: Hôpital Universitaire de Bruxelles, Brugmann, Βέλγιο

Ιουν 2013- Μαρτ 2014 : Ειδικευόμενη Μαιευτικής-Γυναικολογίας: Hôpital Universitaire de Genève, Ελβετία

Αυγ 2012-Μάιος 2013 : Ειδικευόμενη Μαιευτικής-Γυναικολογίας: Hôpital de Neuchâtel Pourtalès, Ελβετία.

Ιαν 2011-Ιούλ 2012 : Ειδικευόμενη Γυναικολογίας: ΓΝΑ «Λαϊκό»

Σεπτ 2009-Μάρτ 2010 : Ειδικευόμενη Γενικής Χειρουργικής & Τραυματολογίας: Hôpital du Jura-site de Delémont, Ελβετία

Μάιος 2008-Μάιος2009 : Ειδικευόμενη Γενικής Χειρουργικής: ΓΝΑ « Ελπίς »

Ιαν 2008-Ιουν 2009 : Εφημερεύων ιατρός στο τμήμα Χειρουργικής: «Ευγενίδειο Ίδρυμα» του Παν/μιου Αθηνών.

Σεπτ 2006-Δεκ 2007: Επιστημονικός συνεργάτης στη Β' Μαιευτική- Γυν/κη Κλινική του Παν/μίου Αθηνών και συνεργάτης στο ερευνητικό πρόγραμμα του Τμήματος Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας –πρωτόκολλο για τη μελέτη γονιδίων που σχετίζονται με το PCOs σε νεαρές γυναίκες (Υπεύθυνος προγράμματος: Επικ. Καθ. Γεωργ. Μαστοράκος)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ

Κληροδότημα «Αντώνιος Παπαδάκης» του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών: βετής υποτροφία προπτυχιακών σπουδών κατόπιν εξετάσεων (2000-2006)

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ- ΣΥΝΕΔΡΙΑ (ενδεικτικά και σχετικά με την ειδικότητα της μαιευτικής και γυναικολογίας)

- 33rd annual meeting of ESHRE, Γενεύη, 2-5 Ιουλ. 2017.

- *4th International Winners Meeting, Hysterectomy*, 3ήμερο εκπαιδευτικό σεμινάριο Ενδοσκόπησης στη Γυναικολογία, ESGE, Ρώμη, 8-10 Ιουν. 2017.
- *GETUP*- 4ήμερο εκπαιδευτικό σεμινάριο Ενδοσκόπησης στη Γυναικολογία (κατόπιν επιλογής 100 γυναικολόγων από όλη την Ευρώπη), Ρώμη, Απριλ 2017
- *EUROSON 2015*- 27th Congress of EFSUMB, Αθήνα, Νοέμ. 2015.
- *9th Women's Health and Disease*, Αθήνα, Αύγ. 2014.
- *23ο Διεθνές Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα, Φεβρ 2013.
- *Διεθνές Σεμινάριο Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου*, Ελληνική Εταιρεία Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου, Ιωάννινα Νοέμ. 2012.
- *22ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα Ιαν.2012.
- *17ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα Ιαν.2007.
- *16ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα Ιαν.2006.
- *8ο Σεμινάριο “Καρκίνος Τραχήλου Μήτρας”*, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ογκολογίας, Αθήνα Δεκ. 2006.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Kolialexi A., Tsangaris G., Sifakis St., Gourgiotis D., Katsafadou A., Lykoudi A., Marmarinos A., Mavreli D., Pergaliotis V., **Fexi D.**, Mavrou A., Papaioannou G., Papantoniou N. “Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia”, *Expert Review of Proteomics*, Febr 2017.
- **Fexi D.**, Toussaint A., Schreyer J., SapinB., « Συστροφή εξαρτήματος χωρίς παρουσία μάζας, στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης», *Poster για Journées d'Automne du GRSSGO, Montreux, Ελβετία, Νοέμ. 2016.*
- Makris G., **Fexi D.**, Chrelias Ch., Batista M., Papantoniou N., “Y-type anovulvar fistula complicating inflammatory bowel disease”, *online of American Surgeon Journal*, 2016.
- **Φέξη Δ.**, Λιτός Μ., Μιχαλίτση Β., Μίνκωφ Αθ., Παπαντωνίου Ν., «Παραλλαγές στο Σύνδρομο Dandy Walker: διαγνωστικά διλήμματα και προγεννητική συμβουλευτική», *Υπερηχογραφία Τομ. 13, Τευχ 1, σελ. 35-38, 2016.*

- V. Michalitsi, D. **Fexi***, G. Papaioannou , K. Salambasis, M. Litos, N. Papantoniou
« Posterior fossa defects: The challenge of sonographic diagnosis, counseling and decision making. ». *e-poster για EUROSON 2015*
- A.Lagadas, A. Papanikolaou, D. **Fexi**, D. Agrapidis, S. Diamantopoulou, P. Kolyviras, G. Mavraganis, K. Giannakopoulos, “Fertility and contraception in women with cancer: A review”. , *The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care*, Jun 2012; Vol 17.
- N. Orfanos, D. **Fexi**, A. Mariolis, E. Konstantinou, I. Flessas, F. Orfanos, N. Goutas, D. Vlachodimitropoulos, I. Harkoftakis, T. Mariolis-Sapsakos, “Invasive Lobular Carcinoma of the Male Breast: a Case Report and review of the literature.” *Medical Annals 2008*; 31: 214-217
- Συμμετοχή στα Posters που παρουσιάστηκαν στο 26^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής-Παγκόσμιο Χειρουργικό Φόρουμ 2008, Αθήνα, Νοέμ. 2008 με τους τίτλους:
 - “Giant Parathyroid Adenoma with Atypical Ultrasonographic Image”
 - “Solitary Internal Jugular Vein Invasion by Thyroid Carcinoma: Resection and Reconstruction”
 - “Thyroid Carcinoma in patients with Hypothyroidism”
- Καθώς και στην ελεύθερη ανακοίνωση με τίτλο: “Anorectal Melanoma: The role of sentinel lymph node technique in surgical treatment (a case report)”
- Mastorakos G., Caroutsou Ef., Linardi A., Mizamtzidi M., **Fexi D** “Endocrine Disruptors and Woman’s Reproduction”, *Review της Ελληνικής Εταιρείας Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, Απρ.2007.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

- Γαλλικά: Diplôme Approfondi de Langue Française- DELF 1,2 DALF
- Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English- University of Cambridge

ΓΕΝΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ:

- Θέατρο (Απόφοιτος του Τμήματος Θεατρικών Σπουδών, Παν/μιο Πατρών, 2011)
- Αθλητισμός (στίβος, ποδηλασία, κολύμβηση, Kitesurf)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ

1.1.1. Ορισμός- Προδιαθεσικοί παράγοντες

Η Προεκλαμψία (ΠΕ) είναι πολυπαραγοντική και πολυσυστηματική επιπλοκή της κύησης που εμφανίζεται μετά τις 20 εβδομάδες κύησης και αφορά τη μητέρα και το έμβρυο. Επιπλέκει 3-5% των κύησεων και αποτελεί διεθνώς τη δεύτερη κυριότερη αιτία μητρικού θανάτου, ενώ ευθύνεται για 7-9% των περιπτώσεων νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας [1-4].

Η διάγνωση στηρίζεται στην εμφάνιση αρτηριακής υπέρτασης και λευκωματουρίας, σύμφωνα με τα εξής κριτήρια, μετά τις 20 εβδομάδες κύησης:

- 1) Αρτηριακή Υπέρταση: συστολική πίεση $>140\text{mmHg}$ ή και διαστολική πίεση $>90\text{mmHg}$ σε τουλάχιστον δύο μετρήσεις με απόσταση 4-6 ωρών μεταξύ τους, χωρίς προηγούμενο ιστορικό υπέρτασης. Σε περίπτωση συστολικής πίεσης $>160\text{ mmHg}$ ή διαστολικής $>110\text{ mmHg}$ σε μετρήσεις με απόσταση λίγων λεπτών τίθεται, επίσης, η διάγνωση αρτηριακής υπέρτασης.
- 2) Πρωτεϊνουρία: λεύκωμα άνω των 300mg στα ούρα 24ώρου ή αναλογία πρωτεΐνης/κρεατινίνης $\geq 0,3\text{ mg/dl}$ ή επί έλλειψης ποσοτικής μέτρησης: στικ ούρων με λεύκωμα $\geq 1+$.

Σύμφωνα με τις νεότερες οδηγίες από το Αμερικάνικο Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων, επί έλλειψης του κριτηρίου της πρωτεϊνουρίας η διάγνωση τίθεται αν η αρτηριακή υπέρταση συνοδεύεται με την πρώτη εμφάνιση κατά την κύηση ενός τουλάχιστον από τα παρακάτω:

- Θρομβοπενία $<100.000/\text{micoL}$
- Κρεατινίνη ορού $>1.1\text{mg/dl}$
- Διπλασιασμός της τιμής των ηπατικών ενζύμων στον ορό
- Πνευμονικό οίδημα
- Νευρολογικά ή οφθαλμικά συμπτώματα (πρωτοεμφανιζόμενη έντονη κεφαλαλγία που δεν υποχωρεί με τα συνήθη αναλγητικά, θολή όραση, σκοτώματα)

Στα παραπάνω κριτήρια, κατά την αναθεωρημένη δήλωση της Παγκόσμιας Εταιρείας Μελέτης της Υπέρτασης κατά την Κύηση (ISSHP), περιλαμβάνεται και η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη [5].

Η ΠΕ χαρακτηρίζεται ως *πρώιμη* όταν εμφανίζεται πριν τις 34 εβδομάδες κύησης ή ως *όψιμη* όταν η έναρξη των συμπτωμάτων γίνεται μετά τις 34 εβδομάδες [6].

Η ΠΕ εμφανίζεται συχνότερα μετά τις 34 εβδομάδες κύησης (όψιμη ΠΕ), ωστόσο η πρόιμη προεκλαμψία (ΠΠΕ) που ορίζεται ως η προεκλαμψία προ 34 εβδομάδων κύησης, αν και σπανιότερη, σχετίζεται με σοβαρότερες επιπλοκές –κατά κύριο λόγο με την υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη και την προωρότητα. Η ΠΠΕ οφείλεται αμιγώς σε δυσλειτουργία του πλακούντα και συνοδεύεται από ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ η όψιμη ΠΕ αφορά κυρίως τη μητέρα [7,8].

Αυτή η ταξινόμηση σε πρόιμη και όψιμη ΠΕ έχει κλινικό ενδιαφέρον καθώς, οι μελέτες κατευθύνονται πλέον κυρίως στην έγκαιρη ανίχνευση και πρόβλεψη της ΠΠΕ προκειμένου να αποφευχθούν ή να αντιμετωπιστούν οι σημαντικές της επιπλοκές.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι προδιαθεσικοί παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της επιπλοκής. Μεταξύ αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ακραίες ηλικίες της γυναίκας κατά την κύηση (> 40 ή <18 ετών), η ατοκία, καθώς και η αλλαγή σεξουαλικού συντρόφου στη νέα κύηση η οποία εμφανίζει αργότερα την επιπλοκή.

Πίνακας 1: Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση Προεκλαμψίας
Άτοκος
Ιστορικό προεκλαμψίας σε προηγούμενη κύηση
Ηλικία μητέρας > 40 ή <18 ετών
Οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας
Χρόνια Αρτηριακή Υπέρταση
Χρόνια νεφροπάθεια
Αυτοάνοσες νόσοι (πχ αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος)
Αγγειοπάθεια
Σακχαρώδης διαβήτης (προϋπάρχων ή της κύησης)
Πολύδυμος κύηση
Παχυσαρκία
Μαύρη φυλή
Εμβρυϊκός ύδρωπας
Υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη, αποκόλληση πλακούντα, ή ενδομήτριος θάνατος σε προηγούμενη κύηση
Παρατεταμένο μεσοδιάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών κυήσεων, αν η προηγούμενη κύηση ήταν νορμοτασική. Σύντομο μεσοδιάστημα, σε περίπτωση προηγούμενης κύησης με προεκλαμψία.
Παράγοντες συσχετιζόμενοι με το σύντροφο (νέος σύντροφος, περιορισμένη έκθεση στο σπέρμα (πχ χρήση προφυλακτικού)
IVF (εξωσωματική γονιμοποίηση)

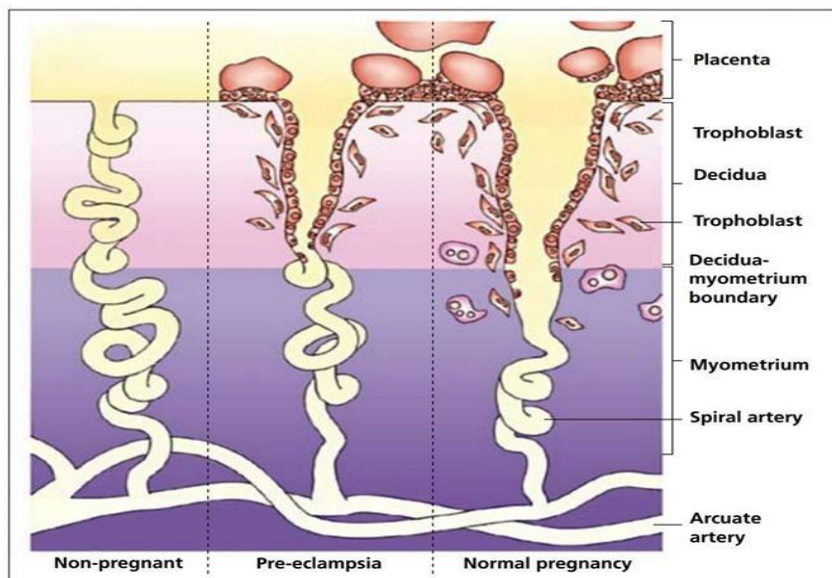
1.1.2. Παθοφυσιολογία

Τα τελευταία χρόνια γίνονται συστηματικές προσπάθειες προκειμένου να γίνουν κατανοητοί οι ακριβείς παθογενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την εμφάνιση ΠΕ. Οι περισσότερες μελέτες όμως περιλαμβάνουν γυναίκες με ήδη εγκατεστημένη νόσο, ενώ πειράματα σε ζώα απέτυχαν να διαφωτίσουν την επιστημονική κοινότητα σχετικά με την αιτιοπαθογένεια της επιπλοκής, πιθανώς γιατί τα ευρήματα των μελετών αυτών δεν έχουν εφαρμογή στον άνθρωπο.

Έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί διάφορες θεωρίες για την αιτιοπαθογένεια της επιπλοκής, οι οποίες εμπλέκουν στον παθογενετικό μηχανισμό της ΠΕ τη μητροπλακουντιακή μονάδα, παράγοντες της μητέρας και παράγοντες του εμβρύου που συνοψίζονται στην άποψη ότι η μητρο-πλακουντιακή ισχαιμία και η βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για την εκδήλωση της επιπλοκής [9-11].

1.1.2.1. Εμβρυοπλακουντιακός παράγοντας

Προκειμένου να προχωρήσει φυσιολογικά η κύηση, η πρόωμη βλαστοκύστη εμφυτεύεται στο ενδομήτριο ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αιμάτωση των κοτυληδόνων. Η εξωλαχνιακή κυτταροτροφοβλάστη αναπτύσσεται από τις αχοριακές χοριονικές λάχνες και διαμορφώνει το κατάλληλο περιβάλλον στην ενδομητρική κοιλότητα. Οι τροφοβλάστες διεισδύουν μέχρι το μυομήτριο και στο τέλος της διαδικασίας διείσδυσης, μετατρέπονται σε πολύ μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα και εκκρίνουν αγγειοδιασταλτικές ουσίες οι οποίες δρουν στις σπειροειδείς αρτηρίες και προκαλούν διαστολή [12]. Κατά το 2^ο τρίμηνο της κύησης, οι σπειροειδείς αρτηρίες, με την επίδραση της κυτταροτροφοβλάστης, μετατρέπονται από μικρά αγγεία με μεγάλη αντίσταση σε αγγεία με μεγάλη χωρητικότητα. Η διαδικασία αυτή της διείσδυσης επιτρέπει την ανάπτυξη της εμβρυοπλακουντιακής μονάδος και τη μείωση της ποσότητας αίματος στον μεσολάχνιο χώρο [13,14]. Θεωρείται ότι η διαταραχή διείσδυσης της τροφοβλάστης είναι ο βασικότερος παθογενετικός μηχανισμός της προεκλαμψίας. Μελέτες σε ιστολογικά παρασκευάσματα υστερεκτομηθέντων γυναικών λόγω ΠΕ, έδειξαν ότι τόσο το βάθος διείσδυσης όσο και ο αριθμός των τροφοβλαστών ήταν σημαντικά μειωμένα (εικόνα 1) [15].



Εικόνα 1: Διαδικασία διείσδυσης της τροφοβλάστης σε φυσιολογικές κύησεις και σε κύησεις που εμφάνισαν προεκλαμψία [15].

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες για την παθοφυσιολογία της ΠΕ και τη συσχέτισή της με τον εμβρυοπλακουντιακό παράγοντα.

-Μοριακοί-κυτταρικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη φυσιολογική πλακουντοποίηση
 Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα, η διαταραχή της διείσδυσης των μητροπλακουντιακών αγγείων είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης ενδογενών (ανωμαλίες της εξωχοριονικής τροφοβλάστης) και εξωγενών παραγόντων της μήτρας (Natural Killer Cells-NK της μήτρας και κυτταροσυγκολλητικά μόρια του ενδοθηλίου της μητέρας).

- Ανωμαλίες των Natural Killer κυττάρων της μήτρας

Τα NK κύτταρα αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό λεμφοκυττάρων του χορίου. Κατά την αρχόμενη κύηση, λειτουργούν σαν «φίλτρο» γύρω από τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης και αλληλεπιδρούν με τους εξωλαχνιακούς τροφοβλάστες και επάγουν την αγγειογένεση, μέσω παραγωγής κυτταροκινών, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PIGF) [16].

Παρά το ότι τα τροφοβλαστικά κύτταρα των λαχνών που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα της μητέρας εμφανίζουν έλλειψη μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τύπου 1 και 2, η κυτταροτροφοβλάστη που διεισδύει

εμφανίζει έναν ασυνήθη συνδυασμό τέτοιων μορίων, όπως HLA-C, HLA-E, HLA-G. Τα μόρια αυτά ενώνονται με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των NK κυττάρων. Το σύμπλεγμα υποδοχέας - υπόστρωμα φαίνεται ότι ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της εξωλαχνιακής τροφοβλάστης με τα NK κύτταρα του χορίου.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ο επίτοπος του υποδοχέα KIR αποτελείται από 715 γονίδια και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν τόσο την καταστολή όσο και την ενεργοποίηση των υποδοχέων KIR. Οι επίτοποι αυτοί εμφανίζουν διαφορετική αλληλουχία γονιδίων με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές μορφές. Στον άνθρωπο, τα *HLA-C* και τα *KIR* εμφανίζουν πολυμορφία με αποτέλεσμα σε κάθε κύηση το μόριο HLA-C της τροφοβλάστης που προέρχεται από τον πατέρα να είναι διαφορετικό όπως διαφορετικοί είναι και οι υποδοχείς KIRs των NK κυττάρων που προέρχονται από τη μητέρα [17].

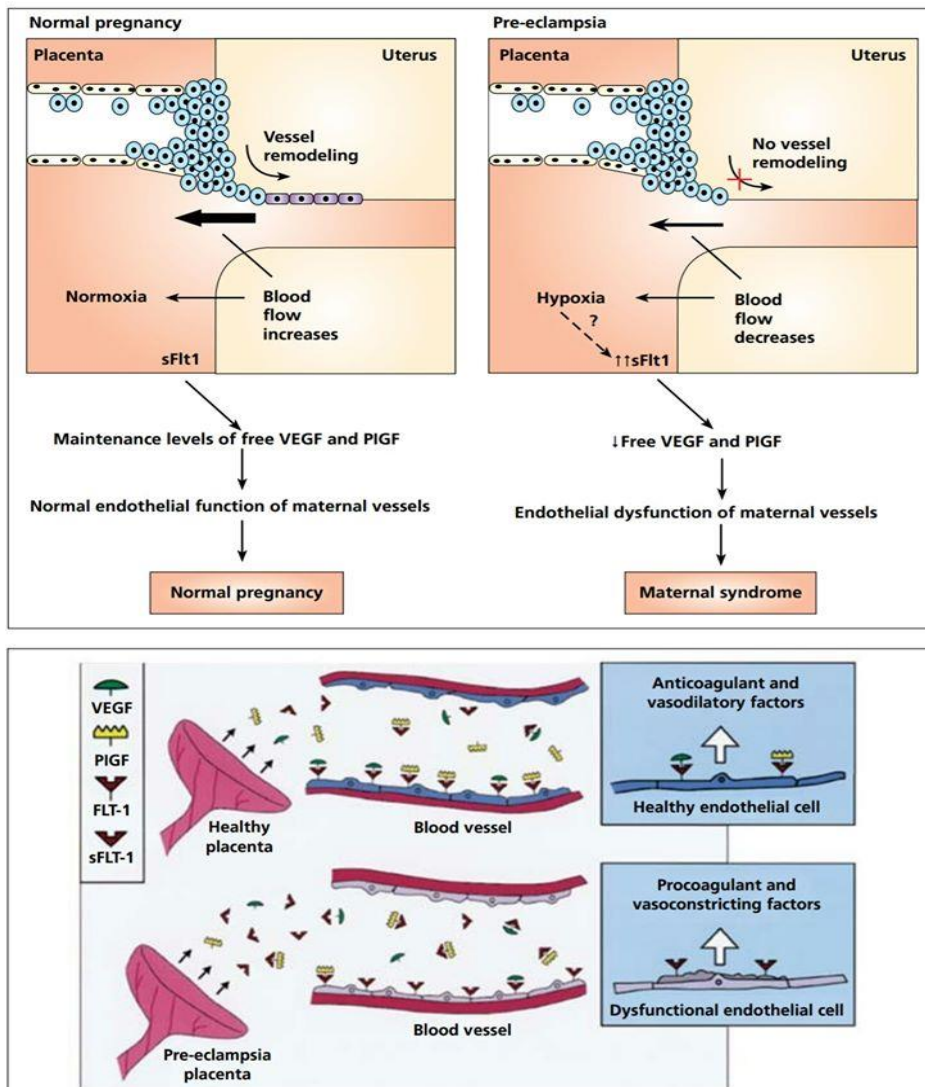
- *Ανωμαλίες κυτταροσυγκολλητικών μορίων στο ενδοθήλιο της μητέρας* Στη φυσιολογική εγκυμοσύνη οι κυτταροτροφοβλάστες διεισδύουν στο τοίχωμα της μήτρας, χάνουν σταδιακά την ικανότητα πολλαπλασιασμού και ρυθμίζουν την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών του εξωκυττάρου χώρου, μηχανισμοί που προάγουν τη μετατροπή του επιθηλιακού ιστού σε ενδοθήλιο [18]. Οι κυτταροτροφοβλάστες καταστέλλουν τους υποδοχείς του επιθηλίου όπως η ενδοθηλιακή καντερίνη (E-cadherin αβ4), οι οποίοι αντικαθίστανται από ενδοθηλιακά κυτταροσυνδετικά μόρια, όπως το κυτταρο-συνδετικό μόριο αιμοπεταλίων - ενδοθηλίου (PECAM), η αγγειακή - ενδοθηλιακή καντερίνη, το αγγειακό - κυτταροσυνδετικό μόριο - 1 (VCAM-1) και, τέλος, οι ιντεγκρίνες α4 και α5β3.

Στην ΠΕ η διαδικασία της μετατροπής των κυττάρων είναι επηρεασμένη με αποτέλεσμα οι κυτταροτροφοβλάστες να μην διαφοροποιούνται και να μην διεισδύουν στο μυομήτριο. Με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας σε βιοψίες πλακούντων προεκλαμπτικών γυναικών παρατηρούνται πολύ χαμηλά επίπεδα αγγειακής - ενδοθηλιακής καντερίνης, VCAM 1 και ιντεγκρίνης α5β3, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα κύτταρα «αδυνατούν» να εμφανίσουν ενδοθηλιακό φαινότυπο.

- *Τοπική ανεπάρκεια αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και PlGF*

Η «αδυναμία» μετατροπής των τροφοβλαστικών κυττάρων αποδίδεται σε τοπική ανεπάρκεια, των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και PlGF. Ο VEGF επάγει την παραγωγή της ιντεγκρίνης α5β3 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται στην αγγειογένεση και τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης [17]. Αυτοί οι

κυτταροτροφοβλάστες έχουν υποδοχείς VEGF, μεταξύ των οποίων και ο Fms-like tyrosine kinase 1 (Flt 1) υποδοχέας. Υψηλά επίπεδα του Flt 1 παρατηρούνται στους διεισδυτικούς κυτταροτροφοβλάστες, ακόμη και έξι εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, με αποτέλεσμα η σύνδεση του υποδοχέα με τους παράγοντες VEGF και PlGF να εμπλέκεται στους μηχανισμούς διείσδυσης και ψευδοαγγειογένεσης. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι παρατηρείται ελαττωμένη κύτταρο-κύτταρική επικοινωνία και ελαττωμένα επίπεδα ιντεγκρίνης α1. Επίσης, πλακούντες προεκλαμπτικών γυναικών εμφανίζουν ελαττωμένα επίπεδα VEGF mRNA, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο παράγοντας VEGF συσχετίζεται με την ανώμαλη πλακουντοποίηση (εικόνα 2) [18].



Εικόνα 2. Ο ρόλος των αγγειογενετικών παραγόντων στη πλακουντοποίηση σε κήσεις με προεκλαμψία και σε αυτές χωρίς την επιπλοκή [12].

1.1.2.2. Παράγοντες της μητέρας

Παρά το γεγονός ότι κατά την κύηση, η αρτηριακή πίεση και οι περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις ελαττώνονται φυσιολογικά, στην ΠΕ παρατηρούνται αυξημένες περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις [19]. Τα επίπεδα της αγγιοτενσίνης του πλάσματος και η δραστηριότητα της ρενίνης είναι ελαττωμένα, ενώ οι τιμές του παράγοντα αντιθρυψίνη (AT1) των αιμοπεταλίων είναι παρόμοιες με αυτές σε κύηση χωρίς την επιπλοκή. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν πιθανώς ότι η αυξημένη ανταπόκριση στην αγγιοτενσίνη που παρατηρείται στην ΠΕ δεν οφείλεται αποκλειστικά στην ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού υποδοχέων αγγιοτενσίνης [20].

Ο ρόλος της Ενδοθηλίνης 1, Θρομβοξάνης A2, Προστακυκλίνης

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα όσον αφορά το ρόλο των αγγειοσυσπαστικών παραγόντων στην εμφάνιση των συμπτωμάτων της ΠΕ στη μητέρα είναι ασαφή και συχνά αντικρουόμενα. Ο ρόλος της ενδοθηλίνης 1 (αγγειο-συσπαστική δράση) παραμένει ασαφής, παρά το ότι σε αρκετές μελέτες αναφέρονται αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα προεκλαμπτικών γυναικών. Η θρομβοξάνη A2 (TXA2), με επίσης αγγειοσυσπαστική δράση, παράγεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα αλλά και στους νεφρούς προεκλαμπτικών γυναικών, ο ρόλος της όμως παραμένει αδιευκρίνιστος [21]. Σύμφωνα με τους περισσότερους ερευνητές, η σύνθεση αγγειο-διασταλτικών ουσιών όπως π.χ. μονοξειδίου του αζώτου (NO) και προστακυκλίνης (PGI2), είναι ελαττωμένη στην ΠΕ. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές αναφέρουν φυσιολογικά ή ακόμα και αυξημένα επίπεδα NO. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στο ότι η σύνθεση του NO υπολογίζεται έμμεσα από τους μεταβολίτες της ουσίας που αποβάλλονται με τα ούρα. [22].

Οι Mills και συν. διερεύνησαν την έκκριση των μεταβολιτών της προσταγλανδίνης I2 (PGI2) και της θρομβοξάνης TXA2 στα ούρα 134 γυναικών τη 26^η - 29^η εβδομάδα κύησης και στην 36^η εβδομάδα που εμφάνισαν τελικά ΠΕ και ισάριθμων γυναικών που δεν εμφάνισαν την επιπλοκή. Στη μελέτη διαπιστώθηκε μειωμένη παραγωγή PGI2, ενώ καμία αύξηση στην παραγωγή TXA2 μεταξύ 13^{ης} - 16^{ης} εβδομάδας κύησης στις γυναίκες που εμφάνισαν ΠΕ. Επίσης, στις γυναίκες που εμφάνισαν την επιπλοκή, η αναλογία του μεταβολίτη TXA2 προς τον μεταβολίτη PGI2 ήταν κατά 24% υψηλότερη σε όλη τη διάρκεια της κύησης [23].

1.1.2.3. Η θεωρία της ταυτόχρονης δράσης παραγόντων της μητέρας και του πλακούντα

Παρά το ότι ο παθογενετικός μηχανισμός που σχετίζεται με την εμφάνιση της ΠΕ παραμένει σε σημαντικό βαθμό αδιευκρίνιστος φαίνεται ότι η εμφάνιση της επιπλοκής είναι αποτέλεσμα ταυτόχρονης δράσης παραγόντων της μητέρας και της μητροπλακουντιακής μονάδας.

Η έλλειψη της L-Arg που οφείλεται στην υπερπαραγωγή της αργινάσης έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη δραστηριότητα ή το μειωμένο χρόνο ημίσειας ζωής του NO με αποτέλεσμα διαταραχές της πλακουντοποίησης και προεκλαμπτική νόσο. Η υποξία που δημιουργείται από την ανώμαλη πλακουντοποίηση προκαλεί την έκκριση, στην μητρική κυκλοφορία, μορίων του πλακούντα όπως ο υποδοχέας sFlt1 και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν ενδοθηλιακές βλάβες και αργότερα βλάβες οργάνων που χαρακτηρίζουν την πλήρη κλινική εικόνα της επιπλοκής [24].

1.1.2.4. Η προεκλαμψία ως γενετική νόσος

Ενδείξεις για τη συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση ΠΕ προέρχονται από την παρατήρηση ότι υπάρχει προδιάθεση στις συγγενείς πρώτου βαθμού γυναικών που εμφάνισαν την επιπλοκή. Επιπλέον, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης ΠΕ σε μονοζυγωτικά δίδυμα σε σχέση με τα διζυγωτικά, αποδεικνύουν τη γονιδιακή συμμετοχή στην εκδήλωση της επιπλοκής. Το γεγονός όμως ότι και σε μονοζυγωτικά δίδυμα, η ΠΕ εμφανίζεται στην πρώτη εγκυμοσύνη, καθώς και η συσχέτιση της ΠΕ με χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου, υποδηλώνουν ότι και ο γονότυπος του εμβρύου (πατρικής προέλευσης), αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες ενέχονται στην αιτιολογία της ΠΕ [25].

Αν και ο ρόλος των γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια της ΠΕ είναι γενικά αποδεκτός, το πρότυπο κληρονομικότητας παραμένει αδιευκρίνιστο. Οι Nilsson και συν. πρότειναν ότι η προδιάθεση για ΠΕ κληρονομείται μέσω αυτοσωματικού υπολειπόμενου γονιδίου (συνήθως μητρικής προελεύσεως) ή επικρατητικού γονιδίου με ατελή διεισδυτικότητα. Πιο πιθανή σήμερα θεωρείται η άποψη που υποστηρίζει ότι η προδιάθεση για την εμφάνιση της επιπλοκής χαρακτηρίζεται από τη σύνθετη αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων γονιδίων της μητέρας με περιβαλλοντικούς παράγοντες και τον γονότυπο του εμβρύου [26]. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση των υπεύθυνων γενετικών περιοχών έδειξαν

ότι η ΠΕ είναι ένα γενετικά ετερογενές νόσημα που δεν κληρονομείται με τους απλούς νόμους του Mendel. Με τη χρήση μικροσυστοιχιών (arrays) καθώς και σε μετααναλύσεις διαπιστώθηκαν γενετικοί τόποι που περιέχουν γονίδια σημαντικά για την εμφάνιση ΠΕ που σχετίζονται με τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την πλακουντιοποίηση, την αγγειακή αναδιαμόρφωση και τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων [27].

1.1.3. Θεραπεία

Η θεραπεία της ΠΕ είναι συμπτωματική και έχει κύριο στόχο τον έλεγχο της υπέρτασης, την πρόληψη και καταστολή των σπασμών και την αποκατάσταση της οξεοβασικής ισορροπίας και των αιματολογικών διαταραχών. Χωρίς αμφιβολία ο τοκετός αποτελεί τη μοναδική ριζική θεραπεία [28].

Εάν η διαστολική αρτηριακή πίεση υπερβαίνει τα 110 mm Hg χορηγείται αντιυπερτασική αγωγή. Φάρμακο εκλογής θεωρείται η λαβεταλόλη ενώ εναλλακτικά χορηγούνται υδραλαζίνη και νιφεδιπίνη. Η χορήγηση θεικού μαγνησίου συνιστάται για την πρόληψη εμφάνισης ή υποτροπής σπασμών και σε σπάνιες περιπτώσεις για την αντιμετώπιση τους.

Για την επιλογή του χρόνου τερματισμού της κύησης λαμβάνονται υπ' όψιν οι κίνδυνοι για τη μητέρα και το έμβρυο, η ηλικία κύησης και η σοβαρότητα της υπερτασικής νόσου. Σε ήπια αρτηριακή υπέρταση, χωρίς άλλες επιπλοκές, ο τοκετός μπορεί να προγραμματιστεί σε ηλικία κύησης >37 εβδομάδων. Σε κάθε περίπτωση δεν θα πρέπει να καθυστερεί πέρα των 40 εβδομάδων. Σε περιπτώσεις σοβαρής ΠΕ, ο τοκετός μπορεί να προγραμματιστεί σε ηλικία κύησης περίπου 34 εβδομάδων ή επί σχετικών ενδείξεων ακόμη και νωρίτερα [29].

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα από ευρείας κλίμακας τυχαίοποιημένη μελέτη η καθημερινή χορήγηση μικρής δόσης ασπιρίνης <16 εβδομάδες κύησης σε εγκύους με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΕ δρα προστατευτικά και σχεδόν εκμηδενίζει την πιθανότητα εμφάνισης της επιπλοκής [30]. Η ίδια μελέτη αναφέρει πως η χορήγηση ασπιρίνης μετά τις 16 εβδομάδες κύησης δεν είναι αποτελεσματική και δεν μειώνει τον κίνδυνο σε εγκύους υψηλού κινδύνου.

1.1.4. Ανίχνευση κύσεων υψηλού κινδύνου για ΠΕ με συνδυασμό υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών

Όλες οι μελέτες των τελευταίων δεκαετιών, στην προσπάθειά τους να ανιχνεύσουν τις κτήσεις υψηλού κινδύνου για εκδήλωση ΠΕ, έχουν ασχοληθεί με συνδυασμό διαφορετικών παραμέτρων, γεγονός που προκύπτει από την πολυπαραγοντικότητα και πολυπλοκότητα της επιπλοκής η οποία δε φαίνεται, μέχρι σήμερα τουλάχιστον, να επιτρέπει τη χρήση ενός μοναδικού προγνωστικού δείκτη. Αυτοί καθαυτοί οι προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου, που ήδη αναφέρθηκαν, χρησιμοποιούνται από την επιστημονική κοινότητα προκειμένου να ταξινομηθούν οι κτήσεις σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου, χωρίς ωστόσο να επαρκούν αφού φαίνεται να ανιχνεύουν περίπου 40% των εγκύων που αναπτύσσουν ΠΕ.

Πιο συγκεκριμένα, το NICE έχει ορίσει κατευθυντήριες οδηγίες σύμφωνα με τις οποίες στην ομάδα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση ΠΕ ανήκουν οι έγκυες που έχουν είτε έναν προδιαθεσικό παράγοντα υψηλού κινδύνου είτε δύο παράγοντες μέσου κινδύνου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 [31].

Πίνακας 2: Παράγοντες Κινδύνου για εμφάνιση Προεκλαμψίας, ταξινομημένοι ως υψηλού και χαμηλού κινδύνου	
(Κατευθυντήριες οδηγίες NICE: 1 παράγοντας Υψηλού ή 2 Μέτριου Κινδύνου για ταξινόμηση των εγκύων σε ομάδα υψηλού κινδύνου για ΠΕ.)	
Υψηλού Κινδύνου	Μέτριου Κινδύνου
Ιστορικό υπέρτασικής νόσου σε προηγούμενη κύηση	Πρωτοτόκος
Χρόνια νεφρική νόσος	Ηλικία >40 ετών
Αυτοάνοσο νόσημα	Μεσοδιάστημα από προηγούμενη εγκυμοσύνη >10 έτη
Σακχαρώδης Διαβήτης	BMI >35 kg/m ² στην αρχή της κύησης
Χρόνια υπέρτασική νόσος	Οικογενειακό ιστορικό ΠΕ

Σύμφωνα με το Αμερικάνικο Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων (ACOG) ο πληθυσμιακός έλεγχος για τον κίνδυνο ανάπτυξης ΠΕ προκύπτει από το ιατρικό ιστορικό στο οποίο θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας ή περισσότεροι από τους εξής παράγοντες κινδύνου: πρωτοτόκος, ηλικία >40 ετών, BMI >30 kg/m², IVF, ιστορικό

προηγούμενης εγκυμοσύνης με ΠΕ, οικογενειακό ιστορικό ΠΕ, χρόνια υπερτασική νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια νεφρική νόσος, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος ή θρομβοφιλία [32].

Σύμφωνα με τις οδηγίες του NICE σε όλες τις κήσεις υψηλού κινδύνου για ΠΕ πρέπει να προτείνεται η προφυλακτική χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης, ενώ σύμφωνα με το ACOG η ασπιρίνη πρέπει να χορηγείται μόνο στις γυναίκες με ιστορικό ΠΕ σε >2 προηγούμενες κήσεις ή με ιστορικό ΠΠΕ [33].

Από τη μεριά του το FMF (Fetal Medicine Foundation) σε πρόσφατη μελέτη ανέδειξε ότι ο πληθυσμιακός έλεγχος σύμφωνα με τις οδηγίες του NICE ανιχνεύει περίπου 40% των εγκύων που θα αναπτύξουν ΠΕ, είτε πρώιμη είτε όψιμη, με 10% ψευδώς θετικά αποτελέσματα, και ο αντίστοιχος έλεγχος κατά το ACOG ανιχνεύει περίπου 90% με πολύ υψηλό, όμως, ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (64,2%).

Αντιθέτως ο αλγόριθμος που προτείνει το FMF, ο οποίος στοχεύει στην εξατομικευμένη εκτίμηση του κινδύνου για ΠΕ φαίνεται να αγγίζει το 100% στην ανίχνευση ΠΠΕ (<32 εβδομάδες κύησης), το 75% για ΠΕ <37 εβδομάδες και το 43% για ΠΕ>37 εβδομάδες κύησης, με 10% ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Ο αλγόριθμος αυτός στηρίζεται σε συνδυασμό δημογραφικών χαρακτηριστικών με υπερηχογραφικούς και βιοχημικούς δείκτες [34].

Αξίζει στο σημείο αυτό να γίνει μια σύντομη ανασκόπηση σημαντικών μελετών οι οποίες αναδεικνύουν την πορεία της έρευνας και κυρίως τη δυσκολία στην έγκυρη και έγκαιρη πρόγνωση της ΠΕ.

Η μεταλλοπρωτεϊνάση PAPP-A και ο παράγοντας PIGF έχουν πρόσφατα βρεθεί να είναι σημαντικά μειωμένοι κατά τη διάρκεια του 1^{ου} τριμήνου σε εγκύους που αργότερα εμφάνισαν πρώιμη ΠΕ, ενώ ήταν ήπια ελαττωμένοι στις γυναίκες που ανέπτυξαν όψιμη ΠΕ. Όταν οι μεταβλητές αυτές συνδυάστηκαν με στοιχεία του ατομικού ιστορικού, σε αλγορίθμους λογιστικής παλινδρόμησης για την πρώιμη ΠΕ, διαπιστώθηκε προγνωστική αξία 90% με 5% ψευδώς θετικά ευρήματα [35].

Μελέτες επιβεβαιώνουν την άποψη ότι η προσθήκη υπερηχογραφήματος Doppler των μητριάων αγγείων στους βιολογικούς δείκτες βελτιώνει την προγνωστική αξία των μεμονωμένων βιοχημικών δεικτών. Σε μία μελέτη, μάλιστα, η προσθήκη του PP-13, μιας ντισιντεγκρίνης που παράγεται αποκλειστικά από τον πλακούντα, στο Doppler των μητριάων αγγείων αύξησε την ευαισθησία της διάγνωσης πρώιμης ΠΕ από 40%

σε 90% με ειδικότητα 90%. Ανάλογα ήταν τα ευρήματα από μελέτες μεγάλης κλίμακας των Romero και *συν.* και των Spencer και *συν.*

Αντιθέτως, η χρήση μόνο του υπερηχογραφικού δείκτη παλμικότητας PI των μητριάων αρτηριών στο 1^ο τρίμηνο, είχε σε σύνολο οκτώ μελετών 25.4% ευαισθησία και 93.3% ειδικότητα [36]. Γίνεται, επομένως αντιληπτό ότι η προσθήκη βιολογικών δεικτών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του πλακούντα, μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη των γυναικών που θα αναπτύξουν ΠΕ αυξάνοντας την ευαισθησία ή μειώνοντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Σε εγκύους χαμηλού κινδύνου για ΠΕ, συνδυασμοί που περιλαμβάνουν την PP-13, την PAPP-A, την ακτιβίνη A ή την ινχιμπίνη A, στο 1^ο ή το 2^ο τρίμηνο της κύησης σε συνδυασμό με τον δείκτη παλμικότητας-PI ή την παρουσία κόμβου στο 2^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης έχουν ευαισθησία 60-80% και ειδικότητα >80%. Σε εγκύους υψηλού κινδύνου, ο συνδυασμός της PP-13 και του PI των μητριάων αγγείων, στο 1^ο τρίμηνο της κύησης, έδειξε πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα (90%) στην ανίχνευση του κινδύνου εμφάνισης ΠΕ. Η μελέτη όμως αυτή περιορίζεται σε εγκύους που αργότερα εμφάνισαν βαριά μορφή ΠΕ πριν τις 34 εβδομάδες κύησης.

Άλλοι συνδυασμοί δεικτών που έχουν μελετηθεί περιλαμβάνουν το συνδυασμό των μετρήσεων Doppler με τον ποσοτικό προσδιορισμό, είτε στο 1^ο είτε στο 2^ο τρίμηνο της κύησης, των PAPP-A και της ινχιμπίνης A που φαίνεται ότι μπορεί να έχουν καλή προγνωστική αξία και στις χαμηλού, αλλά και στις υψηλού κινδύνου κυήσεις.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των δεικτών στο περιφερικό αίμα εγκύων μπορεί να ανιχνεύσει έως και 42% των γυναικών που θα αναπτύξουν ΠΠΕ, αλλά όταν συνδυαστεί και με δημογραφικά χαρακτηριστικά της μητέρας, όπως φυλή, BMI, αριθμός τοκετών καθώς και ο δείκτης παλμικότητας PI των μητριάων αρτηριών, είναι εφικτή η ανίχνευση 88% των εγκύων που θα εμφανίσουν ΠΕ [35].

Οι Chaiworapongsa και *συν.* αναφέρουν ότι υψηλά επίπεδα sFlt-1 σχετίζονται με εμφάνιση σοβαρής και πρώιμης ΠΕ. Ωστόσο οι Robinson και *συν.* και Kim και *συν.* δεν παρατήρησαν διαφορά στη σοβαρότητα ή τη χρονική στιγμή εμφάνισης της ΠΕ ανάλογη προς τα επίπεδα του sFlt-1 στον ορό, αλλά διαπίστωσαν εμφανώς μειωμένο τον PlGF στη σοβαρή και πρώιμη ΠΕ [37-39].

Επίσης, μία μελέτη από τους Thadhani και συν. αναφέρει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών-μαρτύρων στα επίπεδα του PIGF, παρότι τα επίπεδα του sFlt-1, δεν παρουσίαζαν διαφορές στους δύο πληθυσμούς. [40].

Σε πρόσφατη μελέτη των Elkholi και συν., διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός του Doppler μητριάων αρτηριών και της PIGF για πρόβλεψη της ΠΕ έχει ευαισθησία και ειδικότητα 92.85% και 99.60%, αντίστοιχα, και ότι οι τιμές αυτές δεν μεταβάλλονται με την προσθήκη του PAPP-A [41]. Αντίθετα σε άλλη μελέτη οι Roop και συν. αναφέρουν ότι η προσθήκη του PAPP-A και PIGF στους παράγοντες κινδύνου της εγκύου μαζί και με τη μέτρηση του PI των μητριάων καθώς και της μέσης αρτηριακής πίεσης, εμφανίζει ποσοστό ανίχνευσης 93%, 61% και 38% για ΠΕ πριν τις 34 εβδομάδες κύησης, πριν τις 37 και πριν τις 42 εβδ. αντίστοιχα, με FPR 5%, και σε 96%, 77% και 54% αντίστοιχα με FPR 10% [42].

Από την ίδια επιστημονική ομάδα οι νεότερες μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυαστικός πληθυσμιακός έλεγχος στον οποίο περιλαμβάνονται οι παράγοντες κινδύνου της εγκύου (MF), ο δείκτης παλμικότητας των μητριάων αρτηριών (UAPI), η μέση αρτηριακή πίεση (MAP) και ο πλακουντικός αυξητικός παράγοντας (PLGF) προβλέπει την ΠΠΕ σε ποσοστό 75% και την όψιμη ΠΕ σε ποσοστό 47% , με 95% όρια αξιοπιστίας 10% ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (FPR). Η προσθήκη του PAPP-A δε φάνηκε να βελτιώνει τα ποσοστά ανίχνευσης [43]. Μία πρόσφατη δε, πολυκεντρική μελέτη σε 8.775 μονήρεις κυήσεις επιβεβαίωσε την αξιοπιστία των παραπάνω αλγορίθμων και ανέφερε ποσοστά ανίχνευσης 100% (95% CI 80-100), 75% (95% CI 62-85) και 43% (95% CI 35-50) για PE στις <32, <37 και >37 εβδομάδες κύησης αντίστοιχα, με 10% ψευδώς θετικά αποτελέσματα [34].

Σύμφωνα με πρόσφατες μετα-αναλύσεις καθώς και τα νεότερα δεδομένα από την ολοκλήρωση της μελέτης ASPRE, η βασικότερη φαρμακευτική αγωγή που προτείνεται προληπτικά σε κυήσεις υψηλού κινδύνου για εκδήλωση ΠΕ είναι η ασπιρίνη σε χαμηλές δόσεις με έναρξη πριν την 16^η εβδομάδα κύησης. Η προφυλακτική αυτή αγωγή μειώνει σημαντικά (πάνω από 50% τον κίνδυνο εμφάνισης ΠΕ και ελαττώνει τον πρόωρο τοκετό λόγω ΠΕ κατά 90% [44-46].

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις παραπάνω μελέτες, η πολυπλοκότητα της ΠΕ και η εν πολλοίς άγνοια που επικρατεί όσον αφορά την παθοφυσιολογία της έχουν οδηγήσει σε αλγορίθμους οι οποίοι περιλαμβάνουν συνδυασμό πολλών παραμέτρων και συχνά δεικτών οι οποίοι απαιτούν υψηλό κόστος και εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό

–όπως η υπερηχογραφική μέτρηση του δείκτη παλμικότητας των μητριάων αρτηριών σύμφωνα με συγκεκριμένα κριτήρια-.

Έχοντας κατά νου ότι ο ιδανικός βιοδείκτης για ΠΕ οφείλει να έχει τα χαρακτηριστικά της εύκολης, γρήγορης, απλής, οικονομικής, μη επεμβατικής μέτρησης και να μην εκθέτει την ασθενή σε δυσφορία ή κίνδυνο, η επιστημονική κοινότητα αναζητεί διαρκώς νέους τρόπους μελέτης και ανεύρεσης τέτοιων δεικτών και η πιο σύγχρονη τάση, που φαίνεται να διευρύνει σημαντικά τους ορίζοντες στο συγκεκριμένο πεδίο δράσης, είναι η πρωτεωμική.

1.2. ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

Ο όρος «πρωτεωμική» προέρχεται από τη σύντμηση των όρων «πρωτεΐνη» και «γενωμική» και διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον Marc Wilkins το 1996 προκειμένου να περιγράψει την πλήρη ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός βιολογικού συστήματος σε μία δεδομένη χρονική στιγμή ή κατάσταση. Με τον όρο αυτό, πρακτικά συνενώνονται όλες οι διαθέσιμες τεχνολογίες για την ανάλυση όλων των μοντέλων γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο πρωτεϊνών.

Ο ορισμός που έχει δοθεί από Kenyon και συν. 2002, είναι : «η γνώση της δομής, της λειτουργίας και της έκφρασης όλων των πρωτεϊνών στο βιοχημικό ή βιολογικό περιεχόμενο όλων των οργανισμών» [47].

Η πρωτεωμική επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των πρωτεωμάτων, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, με σκοπό τη διερεύνηση βιολογικών διεργασιών. Έχει τη δυνατότητα να μελετά μαζικά και ταυτόχρονα ένα τεράστιο αριθμό πρωτεϊνών όσον αφορά τη δομή τους, μετα-μεταφραστικές αλλαγές τους, αλληλεπιδράσεις με άλλα βιολογικά μόρια και μεταβολές σε επίπεδο έκφρασης σε παθολογικές καταστάσεις.

Η πρωτεωμική είναι πιο περίπλοκη από τη μελέτη των γονιδίων, γιατί ενώ το γονιδίωμα ενός οργανισμού είναι σταθερό, το πρωτέωμα μεταβάλλεται συνεχώς μέσω βιοχημικών αλληλεπιδράσεων με το γονιδίωμα και το περιβάλλον. Οι πρωτεΐνες είναι λειτουργικά μόρια και αντικατοπτρίζουν τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης, ενώ τα γονίδια είναι δυνατόν να υπάρχουν στο γονιδίωμα, αλλά να έχουν μεταλλαχθεί ή να

μην μεταφράζονται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των παραγόμενων mRNA να μην είναι ανάλογος του αριθμού των παραγόμενων τελικά λειτουργικών μορίων πρωτεΐνης. Επιπλέον, πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα τροποποίηση της λειτουργίας τους. Τέλος, οι πρωτεΐνες διαμορφώνουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA και λειτουργούν μόνο παρουσία αυτών των άλλων μορίων.

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και η αντιστοίχησή τους με τα γονίδια, δεδομένου ότι τόσο οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όσο και οι μεταβολές των τροποποιήσεων αυτών μπορούν να μεταφέρουν πιο σημαντικά μηνύματα από ότι οι μεταβολές στο επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης

1.2.1. Πρωτεωμική Ανάλυση

Η μελέτη του πρωτεώματος περιλαμβάνει:

1. τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτώματα με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE),
2. την ανίχνευση των πρωτεϊνών και
3. την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματογραφία μάζας.

Η διαδικασία της ταυτοποίησης εκτός από τις αναλυτικές αυτές τεχνικές περιλαμβάνει και εξαιρετικά εξειδικευμένο λογισμικό για την ανάλυση της εικόνας, τη σύγκριση των πηκτωμάτων, την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την αποθήκευση των αποτελεσμάτων σε βάσεις δεδομένων.

1.2.1.1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE)

Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον O'Farrell το 1975 και χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για το διαχωρισμό και την ανίχνευση των πρωτεϊνών και περιλαμβάνει καταρχήν την ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών (IHE) (1^η διάσταση) δηλαδή το διαχωρισμό τους με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και σε δεύτερο χρόνο το διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό τους βάρος (2^η διάσταση) με αποτέλεσμα την εμφάνιση εκατοντάδων πρωτεϊνών που καμία από τις υπάρχουσες

μεθόδους δεν μπορεί να επιτύχει [48]. Δεδομένης της ετερογένειας των πρωτεϊνών στα πηκτώματα δύο διαστάσεων, οι πρωτεΐνες αντιπροσωπεύονται συνήθως από περισσότερες από μία κηλίδες με αποτέλεσμα ο αριθμός των εκφραζόμενων προϊόντων να είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Επισημαίνεται ότι οι πρωτεΐνες είναι αμφοτερικά μόρια, φέρουν δηλαδή θετικό, αρνητικό ή ουδέτερο φορτίο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντός τους. Ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή του pH όπου το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, το άθροισμα δηλαδή όλων των αρνητικών και θετικών φορτίων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, καθώς και των αμινο- και καρβοξυ- άκρων, είναι μηδέν.

1.2.1.2. Ανίχνευση των πρωτεϊνών

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών μετά το διαχωρισμό στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης γίνεται με χρήση ραδιενεργών ή μη συστημάτων, η επιλογή των οποίων εξαρτάται από τη μέθοδο ταυτοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο της μελέτης. Η ραδιενεργός σήμανση είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος, αλλά είναι επικίνδυνη για το χρήστη, ακριβή και χρονοβόρα. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος είναι η φασματομετρία μάζας με χρώση κυανού της κουμασίνης, η οποία είναι οικονομική και γρήγορη, αλλά λιγότερο ευαίσθητη. Η χρώση με κυανό της κουμασίνης χρησιμοποιείται και για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα πηκτώματα γιατί η χρωστική προσδένεται στοιχειομετρικά με τις πρωτεΐνες και επιτρέπει τον καθορισμό των σχετικών ποσοτήτων [49].

1.2.1.3. Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματογραφία μάζας (MS analysis)

Μετά την 2DE η μαζική και ταχεία ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται και ανιχνεύονται στα πηκτώματα δύο διαστάσεων γίνεται με φασματογραφία μάζας. Οι κηλίδες των πρωτεϊνών αποκόπτονται μηχανικά από το πήκτωμα της ακρυλαμίδης και ακολουθεί αποχρωματισμός, επώαση με θρυψίνη και εκχύλιση των παραγόμενων πεπτιδίων από τα αποκοπέντα τμήματα του πηκτώματος. Η θρυψίνη είναι μία πολύ σταθερή σερινοπρωτεάση που κόβει αποκλειστικά μετά το C-τελικό άκρο των καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης, που βρίσκονται στις πρωτεΐνες σε ποσοστό ανά 10-12 αμινοξέα. Με τον τρόπο αυτό παράγονται πεπτίδια με ένα βασικό κατάλοιπο στο C-τελικό άκρο και με μέσο μέγεθος 800-2000Da. Μετά από περαιτέρω

θραυσματοποίηση τα παραγόμενα πεπτίδια ταυτοποιούνται στο φασματογράφο και έτσι φάσμα θραύσης ενός μόνο πεπτιδίου είναι δυνατόν να δώσει πληροφορίες για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης μέσω βάσεων δεδομένων.

1.2.2. Φασματογραφία μάζας - Αρχή λειτουργίας

Η φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια αναλυτική τεχνική η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με την στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών και την αναλογία ισότοπων ατόμων σε δείγματα.

Η ανάλυση περιλαμβάνει τα στάδια της ατμοποίησης, της μετατροπής ενός σημαντικού κλάσματος των ατόμων αυτών σε ρεύμα ιόντων (συνήθως μονοφορισμένα θετικά ιόντα), το διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio, m/z) και τέλος την απαρίθμηση των ιόντων της κάθε κατηγορίας ή τη μέτρηση του ρεύματος που παράγεται όταν τα σχηματιζόμενα από το δείγμα ιόντα προσπίπτουν σε κατάλληλο μεταλλάκτη.

Το φάσμα μάζας μιας ουσίας παρέχει με μορφή γραφήματος τις εντάσεις όλων των ληφθέντων m/z τιμών από τα ιόντα που σχηματίστηκαν. Τα ιόντα φέρουν μονό φορτίο. Το μετρούμενο m/z συνεπώς είναι ισοδύναμο με τη μάζα. Η παρουσία ενός δεύτερου φορτίου μετακινεί την κορυφή του φάσματος σχεδόν στο μισό της τιμής του μονά φορισμένου ιόντος. Για τον υπολογισμό των μαζών των ιόντων από το φασματογράφο χρησιμοποιούνται ειδικοί αλγόριθμοι. Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται στο χώρο και/ή το χρόνο με τη βοήθεια ηλεκτρομαγνητικών και /ή ηλεκτρικών πεδίων στο φασματογράφο μάζας.

1.2.3. Εφαρμογή της πρωτεωμικής στην ανίχνευση βιολογικών δεικτών

Η χρησιμοποίηση της νέας αυτής τεχνολογίας για τη μελέτη ιστών και βιολογικών υγρών επιτρέπει την αναγνώριση πρωτεϊνών που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη νόσο, στα διάφορα στάδια της εξέλιξης της και έχει τη δυνατότητα να συμβάλλει στην ταυτοποίηση βιολογικών δεικτών (biomarkers) για πρόωμη διάγνωση πρόληψη,

πρόγνωση και εκτίμηση της απόκρισης στη θεραπεία, αλλά και να οδηγήσει στο μέλλον στην παραγωγή θεραπευτικών ουσιών. Θεωρητικά, οποιαδήποτε πρωτεϊνική αλλαγή ή πρωτεϊνική τροποποίηση που είναι στενά συνδεδεμένη με μια νόσο είναι πιθανός βιολογικός δείκτης. Η πρωτεωμική έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών με έμφαση στην έρευνα διαφόρων μορφών καρκίνου, καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

1.2.3.1 Βιολογικοί δείκτες στην κύηση

Η χρησιμοποίηση της πρωτεωμικής για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών σε ιστούς και βιολογικά υγρά που σχετίζονται με την αναπαραγωγή και τον προγεννητικό έλεγχο ξεκίνησε πρόσφατα.

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του αμνιακού υγρού αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό βήμα για την ανίχνευση «βιολογικών δεικτών» που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προγεννητικό έλεγχο γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου ή την πρώιμη διάγνωση επιπλοκών της κύησης. Ο πρώτος πρωτεωμικός χάρτης αμνιακού υγρού 17^{ης} εβδομάδας κύησης ο οποίος καταγράφηκε μετά από χρήση των νέων τεχνικών μελέτης των πρωτεϊνών δημοσιεύτηκε το 1997, ενώ ο πρώτος πλήρης χάρτης αμνιακού υγρού ο οποίος περιλαμβάνει 136 πρωτεΐνες, δημοσιεύτηκε από τον Tsagaris και *συν.* [50-52]. Το 2007 οι Cho και *συν.* δημοσίευσαν τον πλέον εκτενή χάρτη αμνιακού υγρού 2^{ου} τριμήνου ο οποίος περιλαμβάνει 1026 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 842 διαφορετικά γονίδια. Στον κατάλογο των πρωτεϊνών περιλαμβάνονται και πρωτεΐνες όπως η β-χοριακή γοναδοτροπίνη και η PAPP-A οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως ως βιοχημικοί δείκτες πληθυσμιακού ελέγχου.

Η πρωτεωμική είναι ένα ισχυρό όπλο για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών που συνδέονται στενά με γενετικές ανωμαλίες του εμβρύου. Οι Tsagaris και *συν.* ταυτοποίησαν επτά πιθανούς βιολογικούς δείκτες για το σύνδρομο Down στο αμνιακό υγρό, όπως επίσης και η Manrou και *συν.* [53,54]. Το 2007 οι Nagalla και *συν.* έκαναν την πρώτη προσπάθεια για ταυτοποίηση πρωτεϊνών-βιολογικών δεικτών στο πλάσμα εγκύων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του συνδρόμου Down. Την ίδια χρονιά οι Kolialexi και *συν.* μελέτησαν δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυα με σύνδρομο Down στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης ηλεκτροφόρηση 2DE και φασματογραφία μάζας και

ταυτοποίησαν οκτώ πρωτεΐνες ως πιθανούς δείκτες μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου [55].

Αντίθετα, οι μελέτες που αφορούν τη χρησιμοποίηση των τεχνικών της πρωτεωμικής για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών διάγνωσης της ΠΕ είναι σποραδικές και περιορίζονται στην ανάλυση βιολογικών υγρών από κυήσεις μετά την 20^η εβδομάδα. Το κυριότερο πρόβλημα στη μελέτη της ΠΕ για την ανίχνευση δεικτών πρώιμης διάγνωσης εντοπίζεται στη συλλογή των δειγμάτων για ανάλυση, δεδομένου ότι ενώ οι μοριακές βλάβες που ευθύνονται για την επιπλοκή εγκαθίστανται πολύ νωρίς κατά την κύηση, στη φάση της εμφύτευσης και της πλακουντοποίησης, η επιπλοκή εκδηλώνεται κλινικά πολύ αργότερα στο 3^ο τρίμηνο ή λίγο πριν τον τοκετό.

Η πρώτη μελέτη αμνιακού υγρού από κυήσεις με ΠΕ με τη χρήση τεχνικών πρωτεωμικής δημοσιεύτηκε το 2005 από τους Park και *συν.* που ταυτοποίησαν δύο πρωτεΐνες, την απολιποπρωτεΐνη A-I και την SSBB412 με διαφορετική έκφραση σε περιπτώσεις ΠΕ. Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη οι Buhimischi και *συν.* σε μια προσπάθεια μη επεμβατικής πρώιμης διάγνωσης της ΠΕ, σύγκριναν δείγματα ούρων από κυήσεις 2^{ου} και 3^{ου} τριμήνου με ΠΕ και κυήσεις χωρίς την επιπλοκή και ταυτοποίησαν δύο πρωτεϊνικούς δείκτες, την αλβουμίνη και ένα κλάσμα της SERPINA-1, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για ΠΕ έως και 10 μέρες πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων [56].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

- 1) Χρησιμοποίηση μεθόδων πρωτεωμικής για την ταυτοποίηση στο περιφερικό αίμα εγκύων, κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης, πιθανών βιολογικών δεικτών πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση ΠΠΕ.
- 2) Επιβεβαίωση των ευρημάτων σε διευρυμένη ομάδα εγκύων.

Στη μελέτη ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE) και η ταυτοποίησή τους με φασματογραφία μάζας τύπου MALDI-TOF-MS/MS. Η διαφοροποιημένη έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών σε εγκύους που εμφάνισαν ΠΠΕ πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυματική τεχνική (ELISA). Σε όλες τις φάσεις διαχωρισμού, ανάλυσης και ταυτοποίησης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό.

Παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης της ΠΠΕ είναι πολύ χαμηλή (0,46% σε σχέση με 1,6% για την όψιμη ΠΕ) είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον κλινικό γιατρό η έγκαιρη ανίχνευση των κυήσεων με κίνδυνο για ΠΠΕ εξαιτίας των σοβαρών περιγεννητικών επιπλοκών με τις οποίες συνδέεται η επιπλοκή, όπως η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη του εμβρύου, ο εμβρυϊκός και νεογνικός θάνατος, και αναμφίβολα όλες οι σοβαρές περιγεννητικές επιπλοκές που σχετίζονται με την προωρότητα του νεογνού.

Η επίτευξη έγκαιρης ανίχνευσης με τη χρήση βιολογικών δεικτών οι οποίοι μπορούν να αναλυθούν με απλό, εύκολο, εύχρηστο και οικονομικό τρόπο είναι ο βασικός στόχος της σύγχρονης επιστημονικής έρευνας. Τα ευρήματα της μελέτης έχουν επιπλέον τη δυνατότητα να συμβάλλουν στη καλύτερη και πληρέστερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην ΠΠΕ, αλλά και στην ανάπτυξη νέων θεραπειών.

2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πρόκειται για μια αναδρομική μελέτη ασθενών-μαρτύρων για την οποία συλλέχθηκαν συνολικά 50 δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους που προσήλθαν για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου (11^{ης} - 13^{ης} εβδομάδας κύησης) για τη διερεύνηση ύπαρξης χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Οι έγκυες προσήλθαν στο Τμήμα Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Γ' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής ΕΚΠΑ στο ΓΠΝ ΑΤΤΙΚΟΝ και η αιμοληψία έγινε μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση (παράρτημα 1).

Από κάθε έγκυο συλλέχθηκαν 10ml φλεβικό αίμα σε EDTA το οποίο φυγοκεντρήθηκε σε 2500x g για 10 λεπτά στους 4⁰C. Στη συνέχεια τα δείγματα του πλάσματος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια και αποθηκεύτηκαν στους -80⁰C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Ταυτόχρονα, οι μαιευτήρες που συμμετείχαν στη μελέτη συνέλεξαν τα κλινικά δεδομένα όλων των γυναικών με τη χρήση πρότυπου ερωτηματολογίου (παράρτημα 2). Μετά την ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης, όταν η έκβαση ήταν πλέον γνωστή από τα ιατρικά αρχεία της κλινικής, συγκεντρώθηκαν 10 δείγματα από εγκύους που στην πορεία της κύησης εκδήλωσαν ΠΠΕ (σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν ήδη αναφερθεί) και 40 δείγματα από μη επιπλεγμένες κυήσεις (ομάδα ελέγχου). Στην ομάδα ελέγχου περιελήφθησαν δείγματα από εγκυμοσύνες ανάλογης ηλικίας κύησης και χρόνου παραμονής στους -80⁰C με αυτά από τις εγκύους οι οποίες εμφάνισαν ΠΠΕ. Όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν δεν είχαν προηγουμένως αποψυχθεί και επανατοποθετηθεί στους -80⁰C.

Στην πρώτη φάση της μελέτης, 5 δείγματα πλάσματος από εγκύους που εκ των υστέρων εμφάνισαν ΠΠΕ και 5 δείγματα από φυσιολογικές εγκύους (ομάδα ελέγχου), μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE) σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας τύπου MALDI-TOF-MS προκειμένου να ανιχνευθούν πρωτεΐνες με στατιστικώς σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στην ΠΠΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Στη δεύτερη φάση της μελέτης έγινε επιβεβαίωση της διαφοροποιημένης έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, σε διευρυμένη ομάδα δειγμάτων που περιελάμβανε όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη φάση καθώς και 40 επιπλέον

δείγματα από τα οποία 5 προέκυψαν από γυναίκες που εμφάνισαν ΠΠΕ και 35 από φυσιολογικές εγκύους.

Όλες οι γυναίκες που περιελήφθησαν στη μελέτη είχαν μονήρη κύηση, φυσιολογική αρτηριακή πίεση κατά την αιμοληψία, δεν εμφάνιζαν νεφρική δυσλειτουργία ή πρωτεϊνουρία και γέννησαν φαινοτυπικά φυσιολογικά νεογνά.

Η πραγματοποίηση της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής Δεοντολογίας του ΓΠΝ ΑΤΤΙΚΟΝ και διεξήχθη σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση της Διακήρυξης του Ελσίνκι.

2.2.1. Μέθοδοι

2.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Πέντε αποθηκευμένα δείγματα αποψύχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν σε 4000χg για 30 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν έμμορφα στοιχεία. Η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με το Protein 200 plus kit (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Germany) [53].

2.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DE) και ανάλυση εικόνων

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν ταυτόχρονα εις διπλούν με τις ίδιες συνθήκες ηλεκτροφόρησης προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και να αποφευχθούν αποκλίσεις λόγω τεχνικών αιτιών.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται αναλυτικά η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε.

Αναμείχθηκαν 750μg πλάσματος με 250μl ρυθμιστικό διάλυμα (7M urea, 2M thiurea, 50mM Tris-HCL (pH 8.5), 2% CHAPS, 0.4% dithioerythritol (DTE), 0.2% IPG buffer (pH 3-10) (Amersham Biosciences) και με 10μl μείγμα αναστολέων πρωτεϊνών (διάλυμα 1) (Roche Diagnostics, Basel, Swiss) και τοποθετήθηκαν σε ταινίες ακινητοποιημένης κλίσης pH (ταινίες IPG) (Bio-Rad Lab, Hercules, CA), εύρους ισοηλεκτρικού σημείου 3-10.

1^η διάσταση: Ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση 1^{ης} διαστάσεως ξεκίνησε στα 250V για 30 λεπτά και προοδευτικά αυξήθηκε σε 5000V, όπου διατηρήθηκε σταθερά για 25 ώρες (συνολικά, περίπου 85,000 Vh).

2^η διάσταση διαχωρισμού πρωτεϊνών με κάθετη ηλεκτροφόρηση

Στη 2^η διάσταση διαχωρισμού πρωτεϊνών με κάθετη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης διαστάσεων 18cm X 20cm X 1.5 mm περιεκτικότητας 12% (διάλυμα 2). Τα πηκτώματα πολυμερίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα αγαρόζης (διάλυμα 3) στις ταινίες IPG για την ομαλή μετάβαση των πρωτεϊνών από τις ταινίες στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σταθερό ρεύμα 40 mA/πήκτωμα χρησιμοποιώντας PROTEIN-II multicell apparatus (Bio-Rad Lab). Τα πηκτώματα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα βαφής Coomassie Blue G-250 (διάλυμα 4) (Novex, San Diego, CA) και σαρώθηκαν με σαρωτή-πυκνομετρητή (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, Italy). Η εικόνα αποθηκεύτηκε σε σκληρό δίσκο υπολογιστή για περαιτέρω ανάλυση και χρησιμοποιήθηκε λογισμικό PD-Quest v8.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, για ανίχνευση των πρωτεϊνικών κηλίδων, ποσοτικοποίηση και αντιστοίχιση με κάποια πρωτεΐνη. Η οπτική πυκνότητα (O.D.) (%) κάθε πρωτεΐνης από το δείγμα των ΠΠΕ ή των εγκύων της ομάδας ελέγχου προσδιορίστηκε ξεχωριστά και υπολογίστηκε ως το % ποσοστό επί του όγκου όλων των κηλίδων από όλα τα πηκτώματα που περιείχαν την ίδια πρωτεΐνη. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες επιλέχθηκαν με βάση τη διαφορά οπτικής πυκνότητας ανάμεσα στις δύο ομάδες και αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας φασματογραφία μάζας (MS). Αξιολογήθηκαν μόνο πρωτεϊνικές κηλίδες με ποσοτικές διαφορές >2 με επίπεδο σημαντικότητας 95% ($p < 0,05$).

2.2.1.3. Εξαγωγή πρωτεϊνικών κηλίδων από τα πηκτώματα 2DE-Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών κηλίδων με φασματομετρία μάζας.

Η επιλογή και εξαγωγή των πρωτεϊνικών κηλίδων από τα πηκτώματα έγινε με ειδικό ρομποτικό σύστημα (Proteiner SPII, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Ένας ψηφιακός σαρωτής χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών κηλίδων στο πήκτωμα και σαν πλατφόρμα πάνω στην οποία πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή των κηλίδων. Με χρήση κατάλληλου λογισμικού επιλέχθηκαν οι κηλίδες που θεωρούνται σημαντικές για περαιτέρω ανάλυση και ακολούθησε η προετοιμασία τους για ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- αποχρωματισμός κηλίδων με 150ml διαλύματος αποχρωματισμού (διάλυμα 5)
- αφυδάτωση σε κενό αέρος
- πέψη των πρωτεϊνών με 3μl/οπή διαλύματος θρυψίνης (διάλυμα 6)
- εξαγωγή των πεπτιδίων με προσθήκη 10μl διαλύματος εξαγωγής (διάλυμα 7)
- συγκρυστάλλωση των πεπτιδίων και μεταφορά αυτών με τη χρήση ρομποτικού οργάνου (MAP28 Bruker Daltonics, Germany) σε καθορισμένες θέσεις σε ειδική πλάκα.

Στη συνέχεια η πλάκα, αφού στέγνωσε, τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας τύπου MALDI-TOF MS (Ultraflex II, Bruker Daltonics, Germany) [44], όπου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- ιονισμός των πεπτιδίων με πρωτονίωση (δηλαδή απόκτηση θετικού φορτίου), αποτρέποντας έτσι τον κατακερματισμό των πεπτιδίων
- επιτάχυνση των ιονισμένων πεπτιδίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στο σημείο αυτό, ο χρόνος που απαιτείται για την κάθε ιονισμένο πεπτίδιο από το σημείο επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου ως τον ανιχνευτή είναι μοναδικός και χαρακτηριστικός για κάθε ιονισμένο πεπτίδιο (χρόνος πτήσης) και τελικά κάθε ιονισμένο πεπτίδιο που φθάνει στον ανιχνευτή δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα μάζας (peptide mass fingerprint-PMF).

Επειδή το πεπτιδικό αποτύπωμα δε δίνει από μόνο του πληροφορία για την πρωτεΐνη από την οποία προέρχεται, η αντιστοίχιση πεπτιδίου-πρωτεΐνης γίνεται μέσω βάσεων δεδομένων.

Το λογισμικό MASCOT (Matrix Sciences, London, UK) χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων πεπτιδίων και την αντιστοίχσή τους σε πρωτεΐνες. Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιεί τα δεδομένα του φασματογράφου και υποδεικνύει το μικρότερο δυνατό αριθμό πρωτεϊνικών μορίων που μπορούν θεωρητικά να σχηματιστούν από τις ταυτοποιημένες αλληλουχίες πεπτιδίων. Εν συνεχεία αντιστοιχεί τα δεδομένα του φάσματος με στοιχεία από βάσεις δεδομένων στις οποίες έχουν καταχωρηθεί χιλιάδες πεπτιδικόι χάρτες από πολλά είδη οργανισμών. Η τελική σύγκριση των πεπτιδικών χαρτών που προκύπτουν από την ανάλυση του φάσματος με

τους θεωρητικούς πεπτιδικούς χάρτες στις βάσεις δεδομένων είναι το βήμα που δίνει την ταυτοποίηση της πρωτεϊνικής κηλίδας από το πήκτωμα 2DE με συγκεκριμένη πρωτεΐνη [57,58]. Οι πρωτεΐνες με MASCOT score >50 και ποσοστό πεπτιδικής αλληλουχίας >20% με τα αντίστοιχα πεπτίδια από τις βάσεις δεδομένων, θεωρήθηκαν ως υποψήφιες για ανίχνευση.

2.2.2. Επιβεβαίωση της διαφοροποιημένης έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών

Η διαφοροποιημένη έκφραση τριών επιλεγμένων πρωτεϊνών [Beta-2-glycoprotein 1 (APOH), Vitronectin (VNCT) και Haptoglobin (HPT)] επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο ELISA σε 10 εγκύους που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ και 40 εγκύους χωρίς την επιπλοκή. Μετρήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών VNCT, HPT and APOH χρησιμοποιώντας ELISA kits από την εταιρεία Mabtech (Mabtech, Sweden), Takara (Takara, France) και Aviva systems biology (San Diego, USA) αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Η ELISA είναι μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ ενός σημασμένου και ενός μη σημασμένου αντιγόνου για την κάλυψη των ίδιων αντιγονικών θέσεων στο μόριο του αντισώματος.

2.2.3. Στατιστική Ανάλυση

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής της δραστηριότητας των μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τεστ Kolmogorov-Smirnov. Δεν υπήρχε κανονική κατανομή σε καμία από τις συνεχείς μεταβλητές, αλλά στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μόνο μη παραμετρικά τεστ. Συγκρίσεις των συνεχών αποτελεσμάτων στις δύο ομάδες έγιναν με το τεστ Mann-Whitney's U. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί ως μέσες τιμές. Οι ποιοτικές-κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται με το τεστ χ^2 . Ο έλεγχος Fisher χρησιμοποιήθηκε όπου ο αριθμός των περιπτώσεων ήταν κάτω από 5. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αν η μηδενική υπόθεση μπορούσε να απορριφθεί με όριο αξιοπιστίας >95% ($p < 0.05$). Για την ανάλυση όλων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό πακέτο SPSS 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.).

2.2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση

Η βάση δεδομένων PANTHER χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μοριακής και βιολογικής λειτουργίας που σχετίζεται με τη διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών [59].

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. Κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

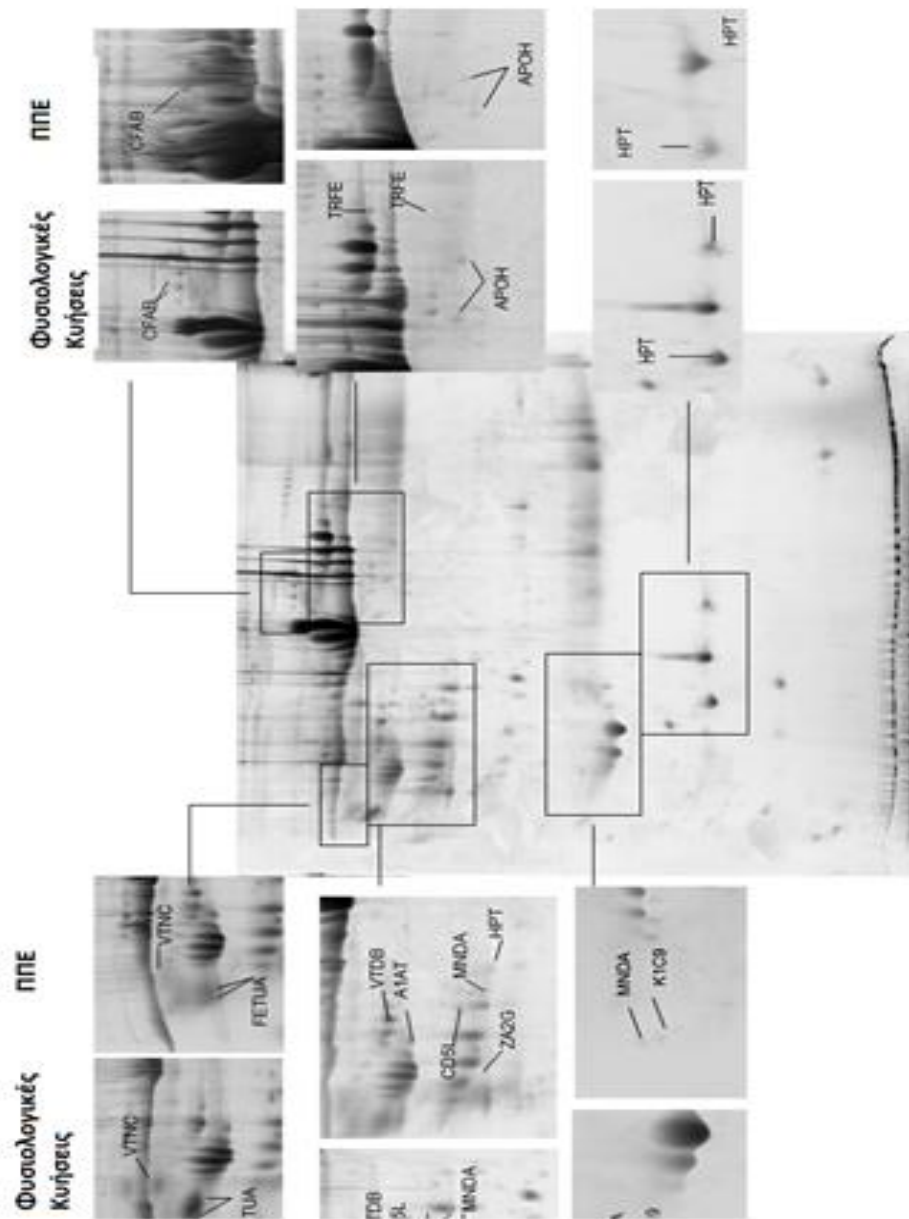
Πίνακας 3. Τα χαρακτηριστικά των εγκύων της ομάδας ελέγχου (controls) και των εγκύων που ανέπτυξαν ΠΠΕ		
Χαρακτηριστικά	Controls (n=40)	ΠΠΕ (n=10)
Μέση ηλικία μητέρας (έτη)	32.2 [28.8-37.3]	32.9 [27.3-35.0]
Μέση ηλικία κύησης κατά τη λήψη του δείγματος (σε εβδομάδες)	12.5 [11.4-13.3]	12.5 [11.4-13.3]
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	95 [90-100]	95 [90-105]
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	65 [60-80]	70 [60-80]
BMI προ εγκυμοσύνης (kg/m ²)	24.8 [22.5-26.2]	27.9 [23.4-32.9]§
Κάπνισμα, n (%)	35 (73%)	5 (50%)

Πρωτοτόκος	22 (55%)	8 (80%)
Πολυτόκος	18 (45 %)	2 (20%)
Οικογενειακό ιστορικό ΠΠΕ	0	0
<i>Σύλληψη</i>		
Αυτόματη	32 (80%)	10 (100%)
IVF	8 (20%)	0
<i>Ιατρικό Ιστορικό</i>		
Σακχαρώδης διαβήτης	0	0
Θρομβοφιλία	0	1

Η ηλικία των γυναικών στις δύο ομάδες είναι παρόμοια, ενώ ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) πριν την εγκυμοσύνη ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στην ομάδα των εγκύων που εκδήλωσαν ΠΠΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ομάδα των εγκύων που εκδήλωσαν αργότερα ΠΠΕ περιλάμβανε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό πρωτοτόκων (91,6% έναντι 60,4% από την ομάδα ελέγχου) και αυτόματων κυήσεων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (100% έναντι 87,5% στην ομάδα ελέγχου). Ποσοστό 73% των εγκύων της ομάδας ελέγχου δήλωσαν συστηματική χρήση καπνού κατά την κύηση, έναντι 50% των εγκύων που εκδήλωσαν ΠΠΕ.

2.3.2. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Ανιχνεύθηκαν κατά μέσο όρο 420 ± 18 πρωτεϊνικές κηλίδες ανά πήκτωμα 2DE και η έντασή τους εκτιμήθηκε με το λογισμικό PDQuest 8.0. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες με διαφορετική ένταση ανάμεσα στις ΠΠΕ και στην ομάδα ελέγχου, σε όλα τα δείγματα, αξιολογήθηκαν περαιτέρω με ανάλυση MALDI TOF MS για να προσδιοριστεί το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο (εικόνα 3).



Εικόνα 3: εικόνες πηκτωμάτων 2DE πλάσματος εγκύων της ομάδας ελέγχου (φυσιολογικές κυήσεις) και εγκύων που εμφάνισαν ΠΠΕ. Επισημαίνονται οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων και το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο όπως ταυτοποιήθηκε με φασματογράφο μάζας τύπου MALDI-TOF-MS

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στις εγκύους που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ, το σύμβολό, ο κωδικός πρόσβασης στη βάση SwissProt, το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο (PI), το MASCOT score (ο αριθμός αντίστοιχων πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών), το ποσοστό επικάλυψης στο πρωτεϊνικό μόριο και ο αριθμός των αντίστοιχων πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση, η μέση οπτική πυκνότητα και το επίπεδο έκφρασης όπως υπολογίστηκαν με το λογισμικό PDQuest. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έδειξε ότι έξι πρωτεΐνες, οι Alpha-1-antitrypsin (A1AT), CD5 antigen-like molecule (CD5L), Keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9), Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA), Transferrin (TRFE) και Vitamin D-binding protein (VTDB) υπερεκφράζονται στο πλάσμα εγκύων που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ. Έξι πρωτεΐνες, οι Alpha-2-HS-glycoprotein (FETUA), Beta-2-glycoprotein 1 (APOH), Complement factor B (CFAB), Haptoglobin (HPT), Vitronectin (VTNC) και Zinc-alpha-2-glycoprotein (ZA2G) υποεκφράζονται στην ίδια ομάδα.

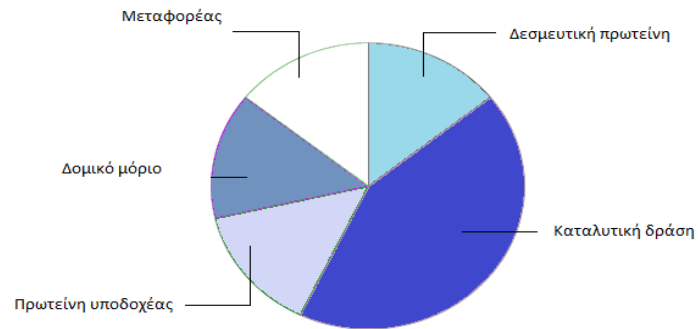
Πίνακας 4: Πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα 1 ^{ου} τριμήνου εγκύων οι οποίες εμφάνισαν αργότερα κατά την κύηση ΠΠΕ											
Συντομογραφία πρωτεΐνης	Όνομα πρωτεΐνης	Κωδικός στη SwissProt	Μοριακό βάρος	PI	Mascot score	Ποσοστό κάλυψης (%)	Αριθμός αντίστοιχων πεπτιδίων	Μέση οπτική πυκνότητα ± SD	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα με ΠΠΕ	Επίπεδο έκφρασης
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	P02765	40098	5.4	59	32	10/82	910.9±403.0	349.4±246.7		-0.38**
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 (APOH)	P02749	39584	9.5	57	52	14/149	89.4±30.4	67.9±18.8		-0.76*
CFAB_HUMAN	Complement factor B (CFB)	P00751	86847	6.7	68	26	15/102	354.5±422.8	85.2±28.1		-0.24**
HPT_HUMAN	Haptoglobin (HP)	P00738	45861	6.1	50	28	14/127	529.8±305.6	250.1±128.3		-0.47*
VTNC_HUMAN	Vitronectin (VTN)	P04004	55069	5.5	55	21	12/102	110.9±126.1	25.3±10.9		-0.23**
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1)	P25311	34465	5.7	58	42	11/95	227.2±321.8	114.4±113.2		-0.50*
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1)	P01009	46878	5.3	55	21	10/102	184.8±176.2	579.6±764.3		3.14**
CD5L_HUMAN	CD5 antigen-like (CD5L)	O43866	39603	5.2	66	39	10/85	76.9±24.8	167.3±11.4		2.18*
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 (KRT9)	P35527	62255	5	90	46	16/141	499.8±790.7	765.2±553.5		1.53*
MNDA_HUMAN	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	P41218	46092	10.3	55	31	13/101	499.8±790.7	765.2±553.5		1.53*
TRFE_HUMAN	Transferrin (TF)	P02787	79094	7	95	26	17/78	111.7±132.0	475.8±462.5		4.26**
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein (GC)	P02774	54526	5.3	112	50	19/121	119.7±205.7	404.5±273.5		3.38**

**p<0.005, *p<0.05

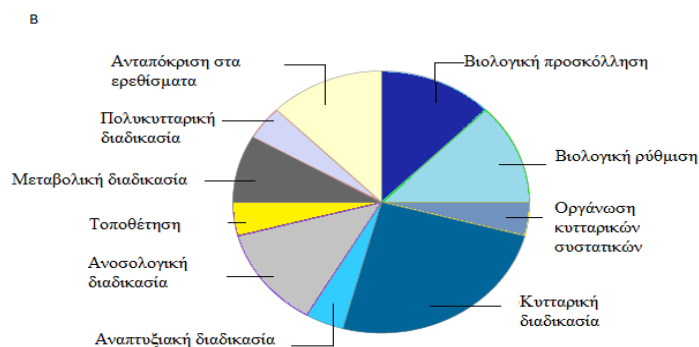
2.3.3 Βιοπληροφορική ανάλυση

Από την ανάλυση με το λογισμικό PANTHER προέκυψε ότι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις δυο ομάδες μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε ομάδες σύμφωνα με τη μοριακή τους λειτουργία (εικόνα 4A). Σύμφωνα με τις λειτουργίες τους κατατάχτηκαν ως πρωτεΐνες με καταλυτική δράση (42.9%), πρωτεΐνες υποδοχείς (14.3%), δεσμευτικές πρωτεΐνες (14.3%), μεταφορείς (14.3%) και δομικά μόρια (14.3%). Όσον αφορά την εντόπισή τους, εμφανίζονται στην εξωκυττάρια περιοχή (37.7%), ενδοκυττάρια (25%), στα κυτταρικά οργανίδια (12.5%), στις κυτταρικές μεμβράνες (12.5%) και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (12.5%). Τέλος, όσον αφορά το βιολογικό ρόλο αυτών των διαφοροποιημένα εκφραζόμενων πρωτεϊνών στις δύο ομάδες, η ανάλυση με το λογισμικό PANTHER έδειξε ότι οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (25%), την ανοσολογική αντίδραση (12.5%), στην ανταπόκριση σε ερεθίσματα (12.5%), τη ρύθμιση βιολογικών οδών (12.5%) ή είναι μόρια προσκόλλησης (12.5%) (εικόνα 4B).

A



Εικόνα 4Α: Ανάλυση με λογισμικό PANTHER της μοριακής λειτουργίας των μελετώμενων πρωτεϊνών. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις δυο ομάδες της μελέτης, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε ομάδες σύμφωνα με τη μοριακή τους λειτουργία.



Εικόνα 4B: Ανάλυση με λογισμικό PANTHER του βιολογικού ρόλου των μελετώμενων πρωτεϊνών. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση ανάμεσα στις δυο ομάδες της μελέτης, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με το βιολογικό τους ρόλο.

2.3.4. Επιβεβαίωση της διαφοροποιημένης έκφρασης επιλεγμένων υποψήφιων βιολογικών δεικτών με τη μέθοδο ELISA

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διαφοροποιημένη έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών από την πρώτη φάση της μελέτης και να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης των τριών υποψήφιων βιολογικών δεικτών (ΑΡΟΗ, VTNC και ΗΡΤ) σε 10 εγκύους που αργότερα ανέπτυξαν ΠΠΕ και σε 40 υγιείς από την ομάδα ελέγχου. Η διάμεση συγκέντρωση της ΑΡΟΗ στο πλάσμα εγκύων που αργότερα ανέπτυξαν ΠΠΕ ήταν 105.82ng/mL [88.23-202.16] στη ΠΠΕ έναντι 340.09ng/mL [155.97-3122.12] ($p=0.01$) στην ομάδα ελέγχου, της VTNC ήταν 44.04ng/mL [24.91-64.51] στις ΠΠΕ έναντι 193.30ng/mL (118.92-508.73) ($p<0.001$)

στην ομάδα ελέγχου και για την HPT ήταν 57.47ng/mL [45.97-82.95] έναντι 76.83ng/mL [52.49-109.50] ($p<.001$) στην ομάδα ελέγχου.

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρά την πρόοδο στον τομέα της προγεννητικής διάγνωσης, η ΠΕ, και ειδικότερα η πρόωμη μορφή της επιπλοκής, εξακολουθεί να αποτελεί ίσως την κυριότερη αιτία περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας, πιθανώς λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της επιπλοκής, όπως η καθυστερημένη διάγνωση, η ετερογένεια των κλινικών συμπτωμάτων και η αδυναμία αποτελεσματικής θεραπείας. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας 700.000 νεογνά χάνονται κάθε χρόνο διεθνώς από την επιπλοκή [60].

Η πρόοδος που έχει συντελεστεί στον τομέα είναι μεγάλη, καθώς ο συνδυασμός υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών είναι σε θέση να προσφέρει έγκαιρη ανίχνευση κήσεων υψηλού κινδύνου για ΠΠΕ. Σε πρόσφατες μελέτες τα ποσοστά ανίχνευσης φαίνεται να αγγίζουν το 100%, αλλά με 10% ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και η προφυλακτική θεραπεία που προτείνεται για μείωση των επιπλοκών είναι η ασπιρίνη [34].

Εξακολουθεί, όμως, να υπάρχει ανάγκη για έναν ή περισσότερους δείκτες οι οποίοι να εξυπηρετούν τα κριτήρια: μη επεμβατικοί, χαμηλού κόστους και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού, ώστε να μπορεί η ανίχνευσή τους να εφαρμοστεί για το μεγαλύτερο δυνατό εύρος του πληθυσμού. Οι δείκτες αυτοί μπορεί να συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή την περίπλοκη και πολυπαραγοντική επιπλοκή της κύησης, και κατά συνέπεια να οδηγήσουν στην ανεύρεση νέων αποτελεσματικών θεραπειών.

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται στο πλαίσιο της παγκόσμιας ερευνητικής προσπάθειας για ταυτοποίηση δεικτών πρόωμης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου για εμφάνιση επιπλοκών που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν έγκαιρα, ήδη από το 1^ο τρίμηνο της κύησης, με ασφάλεια και αξιοπιστία από όλες τις εγκύους, ανεξαρτήτως του κινδύνου που προκύπτει από το ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αποτελεί σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία μέθοδο επιλογής για την ανίχνευση «βιολογικών δεικτών». Έχει τη δυνατότητα να ερευνά ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, να ανιχνεύει ποιοτικές, αλλά και ποσοτικές διαφορές της πρωτεϊνικής σύνθεσης ιστών ή και βιολογικών υγρών και να ταυτοποιεί τελικά «πάνελ» βιολογικών δεικτών που παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη.

Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στο σχεδιασμό της μελέτης και τη συλλογή του υλικού.

Συλλέχθηκαν συνολικά 50 δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους που προσήλθαν για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου (11^{ης} - 13^{ης} εβδομάδας κύησης) για τη διερεύνηση ύπαρξης χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Οι γυναίκες αυτές καταχωρήθηκαν στο ιατρικό αρχείο και οι μαιευτήρες που συμμετείχαν στη μελέτη κατέγραψαν την εμφάνιση ή μη ΠΠΕ αργότερα και την έκβαση της κάθε κύησης.

Στο σύνολο των 50 δειγμάτων που συλλέχθηκαν, 10 δείγματα αντιστοιχούσαν σε εγκύους που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ, με μέση ηλικία τα 32 έτη και αυτόματη σύλληψη. Τα δείγματα της ομάδας ελέγχου προέρχονταν από γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας κύησης με τις γυναίκες που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ, γιατί η σύνθεση των πρωτεϊνών του περιφερικού αίματος της εγκύου εξαρτάται άμεσα από την ηλικία κύησης.

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αποθηκεύτηκαν στους -80⁰C σε στείρες συνθήκες, μετά από προσθήκη αναστολέων πρωτεασών που εμποδίζουν την πρωτεόλυση και τη μετουσίωση ειδικά των χαμηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνικών μορίων.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με 2DE. Η τεχνική, παρά το ότι είναι χρονοβόρα, θεωρείται αξιόπιστη για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά. Πριν τον διαχωρισμό έγινε αποδιάταξη των πρωτεϊνών με χρήση κατάλληλων διαλυμάτων προκειμένου να αυξηθεί η διαχωριστική ικανότητα της 2DE και να αποφευχθεί η εμφάνιση ψευδών κηλίδων.

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με φασματογραφία μάζας τύπου MALDI-TOF η οποία χαρακτηρίζεται ως τεχνική μεγάλης απόδοσης λόγω της δυνατότητας να αναλύει γρήγορα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Επειδή, όμως, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε επιμολύνσεις από οργανικά και ανόργανα ιόντα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην εξασφάλιση στειρών συνθηκών σε όλα τα στάδια της μελέτης, ώστε να αποφευχθούν

τυχόν επιμολύνσεις που θα μπορούσαν να προκαλέσουν προβλήματα στη σημαντικότητα του σήματος λόγω «θορύβου» στα φάσματα.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με αυστηρά κριτήρια. Μόνο πρωτεϊνικές κηλίδες με αποτέλεσμα Mascot >50 και πιθανότητα λάθους <0,005 αξιολογήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν. Στην ομάδα των υποψήφιων βιολογικών δεικτών συμπεριλήφθησαν μόνο πρωτεΐνες που εμφάνιζαν σταθερά διαφοροποιημένη έκφραση >2, με επίπεδο σημαντικότητας 95% ($p < 0.05$) στα υπό μελέτη δείγματα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όπως μετρήθηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού.

Αναλύθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από γυναίκες κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, όταν γίνεται ο πληθυσμιακός έλεγχος για χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου.

Δεδομένης της μικρής συχνότητας εμφάνισης της επιπλοκής, και του περιορισμένου χρόνου διάρκειας της μελέτης, αναλύθηκε σημαντικός αριθμός δειγμάτων από εγκύους που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ. Για όλες τις εγκύους τηρήθηκε λεπτομερές ιστορικό με σύστημα καταγραφής σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Όπως προκύπτει από τα στοιχεία του ατομικού ιστορικού, η ηλικία της εγκύου καθώς και οι τιμές της αρτηριακής πίεσης κατά την πρώτη εξέταση δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ο BMI ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα των γυναικών που εμφάνισαν ΠΠΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας [61-63]. Σημαντική πλειοψηφία των εγκύων που εκδήλωσαν ΠΠΕ ήταν πρωτοτόκες (80% έναντι 55% στην ομάδα των εγκύων που δεν εμφάνισαν την επιπλοκή). Σε ό,τι αφορά τον παράγοντα «κάπνισμα» η ομάδα ελέγχου υπερείχε σημαντικά στην κατανάλωση καπνού έναντι των εγκύων που εκδήλωσαν ΠΠΕ.

Σημαντικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων -δεδομένης της σπανιότητας εμφάνισης της πρώιμης επιπλοκής και του χρόνου διάρκειας της μελέτης- καθώς και το ότι η συλλογή των δειγμάτων έγινε προοπτικά από γυναίκες στο πρώτο τρίμηνο κύησης με πολύ αυστηρά κριτήρια επιλογής για να αποφευχθούν συγχυτικοί παράγοντες (bias). Η αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε, επίσης, με πολύ αυστηρά κριτήρια και με τη χρήση υψηλής τεχνολογίας πρωτεωμικής.

Οφείλουμε, όμως, να αναγνωρίσουμε τους περιορισμούς από τη χρήση 2DE τεχνικής, καθώς δεν επιτρέπει την ανίχνευση διαφοροποιημένης έκφρασης πρωτεϊνών χαμηλής

συγκέντρωσης οι οποίες πιθανώς καλύπτονται από εκείνες με μεγάλη συγκέντρωση όπως η αλβουμίνη και οι ανοσοσφαιρίνες.

Με τη χρήση των τεχνικών πρωτεωμικής ανιχνεύτηκαν στο περιφερικό αίμα εγκύων 12 πρωτεΐνες με στατιστικώς σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στις εγκύους που εμφάνισαν αργότερα ΠΠΕ σε σχέση με αυτές που δεν εμφάνισαν την επιπλοκή. Πιθανώς αυτό να οφείλεται σε διαφορετική έκκριση των πλακουντικών πρωτεϊνών στην κυκλοφορία της εγκύου, λόγω της πλακουντικής ισχαιμίας και στη συσσώρευση παραγόντων της μητέρας ως αποτέλεσμα διαταραχών των σηματοδοτικών οδών. Έξι πρωτεΐνες (A1AT, CD5L, K1C9, MNDA, TRFE και VTDB) διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζονται στο πλάσμα εγκύων που αργότερα ανέπτυξαν ΠΠΕ και άλλες έξι, (FETUA, APOH, CFAB, HPT, VTNC, ZA2G) υποεκφράζονται σημαντικά στον ίδιο πληθυσμό γυναικών. Οι περισσότερες από τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες σχετίζονται με τη μεταβολική (A1AT, CD5L, TRFE) και αναπτυξιακή διαδικασία (CD5L, K1C9), ενώ οι περισσότερες από τις υποεκφρασμένες πρωτεΐνες σχετίζονται με τον ανοσολογικό μηχανισμό (FETUA, HPT, APOH, CFAB, VTNV), χωρίς, προς το παρόν τουλάχιστον, να είναι δυνατή η ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου παθογενετικού μηχανισμού που να εξηγεί τον τρόπο με τον οποίο οι αλλαγές στους υποψήφιους βιολογικούς δείκτες που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη σχετίζονται μεταξύ τους και εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό της ΠΠΕ.

Στο πλάσμα των εγκύων οι οποίες ανέπτυξαν αργότερα ΠΠΕ ανιχνεύθηκε τριπλάσια συγκέντρωση της πρωτεΐνης A1AT (γνωστή και ως SERPINA1) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων μελετών που έδειξαν υπερέκφραση της A1AT στο πλάσμα εγκύων με κλινικά συμπτώματα σοβαρής ΠΕ σε σχέση με εγκύους χωρίς τη συγκεκριμένη επιπλοκή [45-47]. Οι Buhimcschi και συν., διαπίστωσαν την παρουσία ενός θραύσματος της A1AT στα ούρα εγκύων πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΕ [56]. Η A1AT είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης που εμπλέκεται στην προστασία των ιστών από τη δράση ενζύμων που εκλύονται κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία. Η υπερέκφρασή της A1AT στο πλάσμα εγκύων κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης υποδηλώνει ότι πιθανώς η φλεγμονή αποτελεί πρώιμο γεγονός που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΠΠΕ. Η ανάλυση με μεθόδους πρωτεωμικής επιβεβαίωσε την υπερέκφραση της TRFE στο πλάσμα εγκύων κατά το 1^ο τρίμηνο, οι οποίες ανέπτυξαν αργότερα ΠΠΕ, όπως είχε νωρίτερα αναφερθεί από τη μελέτη των Kolla και συν. και ανέδειξε επίσης υψηλά

επίπεδα της VTDB [64]. Η υπερέκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών μπορεί να αποδοθεί στη συμμετοχή της φλεγμονώδους αντίδρασης στην εμφάνιση της ΠΠΕ. [65-68]. Η TRFE είναι μεταφορέας σιδήρου και προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ η VTDB εμπλέκεται στη μεταφορά της βιταμίνης D. Στη διάρκεια της κύησης έχει βρεθεί στατιστικώς σημαντική υπερέκφραση της TRFE στη συγκυτιοτροφοβλάστη των γυναικών με ΠΕ σε σχέση με τις φυσιολογικές κύσεις, πιθανώς λόγω εμβρυικού στρες [69].

Η πρωτεΐνη K1C9, εκφράζεται κυρίως στο δέρμα. Πρόσφατες όμως μελέτες έχουν αναφέρει έκφραση της πρωτεΐνης και στις μεμβράνες των κυττάρων φυσικών-φονέων, σε εξωκυτταρικά εξωσώματα του σπέρματος, τα δάκρυα, το ωοθυλακικό υγρό, και το πλάσμα. Μελέτες έχουν αναφέρει συσχέτιση της K1C9 με την παθολόγηση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, του ηπατοκυτταρικού καρκίνου και της νόσου Alzheimer [70,71]. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης K1C9, που διαπιστώθηκε στη παρούσα μελέτη, πιθανώς σχετίζεται με διαταραχή των ρυθμιστικών οδών που εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό της ΠΠΕ.

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση και των πρωτεϊνών MNDA, και CD5L στο πλάσμα ασυμπτωματικών εγκύων που αργότερα ανέπτυξαν ΠΠΕ. Η MNDA προάγει την απόπτωση και πιθανώς σχετίζεται με την ανοσολογική αντίδραση [72]. Η CD5L αναστέλλει την απόπτωση και ρυθμίζει το μηχανισμό της φλεγμονής, της λοίμωξης και της αθηρωμάτωσης [73].

Ο ρόλος της φλεγμονής σε πρώιμο στάδιο για εγκύους που αργότερα εμφάνισαν ΠΠΕ, υποστηρίζεται από τα μειωμένα επίπεδα των FETUA και HPT. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι αρνητικοί ρυθμιστές στην οξεία φάση της φλεγμονώδους διαδικασίας. Τα μειωμένα επίπεδα FETUA στο αίμα έχουν αναφερθεί ως διαγνωστικός δείκτης για την ΠΠΕ [74-76]. Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση μεταξύ των επιπέδων της HPT και της ΠΠΕ. Οι Aginola και *συν.* αναφέρουν ότι τα επίπεδα της HPT στον ορό είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ΠΠΕ συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου, ενώ σύμφωνα με τους Olsson και *συν.*, τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης είναι σημαντικά μειωμένα στις γυναίκες με ΠΠΕ. [77,78]. Η πρωτεΐνη ZA2G, που υπερεκφράζεται στις γυναίκες με ΠΠΕ, συμμετέχει στην ομοίωση, αποθήκευση και αποδόμηση του λίπους στα λιπώδη κύτταρα. Ελαττωμένη έκφρασή της έχει σοβαρές επιπτώσεις στην επιβίωση του οργανισμού και έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση [79].

Ανιχνεύθηκαν, επίσης, σημαντικά μειωμένα επίπεδα δύο πολύ-λειτουργικών γλυκοπρωτεϊνών, APOH και VTNC, σε γυναίκες με ΠΠΕ και τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με ELISA. Η APOH εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στην απόπτωση, στην αγγειογένεση, αθηρογένεση, πήξη και φλεγμονή, ενώ στις βιολογικές της δράσεις περιλαμβάνονται η κυτταρική προσκόλληση, η ρύθμιση της ινοδάλυσης, πήξης και άμυνας του οργανισμού, διαδικασίες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΠΠΕ [80]. Μειωμένα επίπεδα VTNC έχουν ανιχνευθεί σε προεκλαμπτικές εγκύους και σε εγκύους υψηλού κινδύνου για ΠΕ στο δεύτερο τρίμηνο (16-21 εβδομάδες κύησης) [81,82]. Οι Blumenstein και συν. ανέφεραν, επίσης, διαφοροποιημένη έκφραση μορίου μεγέθους 75-kDa single-chain VTNC αρκετές εβδομάδες πριν την εμφάνιση της ΠΕ. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η VTNC στο πλάσμα εγκύων πιθανώς σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΕ και μπορεί κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης της επιπλοκής [68].

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που αποσκοπούν στην ανίχνευση υποψήφιων βιολογικών δεικτών για την πρόιμη ταυτοποίηση γυναικών με κίνδυνο για ΠΠΕ, στοχεύοντας σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες πιθανές να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην εκδήλωση της επιπλοκής. Ωστόσο, μόνο λίγες από αυτές τις μελέτες είχαν ως σκοπό τη σύγκριση όλου του πρωτεωμικού πλάσματος πρώτου τριμήνου ασυμπτωματικών εγκύων που αργότερα εκδήλωσαν ΠΠΕ, σε σχέση με εγκύους χωρίς την επιπλοκή [83,84].

Η νοσηρότητα εξαιτίας της ΠΠΕ παραμένει συνολικά υψηλή, γεγονός που οδηγεί σε επιτακτική ανάγκη για αποτελεσματικούς κλινικούς δείκτες οι οποίοι θα μπορούν να ανιχνεύσουν τις εγκύους υψηλού κινδύνου σε πρώιμο στάδιο της κύησης. Οι δείκτες αυτοί έχουν τη δυνατότητα να προσφέρουν ευκαιρίες για έγκαιρη φροντίδα τόσο των εγκύων όσο και των εμβρύων και να αναδείξουν νέες θεραπείες. Περαιτέρω αξιολόγηση των πρωτεϊνών μαζί με τα κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων σε ευρείας κλίμακας μελέτες είναι απαραίτητη, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους σε κλινικό επίπεδο για την πρόιμη ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση ΠΠΕ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η χρησιμοποίηση της 2DE σε συνδυασμό με τη MALDI-TOF-TOF MS/MS επέτρεψαν την ανίχνευση 12 πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση σε εγκύους οι οποίες ανέπτυξαν ΠΠΕ σε σχέση με τις εγκύους χωρίς την επιπλοκή.
- Οι A1AT, CD5L, K1C9, MNDA, TRFE και VTDB υπερεκφράζονται στις εγκύους που θα εμφανίσουν ΠΠΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Οι FETUA, APOH, CFAB, HPT, VTNC, ZA2G υποεκφράζονται στις εγκύους που θα εμφανίσουν ΠΠΕ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στους δύο πληθυσμούς εγκύων εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (25%), την ανοσολογική αντίδραση (12.5%), στην ανταπόκριση σε ερεθίσματα (12.5%), τη ρύθμιση βιολογικών οδών (12.5%) ή είναι μόρια προσκόλλησης (12.5%).
- Σύμφωνα με τις λειτουργίες τους οι μελετώμενες πρωτεΐνες κατατάσσονται σε πρωτεΐνες με καταλυτική δράση (42.9%), πρωτεΐνες υποδοχείς (14.3%), δεσμευτικές πρωτεΐνες (14.3%), μεταφορείς (14.3%) και δομικά μόρια (14.3%).
- Όσον αφορά την εντόπισή τους, οι μελετώμενες πρωτεΐνες εμφανίζονται στην εξωκυττάρια περιοχή (37.7%), ενδοκυττάρια (25%), στα κυτταρικά οργανίδια (12.5%), στις κυτταρικές μεμβράνες (12.5%) και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (12.5%).
- Οι 12 πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στους δύο πληθυσμούς αποτελούν πιθανούς βιολογικούς δείκτες για την πρόιμη ανίχνευση των εγκύων που θα αναπτύξουν ΠΠΕ.
- Περαιτέρω αξιολόγηση των υποψήφιων βιολογικών δεικτών για την ΠΠΕ, που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι απαραίτητη σε ευρύτερη κλίμακα, η οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει δείγματα από εγκύους με ανευπλοειδικά έμβρυα, αλλά και από εγκύους με άλλες επιπλοκές κατά την κύηση εκτός της ΠΠΕ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η ανίχνευση βιολογικών δεικτών στο 1^ο τρίμηνο της κύησης για την ταυτοποίηση εγκύων οι οποίες πρόκειται να αναπτύξουν πρόωμη προεκλαμψία (ΠΠΕ).

Σχεδιασμός μελέτης: Ελήφθησαν δείγματα αίματος από εγκύους στο διάστημα 11-13 εβδομάδων κύησης. Οι έγκυες παρακολουθήθηκαν μέχρι τον τοκετό. Αναλύθηκαν 5 δείγματα από εγκύους που αργότερα ανέπτυξαν ΠΠΕ και 5 δείγματα από εγκύους που δεν εμφάνισαν την επιπλοκή, με τη μέθοδο 2-DE και MALDI-TOF-TOF MS/MS. Η διαφοροποιημένη έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο ELISA σε διευρυμένο δείγμα.

Αποτελέσματα: Δώδεκα πρωτεΐνες παρουσίασαν διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα των εγκύων οι οποίες ανέπτυξαν κατά την κύηση ΠΠΕ σε σύγκριση με τις εγκύους χωρίς την επιπλοκή. Οι πρωτεΐνες Alpha-1-antitrypsin (A1AT), CD5 antigen-like molecule (CD5L) Keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9), Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA), Transferrin (TRFE) και Vitamin D-binding protein (VTDB) διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζονται σε εγκύους που εμφάνισαν ΠΠΕ, κατά 3.14, 2.18, 1.53, 4.26, 3.38 φορές αντίστοιχα, ενώ οι Alpha-2-HS-glycoprotein (FETUA), Beta-2-glycoprotein 1 (APOH), Complement factor B (CFAB), Haptoglobin (HPT), Vitronectin (VTNC) και Zinc-alpha-2-glycoprotein (ZA2G) υποεκφράζονται κατά -0.38, -0.76, -0.24, -0.47, -0.23, και -0.50 αντίστοιχα. Η υποέκφραση των APOH, VTNC και HPT επιβεβαιώθηκε με τη χρήση ELISA.

Συμπεράσματα: Οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση αποτελούν υποψήφιους βιολογικούς δείκτες για έγκαιρη ανίχνευση της ΠΠΕ. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερα πειράματα και μελέτες για καλύτερη αξιολόγηση της χρησιμότητάς τους.

ABSTRACT

Objective: To identify potential biomarkers in the 1st trimester of pregnancy for the identification of women destined to develop early onset preeclampsia (EOPE)

Methods: Blood samples were obtained from pregnant women at 11-13 weeks of gestation. Women were followed up until delivery. Five samples from EOPE complicated pregnancies and 5 from unaffected ones were analysed using 2-DE and MALDI-TOF-TOF MS/MS. The altered expression of selected proteins was verified by ELISA in an extended sample cohort.

Results: Twelve proteins were differentially expressed in the plasma of women who subsequently developed EOPE as compared to controls. Alpha-1-antitrypsin (A1AT), CD5 antigen-like molecule (CD5L) Keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9), Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA), Transferrin (TRFE) and Vitamin D-binding protein (VTDB) were up-regulated with fold changes 3.14, 2.18, 1.53, 4.26, 3.38 respectively, whereas Alpha-2-HS-glycoprotein (FETUA), Beta-2-glycoprotein 1 (APOH), Complement factor B (CFAB), Haptoglobin (HPT), Vitronectin (VTNC) and Zinc-alpha-2-glycoprotein (ZA2G) were down-regulated with fold changes -0.38, -0.76, -0.24, -0.47, -0.23, and -0.50 respectively. The down-regulation of APOH, VTNC and HPT was verified using ELISA.

Conclusions: The differentially expressed proteins represent potential biomarkers for the early screening for EOPE. Follow-up experiments however are necessary for evaluation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Levine, R.J., et al, Trial of calcium to prevent preeclampsia. *N Engl J Med*, 1997; 337(2): 69-76
2. Sibai, B., G. Dekker and M. Kupferminc, Pre-eclapmsia. *Lancet*, 2005; 365(9461): 785-99
3. Mathews, T.J., S.C. Curtin and M.F. MacDorman, Infant mortality statistics from the 1998 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep*, 2000; 48(12): 1-25
4. Brett, K.M and S.G. Haynes, Observations from the CDC. Women's and minority health statistics at the state level: a new approach to data dissemination from the national center for health statistics. *J Women's Health Gend Based Med*, 2000; 9(10): 1049-53
5. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP, Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health 4 (2014): 97–104
6. Poon LC, Kametas NA, Pandeva I, Valencia C, Nicolaides KH. Mean Arterial Pressure at 11+0 to 13+6 Weeks in the Prediction of Preeclampsia. *Hypertension*. 2008 Apr; 51(4):1027-33. Epub 2008 Feb
7. Mbah, A.K., et al., Pre-eclampsia in the first pregnancy and subsequent risk of stillbirth in black and white gravidas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010; 149(2): 165-9
8. von Dadelszen, P., L.A. Magee and J.M. Roberts, Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2003; 22(2): 143-8
9. Fischer, T., et al., Pregnancy-induced sympathetic overactivity: a precursor of preeclampsia. *Hum Genet*, 2006; 120(3): 360-70
10. Kopcow, H. D. and S.A. Karumanchi, Angiogenic factors and natural killer (NK) cells in the pathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 2007; 76(1-2): 23-9

11. James, J.L., G.S. Whitley and J.E. Cartwright, Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *J Pathol*, 2010; 221(4): 363-78
12. Walker J. Preeclampsia. *The Lancet* 2000; 356:1260-65
13. Red-Horse K et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal–fetal interface. *J Clin Invest* 2004; 114: 744-754
14. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy - a review. *Placenta* 2005; 26 (Suppl A): S31-S36
15. Zhou y et al. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99:2152-2164
16. Kadyrov m et al. Preeclampsia and maternal anemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta* 2003; 24:540-548
17. Ashley Moffett-King et al. Natural killer cells and pregnancy. *Nature Rev Immunol* 2002; 2:656-663
18. Hiby SE et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp med* 2004; 200:957-965
19. GOPEC Consortium Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: a British multicenter candidate-gene study. *Am J Hum Genet* 2005; 77:127-131
20. Chang CC et al. Induction of VE-cadherin in rat placental trophoblasts by VEGF through a NOdependent pathway. *Placenta* 2005; 26:234-241
21. Elsheikh A et al. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2001; 264:182-185
22. Garmendia JV et al. Nitric oxide in different types of hypertension during pregnancy. *Clin Sci* 1997; 93:413-421

23. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, et al: Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999; 282:356
24. Cosentino F et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and all prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003; 107:1017-1023
25. Sibai BM: Gabbe: Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies, 5th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier, 2007
26. Morrison ER, Miedzybrodzka ZH, Campbell DM, et al: Prothrombotic genotypes are not associated with preeclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review. *Thromb Haemost* 2002; 87:779
27. Oudejans CB, Mulders J, Lachmeijer AM, et al: The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in adrogenetic placentas. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:589
28. Speroff L. Toxemia of pregnancy; mechanism and therapeutic management. *Am J Cardiol* 1973, 32: 582-591
29. Zeister H, Llorba E, Chantraine F, Vatish M, et al. *N Engl J Med* 2016; 374: 13-22
30. Roberge S, Nicolaides 2, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Feb; 216(2):110-120.e6.
31. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Hypertension in Pregnancy: The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy. London: RCOG Press, 2010.
32. ACOG. First-trimester risk assessment for early-onset preeclampsia. Committee opinion No. 638. *Obstet Gynecol* 2015; 126: e25-7
33. American College of Obstetricians and Gynecologists. Task Force on hypertension in pregnancy. The American College of Obstetricians and Gynecologists; Washington

(DC): 2013; 122: 1122–1131

34. O’Gorman N, Wright D, Liona C, Poon LC, Rolnik DL, Syngelaki A, Wright A, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Jani J, Molina FS, De Paco Matallana C, Papantoniou N, Persico N, Plasencia W, Singh M, Nicolaides KH. Accuracy of competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks’ gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; in press

35. Akolekar, R., et al., Maternal plasma inhibin A at 11-13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn*, 2009; 29(8): p. 753-60

36. Kasdaglis T, Aberdeen G, Baschat AA. Placental Growth factor in the first trimester: relationship with maternal factors and placental Doppler studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* (2010)

37. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J. Evidence supporting a role for blockade of vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 190: 1541-1550

38. Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY. Evaluation of placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2006; 195:255-259

39. Kim YN, Lee DS, Jeong DH. The relationship of the level of circulating antiangiogenic factors to clinical manifestations of preeclampsia. *Prenat Diagn*, 2009; 29: 464-470

40. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor VR, et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase I and risks for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 770-775

41. First Trimester Screening for Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction Using Uterine Artery Doppler and Maternal Serum Placental Growth Factor and Pregnancy Associated Plasma Protein- A, *Reproductive Immunology*, 2016; Vol 1, No 3:15

42. Leona C. Poon* and Kypros H. Nicolaides, First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia, *Prenatal Diagnosis* 2014; 34: 618–627

43. O’Gorman N, Wright D, Syngelaki A, Akolekar R, Wright A, Poon LC, Nicolaides KH. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks’ gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: 103.e1-103.e12
44. Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Papantoniou N et al. Potential biomarkers for Turner in maternal plasma: possibility for noninvasive prenatal diagnosis. *Journal of proteome research*, 2010; 9(10): 5164-5170
45. Hsu TY, Hsieh TT, Yang KD et al. Proteomic profiling reveals alpha1-antitrypsin, alpha1-microglobulin, and clusterin as preeclampsia-related serum proteins in pregnant women. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2015; 54(5): 499-504
46. Espana F, Gilabert J, Aznar J, Estelles A, Kobayashi T, Griffin JH. Complexes of activated protein C with alpha 1-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1991; 164(5 Pt 1): 1310-1316
47. Kenyon GL¹, DeMarini DM, Fuchs E, Galas DJ, Kirsch JF, Leyh TS, Moos WH, Petsko GA, Ringe D, Rubin GM, Sheahan LC; National Research Council Steering Committee. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Oct; 1(10):763-80.
48. O’Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975; 250 (10): 4007-21
49. Monteoliva, L. and J.P. Albar, Differential proteomics: an overview of gel and on-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2004; 3(3): 220-39
50. Liberatori, S., et al., A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks gestation. *Electrophoresis*, 1997; 18 (15): 2816-22
51. Nilsson, S., et al., Explorative study of the protein composition of amniotic fluid by liquid chromatography electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2004; 3(4): 884-9
52. Tsangaris, G.T., et al., The normal human amniotic fluid supernatant proteome. *In Vivo*, 2006; 20(4): 479-90

53. Tsangaris, G.T., et al., Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics*, 2006; 6(15): 4410-9
54. Mavrou, A., et al., Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Turner syndrome fetuses. *J Proteome Res*, 2008; 7(5): 1862-6
55. Kolialexi, A., et al., Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn*, 2008; 28(8): 691-8
56. Buhimschi, I.A., et al., Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. *AmJ Obstet Gynecol*, 2008; 199(5): 551 e1-16
57. Ziady, A.G. and M. Kinter, Protein sequencing with tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2009; 544: 325-41
58. Perkins, D.N., et al., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999; 20 (18): 3551-67
59. <http://panther.appliedbiosystems.com/>
60. Hogberg, U., The World Health Report 2005: “make every mother and child count” –including Africans. *Scand J Public Health*, 2005; 33(6): 409-11
61. Mbah, A.K., et al., Super-obesity and risk for early and late pre-eclampsia. *BJOG*, 2010; 117(8): 997-1004
62. Odegard, R.A., et al., Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG*, 2000; 107(11): 1410-6
63. Anderson, N.H., et al., The impact of maternal body mass index on the phenotype of preeclampsia: a prospective cohort study. *BJOG*, 2012; 119(5): 589-95
64. Kolla V, Jenö P, Moes S, Lapaire O, Hoesli I, Hahn S. Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 305964

65. Guha C, Osawa M, Werner PA, Galbraith RM, Paddock GV. Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. *Hepatology*, 1995; 21(6): 1675-1681
66. Liong S, Di Quinzio MK, Fleming G, Permezel M, Georgiou HM. Is vitamin D binding protein a novel predictor of labour? *PloS one*, 2013; 8(10), e76490
67. Epiney M, Ribaux P, Arboit P, Irion O, Cohen M. Comparative analysis of secreted proteins from normal and preeclamptic trophoblastic cells using proteomic approaches. *Journal of proteomics*, 2012; 75(6): 1771-1777
68. Blumenstein M, McMaster MT, Black MA et al. A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease. *Proteomics*, 2009; 9(11): 2929-2945
69. Kralova A, Svetlikova M, Madar J, Ulcova-Gallova Z, Bukovsky A, Peknicova J. Differential transferrin expression in placentae from normal and abnormal pregnancies: a pilot study. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2008; 6: 27
70. Kim YS, Gu BH, Choi BC et al. Apolipoprotein A-IV as a novel gene associated with polycystic ovary syndrome. *International journal of molecular medicine*, 2013; 31(3): 707-716
71. Richens JL, Spencer HL, Butler M et al. Rationalising the role of Keratin 9 as a biomarker for Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 2016; 6: 22962
72. Milot E, Fotouhi-Ardakani N, Filep JG. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Frontiers in immunology*, 2012; 3: 397
73. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, Valledor AF, Sarrias MR. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *Journal of leukocyte biology*, 2015; 98(2): 173-184
74. Sanhal CY, Can Kavcar M, Yucel A, Erkenekli K, Erkaya S, Uygur D. Comparison of plasma fetuin A levels in patients with early-onset pre-eclampsia vs late-onset pre-eclampsia. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 2016; 200: 108-112

75. Chaemsaitong P, Romero R, Tarca AL et al. Maternal plasma fetuin-A concentration is lower in patients who subsequently developed preterm preeclampsia than in uncomplicated pregnancy: a longitudinal study. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*, 2014; 1-10
76. Molvarec A, Kalabay L, Derzsy Z et al. Preeclampsia is associated with decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein (fetuin-A) concentration. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 2009; 32(8): 665-669
77. Arinola G, Arowojolu A, Bangboye A, Akinwale A, Adeniyi A. Serum concentrations of immunoglobulins and acute phase proteins in Nigerian women with preeclampsia. *Reproductive biology*, 2006; 6(3): 265-274
78. Olsson MG, Centlow M, Rutardottir S et al. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger alpha(1)-microglobulin in preeclampsia. *Free radical biology & medicine*, 2010; 48(2): 284-291
79. GeneCards, Human Gene Database, Weizmann institute of Science
80. Mather KA, Thalamuthu A, Oldmeadow C et al. Genome-wide significant results identified for plasma apolipoprotein H levels in middle-aged and older adults. *Scientific reports*, 2016; 6: 23675
81. Balci Ekmekci O, Ekmekci H, Gungor Z et al. Evaluation of Lp-PLA2 mass, vitronectin and PAI-1 activity levels in patients with preeclampsia. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2015; 292(1): 53-58
82. Kim SM, Cho BK, Kang MJ et al. Expression changes of proteins associated with the development of preeclampsia in maternal plasma: A case-control study. *Proteomics*, 2016; 16(10): 1581-1589
83. Kolla V, Jenö P, Moes S, Lapaire O, Hoesli I, Hahn S. Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012; 305964

84. Anand S, Bench Alvarez TM, Johnson WE et al. Serum biomarkers predictive of pre-eclampsia. *Biomarkers in medicine*,2015; 9(6): 563-575

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Έντυπο Συγκατάθεσης

Έντυπο Συγκατάθεσης Ασθενούς για συμμετοχή στη μελέτη με τίτλο :

«Ανίχνευση πρωτεωμικών δεικτών πρόωμης διάγνωσης προεκλαμψίας.»

Συγκατάθεση για τη λήψη και αποθήκευση δείγματος αίματος

Δια του παρόντος δηλώνω ότι είμαι ικανοποιημένη με τις πληροφορίες που έχω λάβει, ότι έχω ενημερωθεί σχετικά με τις διαδικασίες που πρόκειται να υποβληθώ για την πραγματοποίηση λήψης αίματος, ότι κατανόησα ότι το δείγμα που θα ληφθεί θα χρησιμοποιηθεί για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο και τυχόν πλεονάζον θα φυλαχθεί στη Γ' Μαιευτική&Γυναικολογική Κλινική στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικό» 5 χρόνια, για τη μελλοντική μελέτη επιπλοκών της κύησης. Ενημερώθηκα ότι έχω το δικαίωμα να ζητήσω την καταστροφή του δείγματός μου οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμώ. Δηλώνω ότι είχα τη δυνατότητα να κάνω τις ερωτήσεις που κρίνω κατάλληλες και ότι έχω λάβει επαρκείς απαντήσεις σε αυτές τις ερωτήσεις, καθώς και ότι κατανοώ το πεδίο εφαρμογής της διαδικασίας και επομένως,

ΠΑΡΕΧΩ ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΚΑΙ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΑ ΤΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ

«Ανίχνευση πρωτεωμικών δεικτών πρόωμης διάγνωσης προεκλαμψίας.»

ΚΑΘΩΣ ΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΥΤΟΥ ΥΠΟ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΕΙ ΠΑΡΑΠΑΝΩ.

Η συγκατάθεσή μου δεν αποδεσμεύει τους ερευνητές κατ' οιονδήποτε τρόπο από τις ευθύνες τους και διατηρώ τα δικαιώματά μου όπως αυτά εγγυώνται από τον νόμο. Γνωρίζω ότι μπορώ να άρω τη συγκατάθεσή μου οποιαδήποτε στιγμή και για οποιονδήποτε λόγο. Αυτό δεν θα μεταβάλλει τη σχέση μου με τους ιατρούς της κλινικής και τα δικαιώματά μου θα διατηρηθούν.

Όν/μο ασθενούς _____Υπογραφή ασθενούς _____Ημ/νία

Όν/μο _____Ερευνητή_____Υπογραφή
Ερευνητή_____Ημ/νία_____

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Έντυπο Ενημέρωσης

Φυλλάδιο Ενημέρωσης Ασθενή για συμμετοχή στη μελέτη με τίτλο «Ανίχνευση πρωτεωμικών δεικτών πρώιμης διάγνωσης προεκλαμψίας.»

Σας έχει γίνει πρόταση να συμμετέχετε σε ερευνητική μελέτη με τίτλο «Ανίχνευση πρωτεωμικών δεικτών πρώιμης διάγνωσης προεκλαμψίας.» Πριν αποφασίσετε αν θέλετε να συμμετέχετε σε αυτήν, είναι σημαντικό να κατανοήσετε τους λόγους για τους οποίους πραγματοποιείται και τι περιλαμβάνει. Παρακαλώ πολύ να αφιερώσετε λίγα λεπτά από το χρόνο σας για να διαβάσετε προσεκτικά τις πληροφορίες που παρατίθενται και να συζητήσετε με συγγενείς και φίλους, ακόμα και με τον θεράποντα ιατρό, αν θέλετε. Σε περίπτωση που έχετε οποιαδήποτε ερώτηση ή εάν χρειάζεστε περισσότερες πληροφορίες, παρακαλώ μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας.

Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Ο πλακούντας είναι υπεύθυνος να παρέχει τροφή και οξυγόνο στο έμβρυο. Όταν υπάρχει πρόβλημα με τη λειτουργία του πλακούντα, το έμβρυο δεν αναπτύσσεται ικανοποιητικά και η μητέρα αναπτύσσει υψηλή αρτηριακή πίεση, μια κατάσταση που ονομάζεται προεκλαμψία. Οι διαταραχές στον πλακούντα επηρεάζουν περίπου 10% του συνόλου των κυήσεων. Οι επιπτώσεις μπορεί να είναι μικρής σημασίας, αλλά περιστασιακά μπορεί να είναι σοβαρές τόσο για τη μητέρα, όσο και για το έμβρυο.

Η ροή του αίματος στις μητριαίες αρτηρίες (αιμοφόρα αγγεία που παρέχουν αίμα στον πλακούντα), η αρτηριακή σας πίεση και η μέτρηση ορισμένων πρωτεϊνών - που παράγονται από τον πλακούντα- στο αίμα σας είναι σημαντικές στο να καθορίσουν κατά πόσο βρίσκεστε σε αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσετε προεκλαμψία ή άλλα προβλήματα στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Ο στόχος μας είναι να προσπαθήσουμε να αναγνωρίσουμε τις γυναίκες που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν προεκλαμψία νωρίς στην κύηση.

Γιατί επιλέχθηκα εγώ;

Όλες οι γυναίκες με μονήρεις κύσεις που προσέρχονται στο πλαίσιο του προγεννητικού πληθυσμιακού ελέγχου (screening) 1^{ου} τριμήνου για τη πρόληψη χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου με υπερηχογραφικούς και βιοχημικούς δείκτες προσκαλούνται να λάβουν μέρος στη μελέτη.

Πρέπει να λάβω μέρος στη μελέτη:

Εξαρτάται από εσάς αν θα πάρετε μέρος στη μελέτη ή όχι. Αν αποφασίσετε να συμμετέχετε, θα σας δοθεί αυτό το ενημερωτικό φυλλάδιο και θα σας ζητηθεί να υπογράψετε ένα έντυπο συγκατάθεσης. Σε περίπτωση που αποφασίσετε να λάβετε μέρος σε αυτήν τη μελέτη, και πάλι είστε ελεύθερη να αποσυρθείτε οποιαδήποτε στιγμή θελήσετε, χωρίς να δώσετε εξηγήσεις. Η απόφασή σας δε θα επηρεάσει την ιατρική φροντίδα που θα λάβετε.

Τι θα συμβεί σε εμένα, αν λάβω μέρος στη μελέτη:

Κατά τη διάρκεια της επίσκεψής σας, στην 11^η – 13^η εβδομάδα της κύησης, θα μετρήσουμε το σωματικό βάρος και το ύψος σας και την αρτηριακή σας πίεση, ενώ παράλληλα θα εκτιμήσουμε τη ροή του αίματος στη μήτρα και τον πλακούντα, με υπερηχογράφημα Doppler. Με βάση τα αποτελέσματα των υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών θα προσδιοριστεί ο κίνδυνος να εμφανίσετε χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου.

Από το αίμα που θα ληφθεί, ένα μέρος θα χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη χρωμοσωμικών ανωμαλιών μέσω της πρωτεΐνης PAPP-A και β-HCG και ένα μέρος για τις ανάγκες της μελέτης με τίτλο «Ανίχνευση πρωτεωμικών δεικτών πρώιμης διάγνωσης προεκλαμψίας.»

Σε περίπτωση που είναι εφικτή η διατήρηση μικρής ποσότητας από το αίμα σας, αυτό θα φυλαχθεί για περαιτέρω μελέτη, όπως μέτρηση παραγόντων που μπορεί να εμπλέκονται σε επιπλοκές της κύησης, στο μέλλον. Το δείγμα αίματος θα φυλαχθεί για 5 χρόνια. Θα έχετε το δικαίωμα να ζητήσετε την καταστροφή του δείγματος οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμείτε.

Τα μέλη της ερευνητικής ομάδας, σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, θα σας επανελέγξουν στις 20-24 και/ή στις 30-37 εβδομάδες κύησης και ο έλεγχος αυτός

θα περιλαμβάνει υπερηχογραφικό έλεγχο ανάπτυξης, μέτρηση ροής των μητριάων αγγείων και μέτρηση αρτηριακής πίεσης. Οι επισκέψεις θα διαρκούν περίπου 40 λεπτά.

Τι πρέπει να κάνω εγώ;

Δεν υπάρχουν περιορισμοί σχετικά με το τι πρέπει ή δεν πρέπει να κάνετε.

Η φύλαξη των αρχείων μου θα είναι εμπιστευτική;

Όλες οι πληροφορίες που συλλέγονται για εσάς κατά τη διάρκεια της μελέτης φυλάσσονται αυστηρώς εμπιστευτικά. Σε οποιαδήποτε πληροφορία εξέρχεται του νοσοκομείου μας, θα σβήνεται το όνομά σας και η διεύθυνσή σας, ώστε να μην αποκαλύπτεστε.

Τι θα συμβεί με τα αποτελέσματα της μελέτης;

Μόλις ολοκληρωθεί η μελέτη τα αποτελέσματα θα δημοσιευθούν σε ιατρικό περιοδικό και θα χρησιμοποιηθούν για την εκπόνηση μεταπτυχιακής εργασίας. Τα στοιχεία σας δεν θα αποκαλυφθούν σε οποιαδήποτε αναφορά ή δημοσίευση. Εφόσον το επιθυμείτε μπορείτε να ενημερωθείτε για τα αποτελέσματα της μελέτης καθώς και για την ομάδα μελέτης στην οποία ανήκετε μετά το τέλος της ερευνητικής προσπάθειας.

Ποιος έχει ελέγξει τη μελέτη;

Όλες οι έρευνες σε δημόσια Νοσοκομεία της Ελλάδας και του εξωτερικού ελέγχονται από ανεξάρτητη ομάδα ατόμων, που καλείται Επιτροπή Έρευνας και Βιοηθικής, η οποία καλείται να προστατέψει τα συμφέροντά σας. Η μελέτη αυτή έχει ελεγχθεί και έχει πάρει τις απαραίτητες εγκρίσεις από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου “Αττικόν”.

Έντυπο Συγκατάθεσης Ασθενούς

- Επιβεβαιώνω ότι διάβασα και κατάλαβα το ενημερωτικό φυλλάδιο ασθενούς για την παραπάνω μελέτη και ότι είχα την ευκαιρία να υποβάλλω ερωτήσεις οι οποίες απαντήθηκαν ικανοποιητικά.
- Καταλαβαίνω ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και ότι είμαι ελεύθερη να αποσυρθώ οποιαδήποτε στιγμή το θελήσω, χωρίς να δικαιολογήσω την απόφασή μου, χωρίς να επηρεασθεί η ιατρική φροντίδα που θα λάβω ή τα νομικά δικαιώματά μου.
- Συμφωνώ να συμμετάσχω στη μελέτη με τίτλο: «Ανίχνευση πρωτεωμικών φεικτών πρώιμης διάγνωσης προεκλαμψίας.»
- Καταλαβαίνω ότι σχετικά αποσπάσματα του ιατρικού μου φακέλου και δεδομένα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της μελέτης και σχετίζονται με αυτήν ενδέχεται να ελεγχθούν από εξουσιοδοτημένα πρόσωπα της ερευνητικής ομάδας της Γ'Μαιευτικής&Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου "Αττικών". Δίνω άδεια ώστε αυτά τα πρόσωπα να έχουν πρόσβαση στον ιατρικό μου φάκελο. Εφόσον απαιτηθεί, συναινώ στην επικοινωνία με τον θεράποντα ιατρό μου προκειμένου να συλλεχθούν δεδομένα σχετικά με την έκβαση της κύησής μου.
- Συμφωνώ να διατηρηθούν τα δεδομένα μου, ΑΝΩΝΥΜΑ, για περισσότερο από 10 έτη.
- Δίνω την άδειά μου ώστε να ενημερωθεί ο θεράπων ιατρός μου σχετικά με τη συμμετοχή μου στη μελέτη.

Ον/μο ασθενούς _____ Υπογραφή ασθενούς _____ Ημ/νία _____

Ον/μο _____ Ερευνητή _____ Υπογραφή
Ερευνητή _____ Ημ/νία _____

Ον/μο _____ Μάρτυρα _____ Υπογραφή
Μάρτυρα _____ Ημ/νία _____

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Διαλύματα

Διάλυμα 1:

Μία ταμπλέτα αναστολέων πρωτεασών (Roche) διαλύθηκε σε 2ml mill-Q H₂O και ύστερα από ανάδευση για διαλυτοποίησή της χωρίστηκε σε aliquots των 100μL και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Οι αναστολείς των πρωτεασών προστίθενται κατά τη διάλυση των δειγμάτων πλάσμα/αμνιακό υγρό στο διάλυμα λύσης.

Διάλυμα 2 (Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου):

Η ποσότητα του διαλύματος που παρασκευάζεται εξαρτάται από τον αριθμό των πηκτωμάτων που πρόκειται να παρασκευαστούν. Ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη έχει την ακόλουθη σύσταση:

Acrylamide/piperazine-bis-acrylamide (37,5:1 w/v) (Biosolve): 12%

Tris-HCL pH 8,8 (Bio-Rad): 0,375M

SDS (Bio-Rad): 0,1% (v/v)

TEMED (Appllichem): 0,05% (v/v)

Το διάλυμα για τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζεται σε κωνική φιάλη, η οποία διαθέτει βαλβίδα σύνδεσης με αντλία κενού για απαέρωση του διαλύματος. Πριν την προσθήκη των APS και TEMED πραγματοποιείται η απαέρωση, η οποία συμβάλλει στον ομαλότερο πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου.

Αμέσως μετά το «φόρτωμα» του διαλύματος ακρυλαμιδίου στην κασέτα πολυμερισμού, στο άνω μέρος του πηκτώματος επιστρώνεται διάλυμα ισοβουτανόλης κορεσμένης σε νερό ώστε να αποφευχθεί η επαφή του διαλύματος με το οξυγόνο του αέρα να διατηρηθεί υδαρής η επιφάνεια του πηκτώματος, όπου θα τοποθετηθεί το IPG strip.

Διάλυμα 3 (Αγαρόζη):

Παρασκευάζεται διάλυμα 0,5% (w/v) αγαρόζη (Sigma) σε 1χ TGS. Σε αυτό προστίθενται μερικές σταγόνες κυανό της βρωμοφαινόλης. Το διάλυμα διατηρείται

σε στερεή μορφή στους 4°C. Πριν από τη χρήση του θερμαίνεται, έως ότου υγροποιηθεί πλήρως σε φούρνο μικροκυμάτων. Η αгарόζη βοηθά τη σταθεροποίηση των IPG strips πάνω από τα πήκτώματα και στην ομαλή και αδιάκοπη μεταφορά των πρωτεϊνών από τα IPG strips στο πήκτωμα κατά την κάθετη ηλεκτροφόρηση.

Διάλυμα 4 (Διάλυμα βαφής Coomassie Colloidal Blue stain):

Χρησιμοποιήθηκε το Novex Colloidal Blue staining kit (Invitrogen). Το τελικό διάλυμα περιείχε μεθανόλη (Sigma) 20% (v/v), Stainer A (από το kit) 20% (v/v) και Steiner B (από το kit) 5% (v/v). Η βαφή έχει ευαισθησία της τάξεως των 0,2-1pmol πρωτεΐνης.

Διάλυμα 5 (Destaining solution):

NH₄HCO₃ (Fluka): 50mM

Ακετονιτρίλιο (Sigma): 30% (v/v).

Διάλυμα 6 (διάλυμα θρυψίνης):

Trypsin rec., proteomics grade της εταιρείας Roche. Λυοφυλιοποιημένη σκόνη των 10μg. Στο φιαλίδιο θρυψίνης προστίθεται 1ml διαλύματος NH₄HCO₃ 100mM (Fluka) και H₂O μέχρι τελικής συγκέντρωσης διαλύματος θρυψίνης 10mM.

Διάλυμα 7 (Extraction solution):

Ακετονιτρίλιο (Sigma): 30% (v/v)

TFA (Merck): 0,1% (v/v)

