



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ &
Γ' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
MICRO RNAS ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ»**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ Δ. ΛΥΚΟΥΔΗ

Μοριακός Βιολόγος, MSc

ΑΘΗΝΑ 2020



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

Η Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής σε συνεργασία με την Γ΄ Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαντωνίου Νικόλαος Επιβλέπων Καθηγητής	Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας- Εμβρυομητρικής Ιατρικής, ΕΚΠΑ
---	---

Μαύρου Καλπίνη Αριάδνη	Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, ΕΚΠΑ
------------------------	------------------------------------

Τζέτη Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Νοσοκομείο Παιδών «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ», ΕΚΠΑ
-------------	--

Ημ. Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 14/07/2014

Ημ. Κατάθεσης 1^{ης} Έκθεσης Προόδου: 5/02/2016

Ημ. Κατάθεσης 2^{ης} Έκθεσης Προόδου: 26/10/2016

Ημ. Κατάθεσης 3^{ης} Έκθεσης Προόδου: 08/07/2020

ΑΘΗΝΑ 2020



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαντωνίου Νικόλαος Επιβλέπων Καθηγητής	Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας - Εμβρυομητρικής Ιατρικής ΕΚΠΑ
Μαύρου Καλπίνη Αριάδνη	Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής ΕΚΠΑ
Τζέτη Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Νοσοκομείο Παίδων «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ», ΕΚΠΑ
Τraeger Συνοδινού Ιωάννα	Καθηγήτρια - Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Νοσοκομείο Παίδων «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ» ΕΚΠΑ
Δασκαλάκης Γεώργιος	Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας - Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Α΄ Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Ελευθεριάδης Μακάριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας - Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Β΄ Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Αραβαντινός Λέων	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας- Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Β΄ Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ

Ημ. Ορισμού Επταμελούς Επιτροπής: 17/7/2020

ΑΘΗΝΑ 2020

Στην οικογένειά μου...

Ιπποκράτειος όρκος

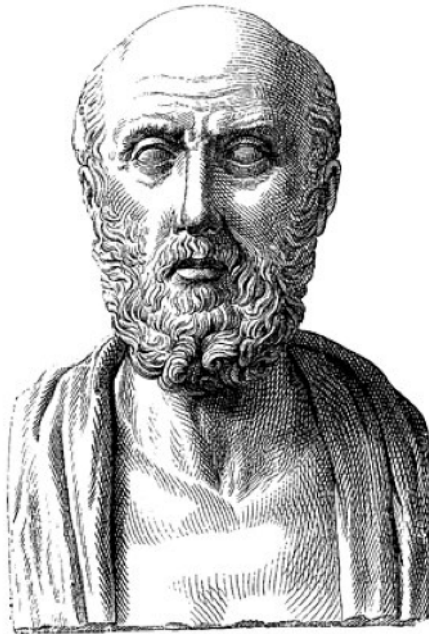
Όμνυμι Απόλλωνα ίητρών, και Άσκληπιόν, και Υγείαν, και Πανάκειαν, και θεούς πάντας τε και πάσας, Ίστορας ποιεύμενος, έπιτελέα ποιήσειν κατά δύναμιν και κρίσιν έμην όρκον τόνδε και ζυγγραφην τήνδε.

Ηγήσασθαι μέν τόν διδάξαντά με την τέχνην ταύτην ίσα γενέτησιν έμοϊσι, και βίου κοινώσασθαι, και χρεών χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, και γένος τó έξ ωύτέου άδελφοϊς ίσον έπικρινέειν άρρέσι, και διδάζειν την τέχνην ταύτην, ην χρηίζωσι μανθάνειν, άνευ μισθοϋ και ζυγγραφής, παραγγελίης τε και άκροήσιος και τής λοιπής άπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υίοισί τε έμοϊσι, και τοϊσι τοϋ έμε διδάξαντος, και μαθηταϊσι συγγεγραμμένοισί τε και ώρκισμένοις νόμω ίητρικῶ, άλλω δε ούδενί.

Διαιτήμασί τε χρηίσομαι έπ' ώφελείη καμνόντων κατά δύναμιν και κρίσιν έμην, έπί δηλήσει δε και άδική είρξειν. Ού δώσω δε ούδε φάρμακον ούδενι αίτηθείς θανάσιμον, ούδε ύφηγήσομαι ζυμβουλίην τοιήνδε. Όμοίως δε ούδε γυναικι πεσσόν φθόριον δώσω. Αγνώς δε και όσίως διατηρήσω βίον τόν έμόν και τέχνην την έμην. Ού τεμέω δε ούδε μην λιθιώντας, έκχωρήσω δε έργάτησιν άνδράσι πρήζιος τήσδε.

Ές οίκίας δε όκόσας άν έσίω, έσελεύσομαι έπ' ώφελείη καμνόντων, έκτός έών πάσης άδικής έκουσίης και φθορίης, τής τε άλλης και άφροδισίων έργων έπί τε γυναικείων σωμάτων και άνδρώων, έλευθέρων τε και δούλων. Ά δ' άν έν θεραπείη η ίδω, η άκούσω, η και άνευ θεραπείης κατά βίον άνθρώπων, ά μη χρή ποτε έκλαλέεσθαι έξω, σιγήσομαι, άρρήτα ηγεύμενος είναι τα τοιαϋτα.

Όρκον μέν οϋν μοι τόνδε έπιτελέα ποιέοντι, και μη ζυγγέοντι, είη έπαύρασθαι και βίου και τέχνης δοξαζομένω παρά πασιν άνθρώποις ές τόν αίεί χρόνον. παραβαίνοντι δε και έπιορκούντι, τάναντία τουτέων.



Ιπποκράτης (460 π.Χ. - 377 π.Χ.)

Όρκος του Ιπποκράτη

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

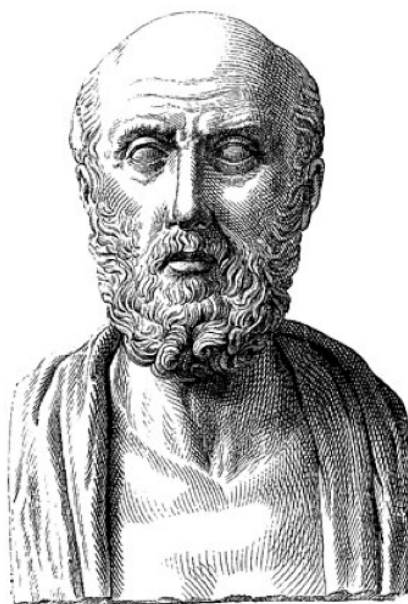
Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαιρώ πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.



Ιπποκράτης (460 π.Χ. - 377 π.Χ.)

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Λυκούδη Αλεξάνδρα

Ημ. Γέννησης: 07/12/1989

Εθνικότητα: Ελληνική

alykoudi@meduoa.gr

Εκπαίδευση

Υποψήφια Διδάκτωρ (Ph.D) (2014)

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων και Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, ΕΚΠΑ.

Θέμα: «Μελέτη του προτύπου έκφρασης των *micro RNAs (miRNA)* στην Προεκλαμψία».

Μεταπτυχιακός Τίτλος σπουδών στην Προγεννητική Γενετική και Εμβρυϊκή Ιατρική (MSc Prenatal Genetics and Fetal Medicine) (2012-2013)

Institute for Women's Health, University College London (UCL), London, UK.

Θέμα: «Ανάλυση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA με την χρήση της τεχνικής *Droplet Digital PCR*, με σκοπό τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο των μονογονιδιακών ασθενειών και συγκεκριμένη εφαρμογή στην κυστική ίνωση».

Πτυχίο στη Μοριακή Βιολογία και Γενετική (2007-2011)

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα. **Θέμα:** «Η χρήση των βλαστικών κυττάρων του λιπώδους ιστού ως μέσο για την κυτταροθεραπεία του καρκίνου». Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας Αθήνας, Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών.

Απολυτήριο Λυκείου (2003-2007)

Πρότυπο Πειραματικό Μουσικό Λύκειο Παλλήνης, Αθήνα, Ελλάδα

Συνεχής κατάρτιση

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων, Αθήνα:

-Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από ελεύθερο DNA πλάσματος εγκύου για τη διάγνωση του συστήματος RhD του εμβρύου και συγκεκριμένων αλληλουχιών στα φυλετικά χρωμοσώματα (*DYS, SRY*),

- Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (*FISH*) για τη διάγνωση γενετικών νοσημάτων που προκαλούνται από μικροελλείψεις γενετικού υλικού (*DiGeorge, Williams Syndrome*),

-Απομόνωση DNA/RNA, *multiplex PCR, RT-q-PCR, miRNA* Μικροσυστοιχίες, σύστημα μαζικής αλληλούχισης *miSeq, Western blot, Στατιστική Ανάλυση*.

West Midlands Regional Genetics Laboratory, Birmingham Women's NHS Foundation Trust, Mindelsohn Way, Edgbaston, Birmingham, UK (01/06/2013 - 30/09/2013):

Απομόνωση DNA, PCR πραγματικού χρόνου, *Droplet Digital PCR, Βιοπληροφορική ανάλυση*.

Εργαστήριο Ανοσολογίας, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, Αθήνα, Ελλάδα (01/10/2011 - 31/06/2012):

Ανοσοφθορισμός, ELISA, PCR Πραγματικού χρόνου και Ανοσοηλεκτροφόρηση, χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα ερευνών , Αθήνα, Ελλάδα (01/01/11 - 31/07/2012):

Κυτταρική καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων λιπόδους ιστού και καρκινικών κυττάρων, μέθοδοι κρυσυντήρησης και Southern blotting.

Συμμετοχή σε χρηματοδοτούμενα ερευνητικά προγράμματα

Τίτλος Προγράμματος: «*ASPRE TRIAL, Combined multimarker screening and randomized patient treatment with aspirin for evidence based pre-eclampsia prevention*» (2014-2016)

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Κ. Η Nikolaidis

Φορέας χρηματοδότησης: 7ο Πρόγραμμα Στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Θέση: Βοηθός Ερευνητή

Τίτλος Προγράμματος: «*First trimester prediction of preeclampsia using protein biomarkers*» (2013-2015)

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Ν. Παπαντωνίου

Φορέας χρηματοδότησης: Αριστεία. Συγχρηματοδότηση από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΣΠΑ) μέσω των κονδυλίων ΕΣΠΑ

Θέση: Βοηθός Ερευνητή

Τίτλος Προγράμματος: «*Translation of NIPD for selected single gene disorders into a clinical setting*» (2012-2013)

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγήτρια Allen Stefanie

Φορέας χρηματοδότησης: Health Innovation Challenge Fund, Birmingham Women's NHS Foundation Trust

Θέση: Μεταπτυχιακή φοιτήτρια

Δημοσιεύσεις

Δημοσιεύσεις σε έγκριτα διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Mavreli D, Lykoudi A, Lambrou G, Papaioannou G, Vrachnis N, Kalantaridou S, Papantoniou N, Kolialexi A. «*Deep Sequencing Identified Dysregulated Circulating MicroRNAs in Late Onset Preeclampsia*». In Vivo. 2020 Sep-Oct;34(5):2317-2324. **IF:1.541**

2. Lykoudi A, Kolialexi A, Lambrou GI, Braoudaki M, Siristatidis C, Papaioanou GK, Tzetis M, Mavrou A, Papantoniou N. «*Dysregulated Placental microRNAs in Early and Late Onset Preeclampsia*» Placenta.2018 Jan;61:24-32. **IF:2.773**

3. Kolialexi A, Tsagaris GT, Sifakis S, Gourgiotis D, Katsafadou A, Lykoudi A, Marmarinos A, Mavreli D, Pergialiotis P, Fexi D, Mavrou A, Papaioanou GK, Papantoniou N. «*Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset Preeclampsia*» Expert Rev Proteomics. 2017 Mar;14(3):269-276. **IF:1.500**

4. Debrand E, **Lykoudi A**, Bradshaw E, Allen SK. «*A Non-Invasive Droplet Digital PCR (ddPCR) Assay to Detect Paternal CFTR Mutations in the Cell-Free Fetal DNA (cffDNA) of Three Pregnancies at Risk of Cystic Fibrosis via Compound Heterozygosity*». PLoS One. 2015;10(11) **IF: 3.234**.
5. Papadavid E, Braoudaki M, Bourdakou M, **Lykoudi A**, Nikolaou V, Tounta G, Ekonomidi A, Athanasiadis E, Spyrou G, Antoniou C, Kitsiou-Tzeli S, Rigopoulos D, Kolialexi A. «*Aberrant microRNA expression in tumor mycosis fungoides*». Tumour Biol. 2016 Nov;37(11):14667-14675. **IF:3.650**
6. Braoudaki M, Lambrou GI, Giannikou K, Papadodima SA, **Lykoudi A**, Stefanaki K, Sfakianos G, Kolialexi A, Tzortzotou-Stathopoulou F, Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E. «*miR-15a and miR-24-1 as putative prognostic microRNA signatures for pediatric pilocytic astrocytomas and ependymomas*». Tumour Biol. 2016, **IF: 3.611**.
7. **Lykoudi A**, Mavreli D, Mavrou A, Papantoniou N, Kolialexi A. «*miRNAs in pregnancy-related complications*». Expert Rev Mol Diagn. 2015:1-12, **IF: 3.516**.
8. Kolialexi A, Gourgiotis D, Daskalakis G, Marmarinos A, **Lykoudi A**, Mavreli D, Mavrou A and Papantoniou N. «*Validation of Serum Biomarkers Derived from Proteomic Analysis for the Early Screening of Preeclampsia*», Disease Markers 2015, **IF: 1.562**.

Δημοσιεύσεις σε έγκριτα Ελληνικά επιστημονικά περιοδικά

1. **Λυκούδη Α**, Παπαδοπούλου Α, Γαλάνης Α, Χριστοδούλου Γ, Ζουμπουρλής Β. «*Ιεραρχία Βλαστικών Κυττάρων στον καρκίνο του δέρματος*». Ιατρική επικαιρότητα: vol.15, cop.1 ISSN:1107-8340, Ιούνιος 2011, εκδόσεις Δικτύοννα.
2. Παπαδοπούλου Α, **Λυκούδη Α**, Γαλάνης Α, Χριστοδούλου Γ, Ζουμπουρλής Β. «*Πρόδρομα κύτταρα στην ανάπτυξη του καρκίνου*». Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ιατρική επικαιρότητα: vol.15, cop.1 ISSN:1107-8340, Δεκέμβριος 2010, εκδόσεις Δικτύοννα.

Συμμετοχή με ανακοινώσεις σε συνέδρια με κριτές (ομιλίες- abstracts)

1. **Λυκούδη Α**. 3ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Κλινικής Γενετικής Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα, 2019. Ομιλία: «*Η χρήση των miRNAs για την ανίχνευση των επιπλοκών κατά την κύηση*».
2. Mavreli D, **Lykoudi A**, Papaioanou G, Lambrou G, Kalantaridou S, Papantoniou N, Kolialexi A. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Αθήνα, 2018 «*Identification of Gestational diabetes Mellitus-associated circulating miRNAs*».

3. **Lykoudi A**, Kolialexi A, Braoudaki M, Tounta G, Tsokaki Th, Spyrou G, Bourdakou M, Mavrou A, Papantoniou N. EMBO/EMBL, The Non-coding Genome, Heidelberg, Germany, 2015. Poster presentation: «*Placental miRNA expression in pregnancies with Preeclampsia*».

4. Κολιαλέξη Α, Τσάγκαρης Γ, Σηφάκης Σ, Κατσαφάδου Α, **Λυκούδη Α**, Μαυρέλη Δ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα, 2015. Poster: «*Πρωτεομικοί δείκτες πρώιμης μη επεμβατικής ανίχνευσης της Προεκλαμψίας*».

5. **Lykoudi A**, Kolialexi A, Tounta G, Papanikolaou Th, Tsokaki Th, Spyrou G, Bourdakou M, Athanasiadis E, Mavrou A, Papantoniou N. ISPD 19th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Washington DC, USA, 2015. Poster: «*Expression profile of miRNAs in human placentas from pregnancies complicated by Preeclampsia*».

6. Kolialexi A, Tounta G, Apostolou P, Vrettou C, Papantoniou N, **Lykoudi A**, Destouni A, Bakoulas V, Kanavakis E, Antsaklis A, Mavrou A. 2nd international meeting on cell free-DNA, Copenhagen, Denmark, 2015. Poster: «*Early non-invasive prenatal diagnosis of fetal RhD status using cell-free fetal DNA*».

7. **Λυκούδη Α**, Κολιαλέξη Α, Μπραουδάκη Μ, Τούντα Γ, Παπανικολάου Θ, Ισοπουλος Θ, Τσοκάκη Θ, Σπύρου Γ, Μπουρδάκου Μ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα, 2015 Ομιλία: «*Μελέτη των miRNAs του πλακούντα σε κήσεις με Προεκλαμψία*».

8. Papadavid E, Tounta G, Spyrou G, Nikolaou V, Bourdakou M, Athanasiadis E, **Lykoudi A**, Mavrou A, Antoniou C, Kolialexi A. 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Barcelona, Spain, 2014. Poster: «*MiRNA expression profile in tumor-stage mycosis fungoides*».

Συγγραφικό έργο/ Κεφάλαια σε βιβλία

Advances in Genetic Research, Nova Science Publishers, Inc. Chapter: «*MicroRNAs in disease: Recent advances and molecular background*».

Braoudaki M, Tounta G, **Lykoudi A**, Kanavakis E, Mavrou A, Kolialexi A.

Γνώσεις Υ/Η

Λειτουργικό σύστημα: Microsoft Office Software, Linux

Γλώσσες Προγραμματισμού: C, C++

Λογισμικά Προγράμματα: GenBank, Pubmed, SWISS-PROT, BLAST, TrEMBL, ProScan

Βάσεις Δεδομένων: GenBank, Pubmed, SWISS-PROT, BLAST, TrEMBL, miRbase

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Άριστη γνώση

Γαλλικά: Επαρκής γνώση

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	18
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	20
ABSTRACT	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
1 Προεκλαμψία.....	25
1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας.....	26
1.2 Διαγνωστικά Κριτήρια.....	27
1.3 Ταξινόμηση της Προεκλαμψίας.....	31
1.4 Διαφορική Διάγνωση - Διάκριση μεταξύ υπερτασικών επιπλοκών της κύησης.....	32
1.5 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ανάπτυξης της επιπλοκής.....	35
1.5.1 Ανάπτυξη του πλακούντα σε φυσιολογική κύηση.....	37
1.5.2 Ανεπάρκεια του πλακούντα και ελλιπής αγγειογένεση.....	39
1.5.3 Υποξικό περιβάλλον και Οξειδωτικό stress στην Προεκλαμψία.....	42
1.5.4 Φλεγμονώδης αντίδραση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων.....	43
1.5.5 Γενετικοί παράγοντες και Προεκλαμψία.....	44
1.6 Διαχείριση της Προεκλαμψίας - Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	45
1.7 Πρόληψη της Προεκλαμψίας.....	46
1.8 Πρόβλεψη της Προεκλαμψίας - Μέθοδοι πληθυσμιακού ελέγχου.....	48
1.8.1 Ατομικό και Οικογενειακό ιστορικό εγκύου.....	49
1.8.2 Βιοφυσικοί δείκτες.....	50
1.8.3 Βιοχημικοί δείκτες.....	51
1.8.4 Συνδυασμός δεικτών.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Micro RNAs (miRNAs)	54
2.1 Εισαγωγή στα miRNAs.....	54
2.2 Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs.....	55
2.2.1 Γονίδια και βιογένεση των miRNAs.....	55
2.2.2 Μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των mRNAs.....	56
2.3 Ονοματολογία.....	58
2.4 Ταυτοποίηση των miRNAs.....	59
2.5 Υπολογιστικές μέθοδοι για την αναγνώριση των mRNA στόχων.....	60
2.6 Τα miRNAs στη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα.....	62
2.7 Τα miRNAs στην Προεκλαμψία.....	66
2.8 Τα miRNAs ως βιοδείκτες.....	70
ΣΚΟΠΟΣ	71
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	74

3.1	Συλλογή δειγμάτων υλικού βιοψίας πλακούντα.....	76
3.2	Συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος εγκύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....		80
4.1	Απομόνωση ολικού RNA και εμπλουτισμός σε miRNAs.....	80
4.2	Ανίχνευση διαφορών έκφρασης των miRNAs σε εγκύους με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	81
4.2.1	Μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs του πλακούντα με miRNA μικροσυστοιχίες.....	81
4.2.2	Μελέτη του προτύπου έκφρασης των ελεύθερων miRNAs (circulating miRNAs) πλάσματος εγκύων με τη χρήση του συστήματος μαζικής αλληλούχισης miSeq...	83
4.3	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	87
4.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (qRT-PCR).....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		91
5.1	Πρότυπο έκφρασης των miRNAs του πλακούντα σε εγκύους με Προεκλαμψία και εγκύους χωρίς την επιπλοκή με τη μέθοδο των RNA μικροσυστοιχιών.....	92
5.1.1	Διαφορές στο επίπεδο έκφρασης των miRNAs του πλακούντα σε κυήσεις με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	92
5.1.2	Ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC curve analysis) Περιγραφική στατιστική ανάλυση: Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία με τα κλινικά στοιχεία (subgroup exploratory analysis)	94
5.1.3	Ανάλυση γονιδίων στόχων των miRNAs.....	96
5.1.4	Ανάλυση γονιδίων στόχων των miRNAs.....	102
5.1.5	Ταυτοποίηση του ρυθμιστικού ρόλου των miRNAs και των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν.....	104
5.1.6	Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με qRT-PCR.....	106
5.2	Μελέτη του προτύπου έκφρασης των ελεύθερων miRNAs με τη χρήση του συστήματος μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq.....	107
5.2.1	Ταυτοποίηση miRNAs με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης στο πλάσμα εγκύων με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία.....	108
5.2.2	Ανάλυση γονιδίων στόχων των miRNAs.....	109
5.2.3	Ταυτοποίηση ρυθμιστικού ρόλου των miRNAs.....	110
5.2.4	Ταυτοποίηση των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν τα miRNAs.....	111
5.2.5	Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με qRT-PCR.....	112
5.2.6	Περιγραφική στατιστική ανάλυση: Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα εγκύων με τα κλινικά στοιχεία της Προεκλαμψίας.....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		115
6.1	Συμπεράσματα.....	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....		142

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κριτήρια για τη διάγνωση της Προεκλαμψίας.....	29
Πίνακας 2: Η χρήση της ασπιρίνης για την πρόληψη της Προεκλαμψίας με βάση παράγοντες του ατομικού ιστορικού.....	48
Πίνακας 3: Βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση των γονιδίων-στόχων των miRNAs.....	61
Πίνακας 4: Micro RNAs του Πλακούντα.....	64
Πίνακας 5: MiRNAs που βρέθηκαν να σχετίζονται με την Προεκλαμψία (σε τουλάχιστον 4 μελέτες).....	68
Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων και νεογνών των δειγμάτων Προεκλαμψίας και της ομάδας ελέγχου.....	77
Πίνακας 7: Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων και νεογνών των δειγμάτων Προεκλαμψίας και της ομάδας ελέγχου.....	79
Πίνακας 8: Αποτελέσματα ελέγχου ποιότητας και καθαρότητας ολικού RNA πλάσματος εγκύων.....	107
Πίνακας 9: Συνολικός αριθμός αναγνώσεων της αλληλούχισης.....	107
Παράρτημα 1: Γονίδια στόχοι του miR23-5p.....	143
Παράρτημα 2: Γονίδια στόχοι του hsa-miR-99b-5p.....	148

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μηχανισμός ανάπτυξης της Προεκλαμψίας.....	37
Εικόνα 2: Διαμόρφωση του αγγειακού συστήματος του πλακούντα.....	38
Εικόνα 3: Ο ρόλος των αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων σε φυσιολογικές κήσεις και στην Προεκλαμψία.	40
Εικόνα 4: Σπειροειδείς αρτηρίες της μητέρας στην φυσιολογική κήση και την Προεκλαμψία.....	42
Εικόνα 5: Ανοσολογική αντίδραση της εγκύου.....	44
Εικόνα 6: Αλγόριθμος πρόβλεψης του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας στις 11-13 εβδομάδες κήσης (Αλγόριθμος Fetal Medicine Foundation).....	53
Εικόνα 7: Σύμπλοκο miRNA-miRNA* (pre-miRNA).....	56
Εικόνα 8: Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs.....	57
Εικόνα 9: Σύμπλοκο C19MC.....	63
Εικόνα 10: Αντιπροσωπευτική εικόνα των δεδομένων των αναγνώσεων σε μορφή FASTQ με το Solexa CHASTITY quality filter.....	85
Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτική εικόνα των δεδομένων από τη στοίχιση και τη σύγκριση των αλληλουχιών σε μορφή Sequence Alignment Map (SAM).....	86
Εικόνα 12: Καμπύλη αντίδρασης qRT-PCR.	90
Εικόνα 13: MiRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση από την ανάλυση υλικού βιοψίας πλακούντες από γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.....	92
Εικόνα 14: Ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία.....	93
Εικόνα 15: Ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης των miRNAs σε βιοψίες πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία ανάλογα με τον υπότυπο της επιπλοκής.....	93
Εικόνα 16: Καμπύλη ανάλυσης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη για τη διερεύνηση διαγνωστικής αξίας των miRNAs με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης σε υλικό βιοψίας πλακούντα από Προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.....	95
Εικόνα 17: Τα miRNAs με στατιστικώς σημαντική διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα από εγκύους με Προεκλαμψία σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.....	97
Εικόνα 18: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης (EOPE) (n=11), όψιμης έναρξης (LOPE) (n=5) και της ομάδας ελέγχου (n=8).....	99
Εικόνα 19: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία και έμβρυα με IUGR (n=8) σε σύγκριση με τα δείγματα Προεκλαμψία χωρίς IUGR (n=8)	100

Εικόνα 20: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας (n=14) όταν αυτά συγκρίθηκαν με τα δείγματα Προεκλαμψίας χωρίς την εμφάνιση του συμπτώματος της πρωτεϊνουρίας (n=2).....	101
Εικόνα 21: Γονίδια - στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε πλακούντες εγκύων με Προεκλαμψία.....	103
Εικόνα 22: Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συσχετίζονται με τη διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs στους πλακούντες από κυήσεις με Προεκλαμψία.....	105
Εικόνα 23: Γράφημα λόγου διαφοροποιημένης έκφρασης του miR-518a-5p/miR-527 με τη μέθοδο των miRNAs μικροσυστοιχιών και της qRT-PCR (μπλε).....	106
Εικόνα 24: Α. Διάγραμμα κατανομής της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα εγκύων, Β. Διάγραμμα volcano plot των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	108
Εικόνα 25: Χρωμοσωμική θέση των miR-99b-5p, miR-23b-5p, miR-525-5p και miR-548e-3p.....	109
Εικόνα 26: Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των γονιδίων στόχων των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης.....	110
Εικόνα 27: Σηματοδοτικοί οδοί στις οποίες συμμετέχουν γονίδια-στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία.....	111
Εικόνα 28: Λόγος διαφοροποιημένης έκφρασης του miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p με το σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq και qRT-PCR	112
Εικόνα 29: Καμπύλη ανάλυσης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη για τη διερεύνηση της διαγνωστικής αξίας των miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p σε δείγματα πλάσματος πρώτου τριμήνου.....	114

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACOG	Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων
AT-1AA	Υποδοχέας της αγγειοτενσίνης II
AUC	Area Under Curve, ROC Analysis
β-hCG	β-Χοριακή Γοναδοτροπίνη
BMI	Δείκτης Μάζας Σώματος -Body Mass Index
cDNA	Συμπληρωματικό DNA
cfDNA	Ελεύθερο DNA - cell free DNA
cffDNA	Ελεύθερου εμβρυϊκού DNA - cell free fetal DNA
CI	Confidence Intervals
CRL	Κεφαλοουριαίο μήκους - Crown-rump length
ΔΑΠ	Διαστολική Αρτηριακή Πίεση
DCs	Δενδριτικά κύτταρα - dendritic cells
DR	Ποσοστό ανίχνευσης - Detection Rate
EOPE	Προεκλαμψία Πρώιμης Έναρξης συμπτωμάτων
EVTs	Τροφοβλαστικά κύτταρα της εξωλάχνης - Extravillous trophoblastic cells
FC	Fold Change
FDR	False Detection Rate
FMF	Fetal Medicine Foundation
Flt1	Fms like tyrosine kinase 1
FPR	Ποσοστό ψευδώς θετικού αποτελέσματος - False Positive Rate
GH	Υπέρταση κύησης - Gestational hypertension
GO	Γονιδιακή Οντολογία - Gene Ontology
HCL	Ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης - Hierarchical clustering
HELLP	Syndrome characterized by Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1
HLA	Human Leukocyte Antigen
IL	Ιντερλευκίνη
IFN- γ	Ιντερφερόνη - γ
ISSHP	Διεθνής Εταιρεία Μελέτης της Υπέρτασης στην Εγκυμοσύνη
IUGR	Υπολειπόμενη Ανάπτυξη του Εμβρύου
JAR1	Jasmonate Response locus 1

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
LDH	Γαλακτική αφυδρογονάση του ορού - serum lactate dehydrogenase
LMWH	Low molecular weight heparin
LOG2	Δυαδικός Λογάριθμος του λόγου διαφορικής έκφρασης
LOPE	Προεκλαμψία Όψιμης Έναρξης συμπτωμάτων
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
MSC	Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα - mesenchymal stem cells
NK cells	Natural Killer κύτταρα
PAPP-A	Pregnancy Associated Plasma Protein
PI	Αντίσταση Ροής- Pulsatility Index
PIGF	Πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας - Placental Growth Factor
PPV	Θετική Προγνωστική Δυναμική - Positive Predictive Value
RAAS	Σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης και αλδοστερόνης
RNase	Ριβονουκλεάση
ROC	Ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη - Receiver Operating Characteristics
RR	Relative Risk
RUPP	Μητρο-πλακουντιακή διήθηση - uteroplacental perfusion pressure
ΣΑΠ	Συστολική Αρτηριακή Πίεση
SE	Standard Error
sEng	Διαλυτή μορφή της ενδογλίνης - soluble Endoglin
sFlt-1	Soluble Fms like tyrosine kinase 1
STMBs	Συσσωματώματα αποπτωτικών συγκυτιοτροφοβλάστων - syncytiotrophoblast microparticles
tDC	Δενδριτικά ώριμα κύτταρα - tolerogenic dendric cells
TGF-β	Αυξητικός παράγοντας - Transforming Growth Factor – β
Th cell	T βοηθητικά κύτταρα - T helper
TNF-α	Tumor necrosis Factor - α
Treg	T ρυθμιστικά κύτταρα - T regulator cells
UtA-PI	Δείκτης παλμικότητας Doppler -Uterine Artery Pulsatility Index
VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας - Vascular endothelial Growth Factor

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εντάσσεται στο πλαίσιο της παγκόσμιας ερευνητικής προσπάθειας για τη διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας της Προεκλαμψίας και την ταυτοποίηση βιοδεικτών πρόωμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της. Με δεδομένο ότι ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης της Προεκλαμψίας είναι ο τοκετός, ενσωμάτωση αυτών των δεικτών στην κλινική πράξη έχει τη δυνατότητα να αλλάξει τον τρόπο αντιμετώπισης της επιπλοκής και να οδηγήσει σε άμεση θεραπευτική παρέμβαση, ελαχιστοποίηση των συμπτωμάτων για τη μητέρα και γέννηση νεογνών που δεν θα χρειάζεται νοσηλεία σε εντατική μονάδα.

Στο σημείο αυτό, θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω στον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής κ. Νικόλαο Παπαντωνίου, Ομότιμο Καθηγητή Μαιευτικής & Γυναικολογίας - Εμβρυομητρικής Ιατρικής, ο οποίος κατά τη θητεία του ως Διευθυντής της Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, έδειξε εμπιστοσύνη στο πρόσωπο μου, ειλικρινές και αμείωτο ενδιαφέρον και αμέριστη συμπαράστασή καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Αποτελεί παράδειγμα καθηγητή που εμπιστεύεται και δίνει ευκαιρίες στους νέους επιστήμονες και με προσωπική επίβλεψη φροντίζει για τη συνεχή εκπαίδευση τους.

Εγκάρδιες ευχαριστίες οφείλω και στην Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής κα Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου, για την ουσιαστική συμβολή της στο σχεδιασμό της μελέτης, την καθοδήγηση της και το ειλικρινές ενδιαφέρον που επέδειξε για το έργο μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την Καθηγήτρια Γενετικής κα Μαρία Τζέτη για τις εύστοχες παρατηρήσεις της και την αμέριστη υποστήριξή της κατά την πειραματική διαδικασία και τη συγγραφή των κειμένων. Ήταν πάντα διαθέσιμη και πρόθυμη να συμβάλλει στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Την κα Traeger-Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής - Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Νοσοκομείο Παιδών «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ», ΕΚΠΑ, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές της καθώς και για την αμέριστη ψυχολογική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Dr. Αγγελική Κολιαλέξη, Επιστημονικό Συνεργάτη στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, για τη συνεχή στήριξή της, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και το χρόνο που μου αφιέρωσε. Η συμβολή της ήταν καθοριστική στο σχεδιασμό της μελέτης, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή των κειμένων. Η άρτια επιστημονική της κατάρτιση και η συνεχής καθοδήγησή της ήταν πολύτιμα σε κάθε στάδιο.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην αναφερθώ στη σημαντική βοήθεια του Dr. Γεωργίου Λάμπρου στην στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τον οποίο ευχαριστώ πολύ.

Θέλω ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω τους ιατρούς της Γ΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, τον Dr. Γεώργιο Παπαϊωάννου και τον Dr. Νικόλαο Ευαγγελινάκη για τη συλλογή των δειγμάτων και κλινικών/δημογραφικών στοιχείων των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη καθώς και τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας.

Επιθυμώ επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στις αγαπητές φίλες και εξαιρετες συναδέλφους, την Dr. Μαρία Μπραουδάκη, ερευνήτρια στο τμήμα Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Hertfordshire στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Dr. Γεωργία Τούντα για την ανεκτίμητη βοήθειά τους, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους στην ανάπτυξη των ερευνητικών πρωτοκόλλων και τη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους.

Ευχαριστώ επίσης οφείλω και σε όλες τις εγκύους που έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για συμμετοχή στη μελέτη, η πραγματοποίησή της οποίας χωρίς τη συμμετοχή τους θα ήταν ανέφικτη.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη και συμπαράστασή τους σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης είναι η ταυτοποίηση miRNAs που σχετίζονται με την πρόβλεψη και τον παθογενετικό μηχανισμό της Προεκλαμψίας μετά από μελέτη της έκφρασης τους σε υλικό βιοψίας πλακούντα κατά τον τοκετό και το περιφερικό αίμα εγκύων το 1^ο τρίμηνο της κύησης που αργότερα (μετά την 20^η εβδομάδα κύησης), εμφάνισαν την επιπλοκή σε σχέση με εγκύους με φυσιολογική πορεία και έκβαση της κύησης.

Βιολογικό υλικό της μελέτης & Μεθοδολογία: Στην πρώτη φάση της μελέτης έγινε ταυτοποίηση της έκφρασης των miRNAs του πλακούντα με τη χρήση miRNA μικροσυστοιχιών σε υλικό βιοψίας από 24 εγκύους, 11 από αυτές διαγνώστηκαν με τον πρώιμο τύπο της επιπλοκής, 5 με Προεκλαμψία όψιμης έναρξης και 8 από εγκύους με νορμοτασικές κύσεις (ομάδα ελέγχου).

Στη δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των miRNAs με σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης, σε δείγματα πλάσματος από εγκύους στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, από τις οποίες 5 εμφάνισαν αργότερα Προεκλαμψία (μετά την 20^η εβδομάδα) και 5 από εγκύους χωρίς την επιπλοκή. Στη φάση αυτή, η μελέτη επικεντρώθηκε στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης (> 34 εβδ. κύησης) η οποία αποτελεί ποσοστό 80% των περιστατικών με την επιπλοκή.

Και στις δύο περιπτώσεις ακολούθησε ανάλυση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων με προγράμματα βιοπληροφορικής, για την ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων, των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν και την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) (βιολογική διαδικασία, μοριακή λειτουργία και κυτταρική σύσταση). Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, η διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA που διαπιστώθηκε με τη χρήση των μικροσυστοιχιών ή/και του συστήματος μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο qRT-PCR η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών.

Αποτελέσματα: Μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία σε σχέση με εγκύους χωρίς την επιπλοκή οδήγησε στη ταυτοποίηση 10 miRNAs (miR-500a, miR-383, miR-518a-5p/miR-527, miR-431, miR-423-3p, miR-124*, miR-1183, miR-130b, miR-3942 και miR-544b) με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στατιστική ανάλυση με κατασκευή καμπυλών ROC και μονομεταβλητή λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε σημαντική συσχέτιση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση με τον υπότυπο της επιπλοκής και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των miR-423,

miR-124* και miR-431 και η μειωμένη έκφραση των miR-544b και miR-3942 στον πλακούντα σχετίζεται με τη διάγνωση Προεκλαμψίας με πρώιμη έναρξη και βαριά συμπτωματολογία ενώ η υπερέκφραση του miRNA-518a-5p/miR-527 σε πλακούντες από κυήσεις με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης κήσης σε σχέση με τον όψιμης έναρξης υπότυπο συνδέεται με παρουσία ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου και πρωτεϊνουρία γεγονός που καθιστά το μόριο αυτό πιθανό βιοδείκτη για διάγνωση, διαφορική διάγνωση και πρόβλεψη της βαρύτητας της επιπλοκής.

Συγκριτική ανάλυση του προτύπου έκφρασης των miRNAs πλάσματος εγκύων από κυήσεις με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία και κυήσεις χωρίς την επιπλοκή οδήγησε στον εντοπισμό 4 miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία, 2 με σημαντική υπερέκφραση (miR-525-5p, miR-548e-3p) και 2 με μειωμένη έκφραση (miR-99b-5p, miR-23b-5p). *In silico* ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής αποκάλυψε ότι τα γονίδια-στόχοι των miRNAs εμπλέκονται σε ρυθμιστικές οδούς που σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων, τη φλεγμονώδη αντίδραση, την αγγειογένεση και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων επιλεγμένων miRNA (miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-99b-5p και miR-23b-5p ($p < 0.046$]) στο περιφερικό αίμα εγκύων, το 1^ο τρίμηνο της κύησης σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά για πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής με ευαισθησία >60% και ειδικότητα >70%. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός miR-525-5p - PAPP-A - MAP που παρουσιάζει 100% ειδικότητα και 73% ευαισθησία και ο συνδυασμός miR-548e-3p - PAPP-A - UtPI με 90% ευαισθησία και 76% ειδικότητα.

Συμπεράσματα: Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιβεβαιώνουν τη διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs στο πλακούντα και το περιφερικό αίμα εγκύων με Προεκλαμψία και υπογραμμίζουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των μορίων αυτών ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόβλεψη, πρόληψη και θεραπευτική αντιμετώπιση της επιπλοκής. Παρά το ότι απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, σε ευρείας κλίμακας μελέτες ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τον εντοπισμό υποψήφιων βιοδεικτών που θα μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας, να βελτιώσουν τις δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης και να προσφέρουν εφησυχασμό στους υποψήφιους γονείς για την πορεία και την έκβαση της κύησης.

ABSTRACT

Introduction: Preeclampsia is a hypertensive obstetric complication characterized by generalized maternal systemic inflammation and endothelial dysfunction. The complication is associated with substantial maternal and fetal morbidity and mortality. MicroRNAs (miRNA) belong to a family of small non-coding RNAs that regulate gene expression at the stage of post-transcriptional level by degrading or blocking translation of messenger RNA (mRNA).

Aim: The aim of the study was to characterize miRNAs associated with the pathogenic mechanism of Preeclampsia analyzing their expression profiles both in placental tissue biopsies at delivery and plasma samples from women in the first trimester of pregnancy that subsequently develop late onset Preeclampsia (after 20th week of gestation), compared to uncomplicated pregnancies. Furthermore, we aimed to evaluate the potential use of these miRNAs as non-invasive diagnostic and putative prognostic biomarkers for Preeclampsia.

Materials and Methods: On the first stage of the study, the expression profile of placental miRNAs was analyzed in 16 placental tissue biopsies from women with Preeclampsia (11 with early onset and 5 with late onset Preeclampsia) and 8 placental tissue biopsies from uncomplicated pregnancies, using miRNA microarrays. The samples were analyzed based on the stage of onset and the severity of clinical manifestation of the complication.

During the second stage of the study, maternal peripheral blood samples were obtained from a non-selected population of 2437 Caucasian pregnant women at 11⁺⁰ to 13⁺⁶ weeks of gestation undergoing first trimester prenatal screening for fetal aneuploidies. Based on these data, 34 samples were retrieved for miRNA profiling analysis, comprising 17 from women who subsequently developed late onset Preeclampsia and required delivery at >34 weeks of gestation and 17 from uncomplicated pregnancies matching for maternal age, gestational age and duration of storage. The expression profile of miRNAs was analyzed in 5 first trimester plasma samples from women who developed late onset Preeclampsia and 5 controls using deep sequencing analysis. The study was focused in late onset Preeclampsia (delivery >34 weeks of gestation) that consist 80% of complication cases.

For statistical analysis, the MATLAB[®] simulation environment was applied. Differences in clinical characteristics between the two groups were assessed using one-way ANOVA for independent variables or Mann-Whitney *U*-test for continuous variables. Receiver operating characteristic (ROC) curve was performed to evaluate the diagnostic potential of differentially expressed miRNAs with 95% standard error and 95% confidence intervals. Differentially expressed miRNAs were further analyzed and enriched for known functions and their potential target genes. In gene ontology analysis (GO), the number of genes corresponding to GO entries namely Biological Process, Molecular function and Cellular

Component, were determined and enrichment score was reported as the $-\log$ (p-value). The results of miRNAs expression profiles both of microarrays and deep sequencing were verified in all samples using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, a method of increased sensitivity and specificity for the detection of these sequences.

Results: Expression profile analysis of miRNAs in placental tissue biopsy from pregnancies complicated by Preeclampsia compared to healthy uncomplicated pregnancies revealed a more than two fold increased in expression levels of 8 miRNAs (miR-500a, miR-383, miR-518a-5p/miR-527, miR-431, miR-423-3p, miR-124*, miR-1183, miR-130b) and a more than two-fold decrease in expression levels of 2 miRNAs (miR-3942, miR-544b) in Preeclampsia cases. ROC analysis revealed statistical significant correlation of miRNAs with Preeclampsia subtypes and severity of clinical symptoms. MiR-423, miR-124* and miR-431 were over-expressed while miR-544b and miR-3942 were down regulated in early onset Preeclampsia cases as compared to late onset Preeclampsia and controls. Importantly, over-expression of miR-518a-5p/miR-527 in cases of early onset Preeclampsia was further associated with intra uterine growth restriction and severe clinical manifestation, emerging its diagnostic potential on prediction of severity of the complication.

Deep sequencing analysis of circulating miRNA in plasma sample of pregnant women with late onset Preeclampsia compared to those with uncomplicated pregnancies revealed 2 miRNAs with significant increased expression profile (miR-525-5p, miR-548e-3p) and 2 miRNAs with significant reduced expression (miR-99b-5p, miR-23b-5p). *In silico* analysis showed that target genes of these miRNAs are associated with signaling pathways of angiogenesis, immune response, lymphocyte differentiation and insulin resistance. Since these miRNAs implicate in pathogenic mechanisms leading to the induction of late onset Preeclampsia, we found that in combination with clinical symptoms could reveal predictive models for diagnosis with $>60\%$ sensitivity and $>70\%$ specificity. Interestingly, the predictive model of miR-525-5p - PAPP-A - MAP showed 100% specificity and 73% sensitivity while the predictive model of miR-548e-3p - PAPP-A - UtPI showed 90% sensitivity and 76% specificity.

Conclusions: Our findings provided significant insights about the role of miRNAs in pathogenesis of Preeclampsia and emphasize the possibility of using these molecules as biomarkers for the prevention, prognosis and non-invasive diagnosis of the complication. Since specific miRNAs can differentiate the subtypes of Preeclampsia, these molecules might also guide the development of novel therapeutic interventions. The results of this study are preliminary and thus further studies using larger heterogeneous cohorts are required to validate the data obtained, assess their clinical value and establish the performance of miRNAs as biomarkers of Preeclampsia.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Προεκλαμψία

Η Προεκλαμψία είναι ιδιοπαθής πολυσυστηματική επιπλοκή της κύησης γνωστή ήδη από την αρχαιότητα με τον όρο «σπασμοί της κύησης» [1]. Εμφανίζεται αποκλειστικά στον άνθρωπο μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης κυρίως μέσω της διάγνωσης υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας. Η παρουσία του πλακούντα είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των συμπτωμάτων της επιπλοκής γεγονός που επιβεβαιώνεται από την άμεση υποχώρηση τους μετά τον τοκετό. Αντίθετα, η παρουσία εμβρύου δεν αποτελεί προϋπόθεση για την εμφάνιση της επιπλοκής, όπως αποδεικνύεται από το υψηλό ποσοστό σε περιπτώσεις με υδατιδώδη μύλη κύηση.

Η επίπτωση της Προεκλαμψίας κυμαίνεται από 2 έως 8% των κύσεων [2]. Η μεγάλη αυτή διακύμανση πιθανώς συνδέεται με βασικές διαφορές στα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται από διαφορετικές Διεθνείς Επιστημονικές Εταιρείες Μαιευτικής/Γυναικολογίας. Στην Αμερική, τον Καναδά και τη Δυτική Ευρώπη η συχνότητα της Προεκλαμψίας υπολογίζεται σε ποσοστό 2 έως 5% ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες και κάποιες περιοχές της Αφρικής αγγίζει ακόμη και το 18% [3].

Η επιπλοκή αποτελεί παγκοσμίως μια από τις κυριότερες αιτίες μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα στην Λατινική Αμερική, η Προεκλαμψία ευθύνεται για το ποσοστό 26% των μητρικών θανάτων ενώ στην Αφρική και την Ασία για το 9%. Δέκα εκατομμύρια γυναίκες ετησίως εμφανίζουν την επιπλοκή ενώ εβδομήντα έξι χιλιάδες από αυτές καθώς και πεντακόσια χιλιάδες έμβρυα/νεογνά καταλήγουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή κατά τον τοκετό λόγω της Προεκλαμψίας [4,5]. Παρατηρούνται ωστόσο, διαφορές όσον αφορά στην έκβαση των κύσεων με Προεκλαμψία μεταξύ αστικών και αγροτικών περιοχών καθώς και μεταξύ αναπτυσσόμενων και αναπτυγμένων χωρών πιθανώς λόγω σημαντικών διαφορών στην περιγεννητική φροντίδα και περίθαλψη [6,7]. Οικονομικές ανισότητες, η απόσταση από ιατρικά κέντρα παροχής εξειδικευμένης φροντίδας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (χαμηλού επιπέδου παροχές υγείας), η ελλιπής πληροφόρηση των γυναικών σχετικά με την επιπλοκή και το μορφωτικό επίπεδο αποτελούν επιπλέον παράγοντες οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας εξαιτίας της επιπλοκής [8,9].

1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας

Η εμφάνιση της Προεκλαμψίας έχει συνδεθεί με καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες κινδύνου. Οι παράγοντες αυτοί δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής, ωστόσο μπορούν να συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό της εγκυμοσύνης ως υψηλού ή χαμηλού κινδύνου.

Ακραίες ηλικίες της μητέρας (< 20 και > 35 ετών) και αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index - BMI) αναφέρονται ως παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας. Σε εγκύους με δείκτη μάζας σώματος <20 Kg/m² ο κίνδυνος υπολογίζεται σε 4,3% έναντι 13,3% σε αυτές με BMI >35 Kg/m² [8].

Χρόνια νοσήματα της μητέρας, όπως χρόνια υπέρταση, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, θρομβοφιλία, νεφρική νόσος, νόσοι του κολλαγόνου και αυτοάνοσα νοσήματα συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής. Προϋπάρχουσα υπέρταση ή σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ τύπου 1 ή 2) έχουν επίσης συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας ενώ γυναίκες με ιστορικό χρόνιας υπέρτασης έχουν 25% πιθανότητα να αναπτύξουν την επιπλοκή κατά τη διάρκεια της κύησης [10,11].

Ο κίνδυνος εμφάνισης της Προεκλαμψίας είναι μεγαλύτερος στις πρωτότοκες γυναίκες χωρίς κάποιο άλλο προφανή παράγοντα κινδύνου [12]. Επιπλέον, ο κίνδυνος εμφάνισης της επιπλοκής αυξάνεται όταν υπάρχει ιστορικό αποβολών ή αλλαγή πατρότητας πιθανώς γιατί η παρατεταμένη έκθεση της εγκύου στα πατρικής προέλευσης εμβρυϊκά αντιγόνα δρα προστατευτικά σε επόμενη εγκυμοσύνη με τον ίδιο πατέρα.

Γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό Προεκλαμψίας έχουν διπλάσιο έως τετραπλάσιο κίνδυνο να εμφανίσουν την επιπλοκή ενώ σε αυτές με θετικό ατομικό ιστορικό Προεκλαμψίας ο κίνδυνος εμφάνισης σε επόμενη εγκυμοσύνη είναι μεγαλύτερος από αυτόν στο γενικό πληθυσμό (1:7 γυναίκες) [12,13].

Η χρησιμοποίηση μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με γαμέτες από δότες (σπέρμα, ωάρια ή/και έμβρυα), κυρίως σε γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών ή με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, προδιαθέτει την εμφάνιση της επιπλοκής πιθανώς λόγω μεταβολών στο ανοσολογικό σύστημα της εγκύου ή λόγω της συχνής συνύπαρξης με πολύδυμη κύηση [14][42]. Επισημαίνεται ότι ο κίνδυνος εμφάνισης Προεκλαμψίας σε δίδυμες κυήσεις είναι 13% έναντι 5% σε μονήρεις.

Γενετικοί παράγοντες έχουν επίσης συνδεθεί με κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση, οι Fong και συν. αναφέρουν αυξημένο κίνδυνο σοβαρής Προεκλαμψίας σε γυναίκες φορείς μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών των θρομβοφιλικών

γονιδίων όπως του παράγοντα V (rs6025), του παράγοντα II (Προθρομβίνη μετάλλαξη G20210A) και του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης (rs1137100) καθώς και σε ομόζυγες γυναίκες με το αλληλίο Asp298 του γονιδίου *eNOS* [14]. Η *eNOS* πρωτεΐνη έχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αγγειοσπασμού και είναι υπεύθυνη για την αιμοδυναμική κατάσταση της εγκύου το πρώτο τρίμηνο της κύησης.

1.2 Διαγνωστικά Κριτήρια

Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα εκδήλωσης της Προεκλαμψίας είναι η υπέρταση και πρωτεϊνουρία. Επειδή πολλές διαταραχές της κύησης χαρακτηρίζονται από υπέρταση δημιουργείται «σύγχυση» διεθνώς σε ό,τι αφορά τα διαγνωστικά κριτήρια και τη διαφορική διάγνωση του συνδρόμου από άλλες υπερτασικές διαταραχές της κύησης. Το 2014, η Διεθνής Εταιρεία Μελέτης της Υπέρτασης στην Εγκυμοσύνη (ISSHP- International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) αναθεώρησε τον ορισμό της Προεκλαμψίας και άλλων υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης (Πίνακας 1) [15].

Σύμφωνα με τον αναθεωρημένο ορισμό της ISSHP, η Προεκλαμψία εκδηλώνεται κλινικά με *de novo* υπέρταση (συστολική αρτηριακή πίεση > 140 mm Hg ή διαστολική αρτηριακή πίεση > 90 mm Hg σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 4 έως 6 ωρών μεταξύ τους, σε εγκύους με προηγούμενη φυσιολογική αρτηριακή πίεση) μετά την 20^η εβδομάδα κύησης, η οποία συνυπάρχει με μια από τις παρακάτω νεοεμφανιζόμενες καταστάσεις [16]:

1. Πρωτεϊνουρία: Ορίζεται ως η πρωτεΐνη στα ούρα ≥ 300 mg ημερησίως. Εναλλακτικά, είναι αποδεκτή η διάγνωση της πρωτεϊνουρίας όταν ο λόγος πρωτεΐνη : κρεατινίνη είναι τουλάχιστον 0.3 (κάθε μέτρηση λαμβάνεται ως mg/dL). Η μέτρηση αυτή έχει αποδειχτεί ότι αντιστοιχεί σε ≥ 300 mg πρωτεΐνης ούρων 24ώρου [17]. Σε περίπτωση που καμία από τις ανωτέρω μεθόδους δεν είναι διαθέσιμη, μπορεί να γίνει χρήση δοκιμαστικών ταινιών (dipstick reading), όπου η διάγνωση της πρωτεϊνουρίας αντιστοιχεί σε «2+», αλλά η μέθοδος στερείται ευαισθησίας.

2. Δυσλειτουργία οργάνων της μητέρας:

- Νεφρική ανεπάρκεια (κρεατινίνη ≥ 90 $\mu\text{mol} / \text{L}$ ή 1,02 mg /dL).
- Ηπατική συμμετοχή (αυξημένες τιμές τρανσαμινασών, τουλάχιστον δύο φορές μεγαλύτερες από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια και άλγος στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλίας ή στο επιγάστριο).
- Εκδηλώσεις από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (κεφαλαλγίες που συνοδεύονται από αύξηση των τενόντιων αντανεκλαστικών, μεταβολή της νοητικής κατάστασης, διαταραχές όρασης, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και σπασμοί).

- Αιματολογικές επιπλοκές (θρομβοκυτταροπενία - αιμοπετάλια <150.000/dL, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη και αιμόλυση).
- Μητρο-πλακουντιακή δυσλειτουργία η οποία οδηγεί σε ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου (IUGR - Intra Uterine Growth Restriction) και μπορεί να εκτιμηθεί μέσω του υπερηχογραφήματος Doppler ήδη από το πρώτο τρίμηνο της κύησης.

Σύμφωνα με την ανωτέρω οδηγία όλες οι γυναίκες με υπέρταση (ακόμη και χωρίς πρωτεϊνουρία) θα πρέπει να ελέγχονται με σκοπό να αποκλειστεί η διάγνωση της Προεκλαμψίας και το ενδεχόμενο δυσλειτουργίας κάποιου οργάνου. Επιπλέον, υπάρχουν συμπτώματα τα οποία όταν εμφανιστούν, ακόμη και αν δεν υπάρχει διάγνωση Προεκλαμψίας, επισημαίνουν την ανάγκη για εντατική παρακολούθηση της εγκύου για το ενδεχόμενο ανάπτυξης της επιπλοκής. Αυτά περιλαμβάνουν την εμφάνιση ισχυρής κεφαλαλγίας, οπτικών διαταραχών, κοιλιακού άλγους ειδικά όταν αυτό εμφανίζεται στο δεξί άνω τεταρτημόριο ή συνοδεύεται από ισχυρό πόνο στο επιγάστριο. Η εντατική παρακολούθηση προτείνεται και στις περιπτώσεις διάγνωσης ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου ή εμφάνισης πρωτεϊνουρίας μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης [18,19].

Η παρουσία γενικευμένου οιδήματος (κυρίως κάτω άκρων και πνευμόνων) δεν περιλαμβάνεται πλέον στα κλινικά χαρακτηριστικά της επιπλοκής, μπορεί όμως να θεωρηθεί ως επιπλέον δείκτης επικείμενης εμφάνισης Προεκλαμψίας [20]. Στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας σε συνδυασμό με μείωση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στο περιφερικό αίμα [21].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο καθορισμός των κλινικοεργαστηριακών συμπτωμάτων και η έγκαιρη διάγνωση της Προεκλαμψίας συμβάλλουν στη σωστή παρακολούθηση της εγκύου και την εμπεριστατωμένη διαχείριση των δευτερευόντων συμπτωμάτων της επιπλοκής με αποτέλεσμα την καθυστέρηση του τοκετού και τη μείωση της περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Πίνακας 1: Κριτήρια για τη διάγνωση της Προεκλαμψίας

Βασική Συμπτωματολογία (> 20 εβδομάδες κύησης)

Αρτηριακή Πίεση	$\geq 140\text{mm Hg}$ ΣΑΠ* ή $\geq 90\text{mm Hg}$ ΔΑΠ** σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους $\geq 160\text{mm Hg}$ ΣΑΠ ή $\geq 110\text{mm Hg}$ ΔΑΠ, σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με λίγα λεπτά διαφορά μεταξύ τους
-----------------	---

Πρωτεϊνουρία	≥ 300 mg πρωτεΐνη σε ένα δείγμα ούρων 24ώρου Πρωτεΐνη : Κρεατίνη ≥ 0.3
--------------	---

Συμπτώματα Προεκλαμψίας επι απουσίας πρωτεϊνουρίας

Αιματολογικές επιπλοκές	Θρομβοπενία (Αιμοπετάλια $< 100.000/\mu\text{L}$) Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη Αιμόλυση
-------------------------	---

Νεφρική Ανεπάρκεια	Κρεατινίνη ορού > 1.1 mg/dL Έντονος πόνος στο επιγάστριο με την ταυτόχρονη έλλειψη άλλης νεφρικής διαταραχής
--------------------	---

Ηπατική Δυσλειτουργία	Διπλάσιο από το φυσιολογικό επίπεδο συγκέντρωσης ηπατικών τρανσαμινασών στο αίμα Άλγος στο δεξιό άνω τεταρτημόριο της κοιλιάς ή στο επιγάστριο
-----------------------	---

Οίδημα	Πνευμονικό Οίδημα Οίδημα κάτω άκρων
--------	--

Νευρολογικές επιπλοκές	Σοβαρή κεφαλαλγία Αύξηση αντανακλαστικών - Κλώνος Προβλήματα όρασης Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
------------------------	--

*ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ** ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση

Κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων στη μητέρα ή και στο έμβρυο

Πρόσφατες, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ιστορικό Προεκλαμψίας ή υπέρτασης προκαλούμενης από την κύηση συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων αργότερα κατά τη διάρκεια ζωής της γυναίκας [22].

Εκτός από την μητέρα οι επιπτώσεις της Προεκλαμψίας έχουν μελετηθεί και στο νεογνό. Είναι γνωστό ότι νεογνά εγκύων που εμφάνισαν Προεκλαμψία έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν αργότερα, ως ενήλικες, υπέρταση, μεταβολικό σύνδρομο ή και καρδιαγγειακά νοσήματα [22].

Το 2011, ο Αμερικάνικος Σύλλογος Καρδιακών Νοσημάτων (American Heart Association) πρόσθεσε την Προεκλαμψία στους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο και καρδιακή ανεπάρκεια [23].

Παλαιότερα η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε ότι οι γυναίκες που είχαν αναπτύξει Προεκλαμψία μόνο στην πρώτη τους εγκυμοσύνη δεν είχαν αυτόν τον κίνδυνο. Παρόλα αυτά, μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό γυναικών με συστηματική παρακολούθηση (follow up) σε μεγαλύτερο χρόνο έδειξαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων ακόμα και σε γυναίκες που είχαν την επιπλοκή μόνο στην πρώτη τους εγκυμοσύνη [24]. Σύμφωνα με νεότερα επιδημιολογικά δεδομένα γυναίκες που ανέπτυξαν Προεκλαμψία έχουν δώδεκα φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν καρδιαγγειακό νόσημα σε σχέση με εκείνες χωρίς την επιπλοκή [25]. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται περαιτέρω σε περίπτωση επανεμφάνισης της Προεκλαμψίας στις επόμενες κυήσεις [26]. Αυξάνεται επίσης, όταν η Προεκλαμψία συνοδεύεται από πρόωρο τοκετό [22,27].

Οι γυναίκες που εμφανίζουν Προεκλαμψία κατά την κύηση πρέπει να ενημερώνονται ανάλογα για τη διατήρηση του σωματικού βάρους σε φυσιολογικά επίπεδα, τη συστηματική άθληση, τη διακοπή του καπνίσματος και την ανάγκη αυστηρής ιατρικής παρακολούθησης.

1.3 Ταξινόμηση της Προεκλαμψίας

Ανάλογα με την ηλικία κύησης κατά την οποία εμφανίζονται τα συμπτώματα η Προεκλαμψία ταξινομείται σε πρόιμης έναρξης (Early onset Preeclampsia - EOPE) όταν αυτά εμφανιστούν πριν τις 34 εβδομάδες κύησης και όψιμης έναρξης (Late onset Preeclampsia - LOPE) όταν αυτά εμφανιστούν μετά τις 34 εβδομάδες [28]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης περιλαμβάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων της επιπλοκής (περίπου 80%), στον πρώιμο υπότυπο αντιστοιχούν τα υψηλότερα ποσοστά μητρικής και νεογνικής θνησιμότητας και νοσηρότητας [29].

Ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων και το βαθμό της συστηματικής συμμετοχής η Προεκλαμψία ταξινομείται σε «ήπιο», «ενδιάμεσο» και «σοβαρό» υπότυπο. Σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων - Γυναικολόγων (ACOG) [16], η ορολογία πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή και σε κάθε περίπτωση το σύνδρομο να αντιμετωπίζεται ως μια εν δυνάμει σοβαρή κατάσταση της κύησης με αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Προς το παρόν τουλάχιστον, δεν υπάρχει δυνατότητα διαχωρισμού της ήπιας από την μέτρια - ενδιάμεση μορφή της επιπλοκής. Για το λόγο αυτό προτιμάται η χρήση των όρων «βαριά Προεκλαμψία, με σοβαρή συμπτωματολογία» και «Προεκλαμψία χωρίς σοβαρή συμπτωματολογία». Και στις δύο περιπτώσεις ο κίνδυνος νοσηρότητας και θνησιμότητας είναι εξ' ίσου μεγάλος.

Εξαιρετικά σημαντικός για τη διαχείριση της επιπλοκής είναι ο έλεγχος των κλινικών ευρημάτων «βαριάς Προεκλαμψίας». Περιστατικά «βαριάς Προεκλαμψίας», ορίζονται αυτά που θα παρουσιάσουν τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω κλινικά ευρήματα πριν τις 20 εβδομάδες κύησης: Σοβαρή υπέρταση (συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 160 mm Hg ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 110 mm Hg σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους) η οποία μπορεί να συνοδεύεται από πρωτεϊνουρία, θρομβοπενία, ηπατική δυσλειτουργία, νεφρική ανεπάρκεια, πνευμονικό οίδημα, εγκεφαλική και οπτική δυσλειτουργία [16,30]. Οι κεφαλαλγίες και η οπτική δυσλειτουργία θα πρέπει να θεωρούνται σοβαρά συμπτώματα γιατί μετά τη διάγνωσή τους πιθανώς θα ακολουθήσει εμφάνιση Εκλαμψίας. Άλγος στην κοιλιακή περιοχή (δεξιό άνω τεταρτημόριο) και αύξηση των τρανσαμινασών ακολουθούνται συνήθως από οίδημα, ηπατική ισχαιμία και ηπατοκυτταρική νέκρωση. Άλλο κλινικό σημείο επιδείνωσης του συνδρόμου αποτελεί η απότομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (θρομβοπενία) που οδηγεί σε αγγειακή αιμόλυση. Όσο

αυξάνει η ένταση των συμπτωμάτων τόσο πιο εντατική πρέπει να γίνεται η παρακολούθηση διότι τις περισσότερες φορές θα απαιτηθεί άμεσος τοκετός [16].

Η Προεκλαμψία με μέτρια ή ήπια συμπτωματολογία ορίζεται ως συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mm Hg ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mm Hg σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους και πρωτεϊνουρία (≥ 300 mg πρωτεΐνης σε δείγμα ούρων 24/ώρου) με πρώτη εμφάνιση μετά τις 20 εβδομάδες κύησης [16,30].

Η πρωτεϊνουρία αποτελεί συμπληρωματικό διαγνωστικό κριτήριο της Προεκλαμψίας αλλά δεν συνδέεται με τη βαρύτητα της επιπλοκής [16,31-34]. Η μοναδική περίπτωση κατά την οποία η πρωτεϊνουρία σχετίζεται με τη θεραπευτική αντιμετώπιση είναι όταν εμφανίζεται νεφρωσικό σύνδρομο. Σε αυτήν την περίπτωση όταν ο λόγος πρωτεΐνη : κρεατινίνη είναι μεγαλύτερος από 230, θεωρείται ότι η πρωτεϊνουρία είναι αποτέλεσμα νεφρωσικού συνδρόμου και κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση θρομβοπροφύλαξης [35].

Δεδομένου ότι η Προεκλαμψία είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας του πλακούντα, η παρατήρηση ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου, αποτελεί ένδειξη εντατικής παρακολούθησης, παρόλο που αποτελεί αντικείμενο διαμάχης το αν η υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου είναι απαραίτητη για τον ορισμό της Προεκλαμψίας χωρίς να υπάρχει κάποιο άλλο κλινικό εύρημα [15]. Παθολογοανατομικές μελέτες σε πλακούντες κύσεων με Προεκλαμψία έχουν δείξει ενδοθηλιακές βλάβες, διάχυτη αγγειακή απόφραξη, αθηρωμάτωση και ισχαιμία [36]. Αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων είναι η ανίχνευση παθολογικών κυμάτων Doppler των μητριάων αρτηριών, χρονικά πολύ πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων της επιπλοκής, λόγω της μειωμένης αιμάτωσης του πλακούντα [37]. Η δυσλειτουργία του πλακούντα οδηγεί σε μειωμένη οξυγόνωση του εμβρύου, αυξημένο κίνδυνο αποκόλλησης του πλακούντα και ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου [38]. Νεογνά εγκύων με Προεκλαμψία εμφανίζουν πρόωρο τοκετό, χαμηλό βάρος γέννησης και επιπλοκές προιμότητας όπως υποξία και νευρολογική βλάβη.

1.4 Διαφορική Διάγνωση - Διάκριση μεταξύ υπερτασικών επιπλοκών της κύησης

Η ISSHP αναγνωρίζοντας το πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης της Προεκλαμψίας από άλλες υπερτασικές διαταραχές της κύησης δημοσίευσε οδηγία για τη διάγνωση των υπερτασικών διαταραχών της κύησης η οποία περιλαμβάνει τα νεότερα δεδομένα που αφορούν τη διάγνωση, ταξινόμηση και αντιμετώπιση τους [15,16,39,40].

Εκλαμψία: Αποτελεί επικίνδυνη μορφή Προεκλαμψίας, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση γενικευμένων τονικοκλονικών σπασμών που δεν αποδίδονται σε υποκείμενο νευρολογικό νόσημα. Η Εκλαμψία μπορεί να εμφανιστεί πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά τον

τοκετό. Συχνά, πριν την εκδήλωση της, εμφανίζονται προειδοποιητικά συμπτώματα όπως ισχυρός πονοκέφαλος ή ξαφνική αύξηση των αντανακλαστικών. Μελέτες σε γυναίκες με Εκλαμψία έδειξαν ότι ποσοστό 10% εμφανίζουν σπασμούς ακόμη και 48 ώρες μετά τον τοκετό [41-43].

Σύνδρομο HELLP: Αποτελεί επίσης βαριάς μορφής έκφανση της Προεκλαμψίας, με παράλληλη παρουσία αιμόλυσης, αυξημένες συγκεντρώσεις ηπατικών ενζύμων και χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets - HELLP syndrome). Το σύνδρομο αυτό έχει οξεία έναρξη και άμεση επιδείνωση των συμπτωμάτων, συνήθως πριν την 28^η εβδομάδα κύησης [25,44]. Όταν εμφανίζονται συμπτώματα του συνδρόμου θα πρέπει άμεσα να γίνει διαφορική διάγνωση από παθολογικές καταστάσεις με παρόμοια συμπτωματολογία όπως η ιδιοπαθής θρομβοκυτταροπενική πορφύρα (thrombotic thrombocytopenic purpura) και το λιπώδες ήπαρ [45]. Η διαφορική διάγνωση του συνδρόμου HELLP από την ιδιοπαθή θρομβοκυτταροπενική πορφύρα στηρίζεται στη μέτρηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης του ορού (serum lactate dehydrogenase - LDH) επί απουσίας άλλων συμπτωμάτων Προεκλαμψίας [46]. Η συσχέτιση του συνδρόμου με την Προεκλαμψία παραμένει αμφιλεγόμενη λόγω της ιδιαίτερης κλινικοεργαστηριακής εμφάνισής του, δεδομένου ότι 15-20% των εγκύων δεν παρουσιάζουν υπέρταση ή/και πρωτεϊνουρία, με αποτέλεσμα να έχει πολλές φορές καταγραφεί ως μια ξεχωριστή νοσολογική οντότητα.

Χρόνια προ-υπάρχουσα υπέρταση: Ορίζεται η παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από συστολική αρτηριακή πίεση > 140 mm Hg με ή χωρίς αυξημένη διαστολική αρτηριακή πίεση (≥ 90 mm Hg) η οποία σε όλες τις περιπτώσεις προηγείται της κύησης ή αναγνωρίζεται σε δύο διαφορετικές μετρήσεις πριν την 20^η εβδομάδα ή επιμένει για περισσότερες από 12 εβδομάδες κατά την περίοδο της λοχείας. Η χρόνια υπέρταση μπορεί να είναι ιδιοπαθής ή δευτεροπαθής και να οφείλεται σε μια σειρά άλλων νοσολογικών καταστάσεων. Το βασικό πρόβλημα σε αυτήν την περίπτωση είναι ότι πολλές γυναίκες δεν γνωρίζουν την τιμή της αρτηριακής πίεσης τους πριν την εγκυμοσύνη με αποτέλεσμα πρακτικά η διάγνωση να στηρίζεται μόνο σε μετρήσεις που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η χρόνια υπέρταση οφείλεται σε ιδιοπαθή υπέρταση, οικογενειακό ιστορικό και αυξημένο BMI. Σπάνιες περιπτώσεις που οδηγούν σε χρόνια υπέρταση έχουν χαρακτηριστεί η πρωτογενής διαταραχή του νεφρικού παρεγχύματος και η ινομυώδης υπερπλασία των νεφρικών αρτηριών [15].

Η Προεκλαμψία μπορεί να εκδηλωθεί σε έδαφος χρόνιας προϋπάρχουσας υπέρτασης (Preeclampsia superimposed upon chronic/pre-existing hypertension) με πιθανότητα τέσσερις ή πέντε φορές μεγαλύτερη από την εμφάνιση της σε μη υπερτασικές γυναίκες [47]. Η πρόγνωση για αυτήν την περίπτωση είναι δυσμενέστερη σε σχέση με τις κύσεις που αναπτύσσουν Προεκλαμψία χωρίς προϋπάρχουσα υπέρταση. Χαρακτηρίζεται από την

εμφάνιση πρωτεϊνουρίας ή/και δυσλειτουργίας/ βλάβης σε διάφορα όργανα μετά την 20^η εβδομάδα κύησης σε εγκύους με χρόνια προϋπάρχουσα υπέρταση. Η διάγνωση θα τεθεί και σε εγκύους με χρόνια προϋπάρχουσα υπέρταση που παρουσιάζουν πρωτεϊνουρία πριν την κύηση ή νωρίς κατά τη διάρκεια της κύησης και η υπέρταση επιδεινώνεται ή δεν ανταποκρίνεται στη θεραπευτική αγωγή στο δεύτερο ήμισυ της κύησης ή εμφανίζονται συμπτώματα και σημεία σοβαρής Προεκλαμψίας από το ήπαρ, τους νεφρούς, αιματολογικές διαταραχές και νευρολογικά προβλήματα. Η διάγνωση περιπλέκεται περισσότερο όταν υπάρχει νεφρική νόσος διότι οι γυναίκες αυτές παρουσιάζουν ανομοιόμορφο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration rate). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να αποκλειστεί η παρουσία συμπτωμάτων από άλλα όργανα. Επιπλέον, εμφανίζεται και σοβαρή καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου [16].

Υπέρταση κύησης (Gestational hypertension): Αποτελεί παθολογική κατάσταση στην οποία εμφανίζεται υπέρταση χωρίς πρωτεϊνουρία ή άλλα συμπτώματα και ενδείξεις Προεκλαμψίας μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης ή συχνότερα λίγες εβδομάδες πριν τον τοκετό. Σε αυτήν την περίπτωση, η έγκυος είχε πριν την κύηση φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης ενώ οι τιμές της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης είναι $\geq 140\text{mm Hg}$ και $\geq 90\text{mm Hg}$, αντίστοιχα, σε δυο διαφορετικές μετρήσεις με μεσοδιάστημα μεγαλύτερο από 6 ώρες. Ποσοστό 10 - 25% των περιπτώσεων που αρχικά χαρακτηρίζονται ως «υπέρταση κύησης» τελικά θα εμφανίσουν στην πορεία της κύησης ή της λοχείας συμπτώματα και σημεία Προεκλαμψίας με σοβαρή συμπτωματολογία, ιδιαίτερα αν αυτή εμφανιστεί πριν την 32^η εβδομάδα της κύησης [48]. Η κύρια αιτιολογία της υπέρτασης κύησης δεν είναι σαφής, καθώς πολλές γυναίκες εμφανίζουν Προεκλαμψία πριν την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας ή δυσλειτουργίας κάποιου άλλου οργάνου. Η νόσος υποχωρεί συνήθως μέχρι την 12^η εβδομάδα της λοχείας. Αν αυτό δε συμβεί η διάγνωση πρέπει να αναθεωρηθεί καθώς μάλλον πρόκειται για χρόνια προϋπάρχουσα υπέρταση που καλύπτεται από την ελάττωση της αρτηριακής πίεσης που φυσιολογικά παρατηρείται στην αρχή της εγκυμοσύνης. Σύμφωνα με τη Διεθνή βιβλιογραφία, σε γυναίκες με υπέρταση κύησης θα πρέπει να παρέχεται αυξημένη παρακολούθηση ακόμη και αν η αύξηση της αρτηριακής πίεσης είναι ήπια. Στις γυναίκες αυτές έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη μελλοντικά χρόνιας υπέρτασης, για το λόγο αυτό προτείνεται συχνή παρακολούθηση της αρτηριακής πίεσης [49].

Υπέρταση μετά τον τοκετό: Εκδηλώνεται κατά την περίοδο της λοχείας με ισχυρούς πονοκεφάλους, διαταραχές στην όραση και ισχυρό πόνο στο επιγάστριο. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι γυναίκες αυτές έχουν φυσιολογική αρτηριακή πίεση κατά τη διάρκεια της κύησης και εμφανίζουν υπέρταση η οποία είχε διάρκεια από δυο εβδομάδες έως και έξι μήνες μετά τον τοκετό. Η αρτηριακή πίεση πολλές φορές αναφέρεται ότι επανέρχεται στο

φυσιολογικό επίπεδο περίπου ένα έτος μετά τον τοκετό. Δεν είναι γνωστή η αιτιοπαθογένεια της επιπλοκής αποτελεί όμως ένδειξη μελλοντικής ανάπτυξης χρόνιας υπέρτασης.

1.5 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ανάπτυξης της επιπλοκής

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, είναι κοινά αποδεκτό ότι ο πλακούντας έχει κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη της επιπλοκής.

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι ο παθογενετικός μηχανισμός της Προεκλαμψίας αναπτύσσεται πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, συνήθως πριν την 20^η εβδομάδα της κύησης και περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο, χαρακτηρίζεται από αδυναμία μετανάστευσης και διείσδυσης των τροφοβλαστικών κυττάρων στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας που οδηγεί σε ατελή διείσδυση των τροφοβλαστικών λαχνών στο τοίχωμα των ελικοειδών αρτηριών της μήτρας. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων, οξειδωτικό stress και ισχαιμία. Επιπλέον, παρατηρείται μειωμένη μητρο-πλακουντιακή διήθηση (uteroplacental perfusion pressure - RUPP), μείωση ανταλλαγής ύλης και μεταφοράς θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο.

Το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης της Προεκλαμψίας χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία του ισχαιμικού πλακούντα και απελευθέρωση πλακουντιακών σωματιδίων λόγω απόπτωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία της μητέρας, ανισορροπία των επιπέδων έκφρασης των αγγειογενετικών / αντιαγγειογενετικών παραγόντων και οξειδωτικό stress τα οποία οδηγούν σε συστηματική βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων (Εικόνα 1). Η δυσλειτουργία αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση με συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού, αύξηση των επιπέδων θρομβοξάνης και δυσλιπιδαιμία [50,51]. Η γενικευμένη αιματολογική δυσλειτουργία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπέρτασης και γενικευμένου οιδήματος. Η πρωτεϊνουρία οφείλεται στη διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των σπειραμάτων των νεφρών λόγω σωληναριακής ισχαιμικής δυσλειτουργίας [52]. Η γενικευμένη δυσλειτουργία οδηγεί στην πολυσυστηματική ισχαιμία και αιμορραγία σε όργανα όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος [53]. Πρέπει να τονιστεί ότι ο βαθμός δυσλειτουργίας των οργάνων συνδέεται άμεσα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της επιπλοκής.

Άλλοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας, εμπλέκουν:

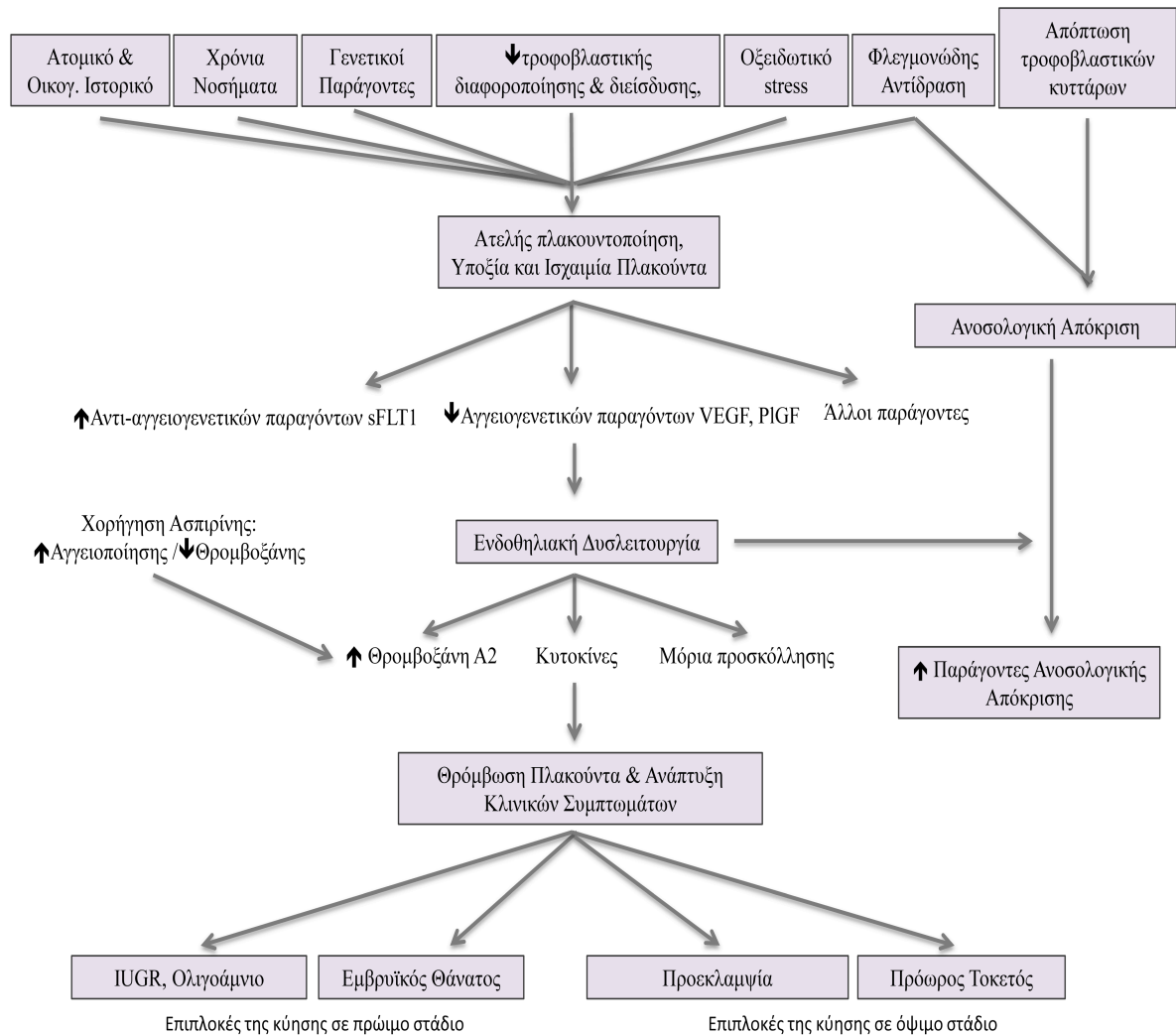
A. Ανοσολογικούς παράγοντες όπως αλληλεπιδράσεις μητρικών και εμβρυϊκών HLA (Human Leukocyte Antigen) αντιγόνων πατρικής προέλευσης,

Β. Μη γενετικούς παράγοντες (ισχαιμία του πλακούντα, stress της μητέρας, προϋπάρχουσα υπέρταση),

Γ. Γενετικούς παράγοντες (πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις γονιδίων, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και επιγενετικοί μηχανισμοί). Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι, γονίδια της μητέρας καθορίζουν το βαθμό ευαισθησίας και συνεισφέρουν περισσότερο από τα γονίδια του εμβρύου, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι και γονίδια του πατέρα συνδέονται με την εμφάνιση της Προεκλαμψίας.

Ο χρόνος εμφάνισης των συμπτωμάτων της Προεκλαμψίας συσχετίζεται άμεσα με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της επιπλοκής [38]. Στην Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης (<34 εβδομάδες κύησης), παρατηρείται ατελής αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών, δυσλειτουργία του πλακούντα και ελαττωμένη αιμάτωση. Αυτός είναι και ο λόγος που η Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης τις περισσότερες φορές συνοδεύεται και από υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου [54]. Αντίθετα, στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης (>34 εβδομάδες κύησης), δεν παρατηρείται εκτεταμένη πλακουντιακή δυσλειτουργία και οι σπειροειδείς αρτηρίες διατηρούν τη φυσιολογική διάμετρο τους, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη του εμβρύου να μην επηρεάζεται. Στην περίπτωση αυτή η ανάπτυξη των συμπτωμάτων είναι αποτέλεσμα είτε αγγειακής δυσλειτουργίας στη συστηματική κυκλοφορία της μητέρας σε συνδυασμό με μικροαγγειακή νόσο (χρόνια υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης), είτε γενετικής προδιάθεσης της μητέρας [55].

Λόγω της πολυπλοκότητας της επιπλοκής, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στη διευκρίνιση των παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας στα αρχικά στάδια της κύησης με σκοπό την ταυτοποίηση βιολογικών δεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και διαχείριση της επιπλοκής.



Εικόνα 1: Μηχανισμός ανάπτυξης της Προεκλαμψίας. Η ατελής πλακουντοποίηση, γενετικοί παράγοντες, ατομικό & οικογενειακό ιστορικό οδηγούν στη διαταραχή της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων, φλεγμονή, οξειδωτικό stress και ισχαιμία. Η γενικευμένη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων, η θρόμβωση του πλακούντα και η ανοσολογική απόκριση της μητέρας οδηγούν στην ανάπτυξη των κλινικών συμπτωμάτων της επιπλοκής.

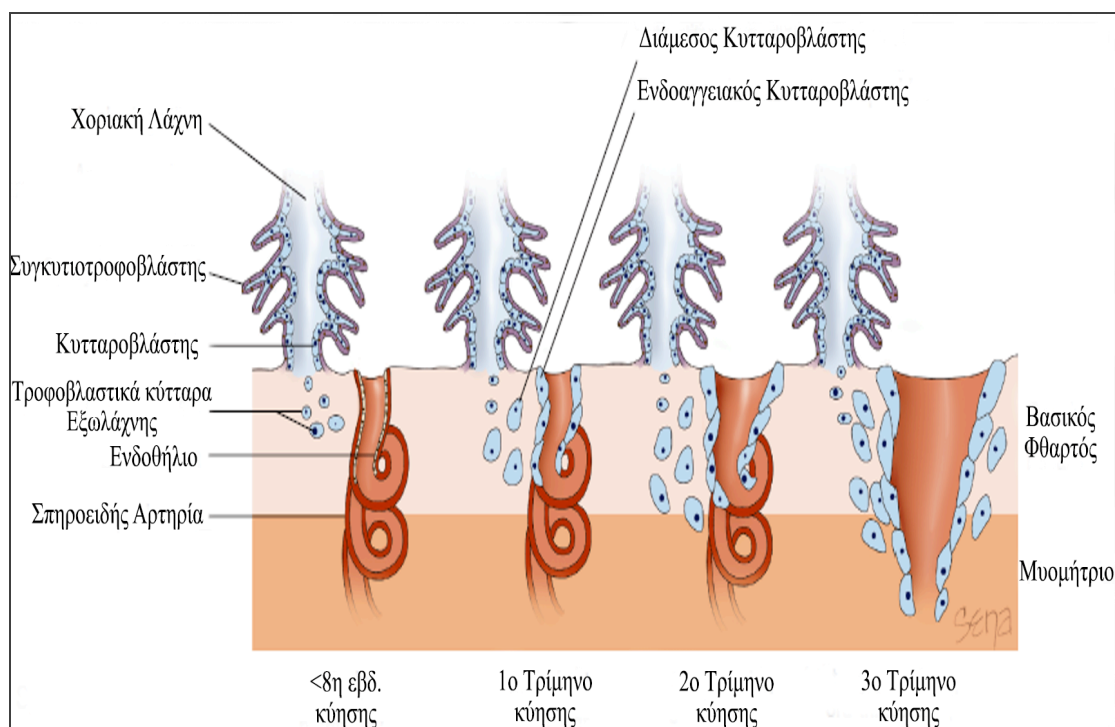
1.5.1 Ανάπτυξη του πλακούντα σε φυσιολογική κύηση

Η πλακουντοποίηση περιλαμβάνει δυο στάδια, το στάδιο της αγγειοποίησης με τη δημιουργία αγγειακού δικτύου εμβρυοπλακουντιακής επικοινωνίας και το στάδιο της διείσδυσης των σπειροειδών αρτηριών από κυτταροβλάστες ή ενδοαγγειακές τροφοβλάστες.

Τα τροφολαστικά κύτταρα (extravillous trophoblastic cells - EVT) μεταναστεύουν στο μωμήτριο και επάγουν την αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών. Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης χαρακτηρίζεται από σταδιακή αντικατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα επιθηλιακά κύτταρα του πλακούντα και τους κυτταροβλάστες. Το αποτέλεσμα είναι η απώλεια των λείων μυϊκών ινών και του ελαστικού υμένα λόγω της αποσύνθεσης των

ελαστικών ινών και της αλλαγής στο στρώμα των μυϊκών κυττάρων [56]. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν πολλοί παράγοντες όπως κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες [57].

Οι πολυπύρηντοι συγκυτιοτροφοβλάστες περιβάλλουν τις χοριακές λάχνες και δημιουργούν «φραγμό» μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Οι κυτταροβλάστες είναι σε άμεση επαφή με τη μητρική κυκλοφορία. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ψευδοαγγειογένεση ή αγγειακός μιμητισμός [58]. Το αγγειακό δίκτυο μετατρέπεται σε αγγεία μεγάλου διαμετρήματος, μικρής αντίστασης και υψηλής ροής που εξασφαλίζουν τη μεταφορά επαρκούς ποσότητας αίματος στη μητροπλακουντιακή μονάδα [56,59]. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση του όγκου αίματος στο κυκλοφορικό σύστημα της μητέρας η οποία φυσιολογικά αντισταθμίζεται με γενικευμένη αγγειοδιαστολή. Η ανωτέρω διαδικασία ολοκληρώνεται περί την 12^η εβδομάδα κύησης (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Διαμόρφωση του αγγειακού συστήματος του πλακούντα. Το αγγειακό δίκτυο μετατρέπεται σε αγγεία μεγάλου διαμετρήματος, μικρής αντίστασης και υψηλής ροής που εξασφαλίζουν επαρκή αιμάτωση της μητροπλακουντιακής μονάδας (*William Obstetrics, CH.5 Implantation and Placental Development*).

Τα τροφωβλαστικά και συγκυτιοτροφωβλαστικά κύτταρα αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας ως «ξένα» με αποτέλεσμα την έναρξη περιορισμένης φλεγμονώδους αντίδρασης [60]. Η διαδικασία ερμηνεύεται από τη θεωρία φλεγμονώδους απόκρισης δυο σταδίων σύμφωνα με την οποία στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, παρατηρείται γενικευμένη φλεγμονώδης αντίδραση που αποδίδεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού της

μητέρας (NK cells) τα οποία επιτίθενται στα τροφοβλαστικά κύτταρα που ξεκινούν να διεισδύουν στις σπειροειδείς αρτηρίες. Κατά το δεύτερο στάδιο, η φλεγμονώδης αντίδραση της μητέρας επιδεινώνεται μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης καθώς ενεργοποιείται από συσσωματώματα αποπτωτικών συγκυτιοτροφοβλαστών (syncytiotrophoblast microparticles - STMBs) τα οποία απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία της μητέρας [61].

1.5.2 Ανεπάρκεια του πλακούντα και ελλιπής αγγειογένεση

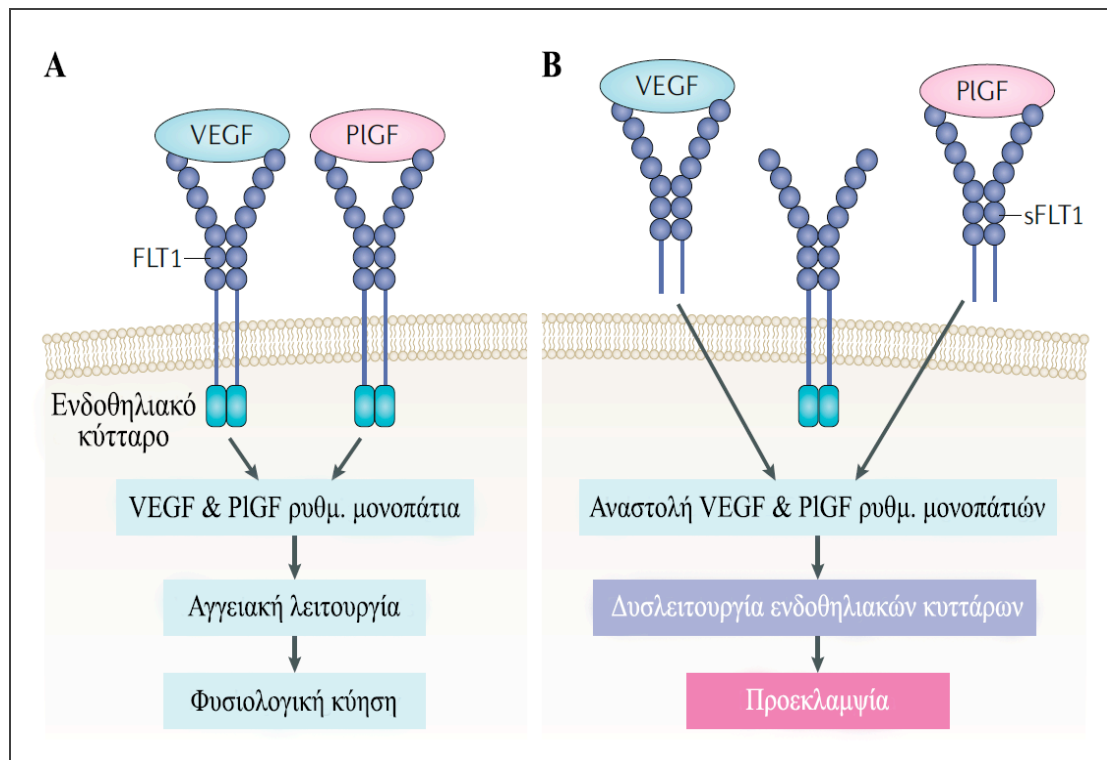
Σε γυναίκες που αναπτύσσουν Προεκλαμψία, ειδικότερα τον τύπο πρώιμης έναρξης, αρχικά παρατηρείται ατελής διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας με αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταφορά αίματος στην μητροπλακουντιακή μονάδα, υποξία και οξειδωτικό stress [62]. Η σχέση μεταξύ του υποξικού πλακούντα και της εμφάνισης συμπτωμάτων στη μητέρα περιλαμβάνει αλληλουχία μηχανισμών όπως η ανισορροπία προ-αγγειογενετικών/ αγγειογενετικών παραγόντων, ενδοθηλιακή βλάβη και ανοσολογική δυσλειτουργία [63]. Ο ακριβής μηχανισμός της ατελούς τροφοβλαστικής διείσδυσης δεν είναι σαφής.

Βασικοί αγγειογενετικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (Vascular endothelial Growth Factor - VEGF) και ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (Placental Growth Factor - PlGF). Ο παράγοντας VEGF εκφράζεται συνήθως το 1^ο και το 2^ο τρίμηνο της κύησης και είναι απαραίτητος για την ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων της μητέρας. Αντιθέτως, η συγκέντρωση του PlGF αυξάνεται μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης και επανέρχεται στο φυσιολογικό επίπεδο μετά την 30^η εβδομάδα [64]. Ο παράγοντας αυτός επιδρά στα τροφοβλαστικά κύτταρα που εκφράζουν τον παράγοντα Fms like tyrosine kinase 1 (Flt1) και συμβάλλει στο σχηματισμό και την επιμήκυνση των τριχοειδών αγγείων το 3^ο τρίμηνο της κύησης. Ο PlGF εκτός από την αγγειογενετική δράση έχει και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες εφόσον αυξάνει τη διάμετρο των αγγείων κατά τη φυσιολογική εξέλιξη της εγκυμοσύνης [65].

Μελέτες υποστηρίζουν ότι ο αυξητικός παράγοντας Transforming Growth Factor - β (TGF- β) εμπλέκεται στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας μειώνοντας τη μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων και τη διεισδυτική τους ικανότητα [66]. Η σηματοδοτική οδός του παράγοντα Notch2 έχει επίσης, σημαντικό ρόλο στη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων και την αναδιαμόρφωση των αγγείων της μητέρας. Έλλειψη του Notch2 έχει συσχετιστεί με μείωση της διαμέτρου των αγγείων με αποτέλεσμα τη μειωμένη αιμάτωση του πλακούντα [67]. Επισημαίνεται ότι στην Προεκλαμψία οι περιαγγειακοί και ενδοαγγειακοί συγκυτιοτροφοβλάστες δεν εκφράζουν τον παράγοντα Jasmonate Response locus 1 (JAR1) ο οποίος είναι υποδοχέας του Notch2 με αποτέλεσμα την ατελή αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών που χαρακτηρίζει την εμφάνιση της επιπλοκής.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης έχουν και τα μόρια Flt-1 και sFlt-1, υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων VEGF και PlGF, αντίστοιχα. Ο υποδοχέας Flt-1 είναι πρωτεΐνη της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων ενώ ο sFlt-1, γνωστός και ως VEGFR-1, αποτελεί την ελεύθερη μορφή της πρωτεΐνης [68]. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα [69].

Στο περιφερικό αίμα εγκύων με Προεκλαμψία, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα sFLT1 και μειωμένη έκφραση των VEGF και PlGF, σε σχέση με εγκύους χωρίς την επιπλοκή [70,71]. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται ο μηχανισμός λειτουργίας των αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων σε φυσιολογικές κύσεις και κύσεις με Προεκλαμψία.



Εικόνα 3: Ο ρόλος των αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων σε (A) φυσιολογικές κύσεις και (B) κύσεις με Προεκλαμψία [72].

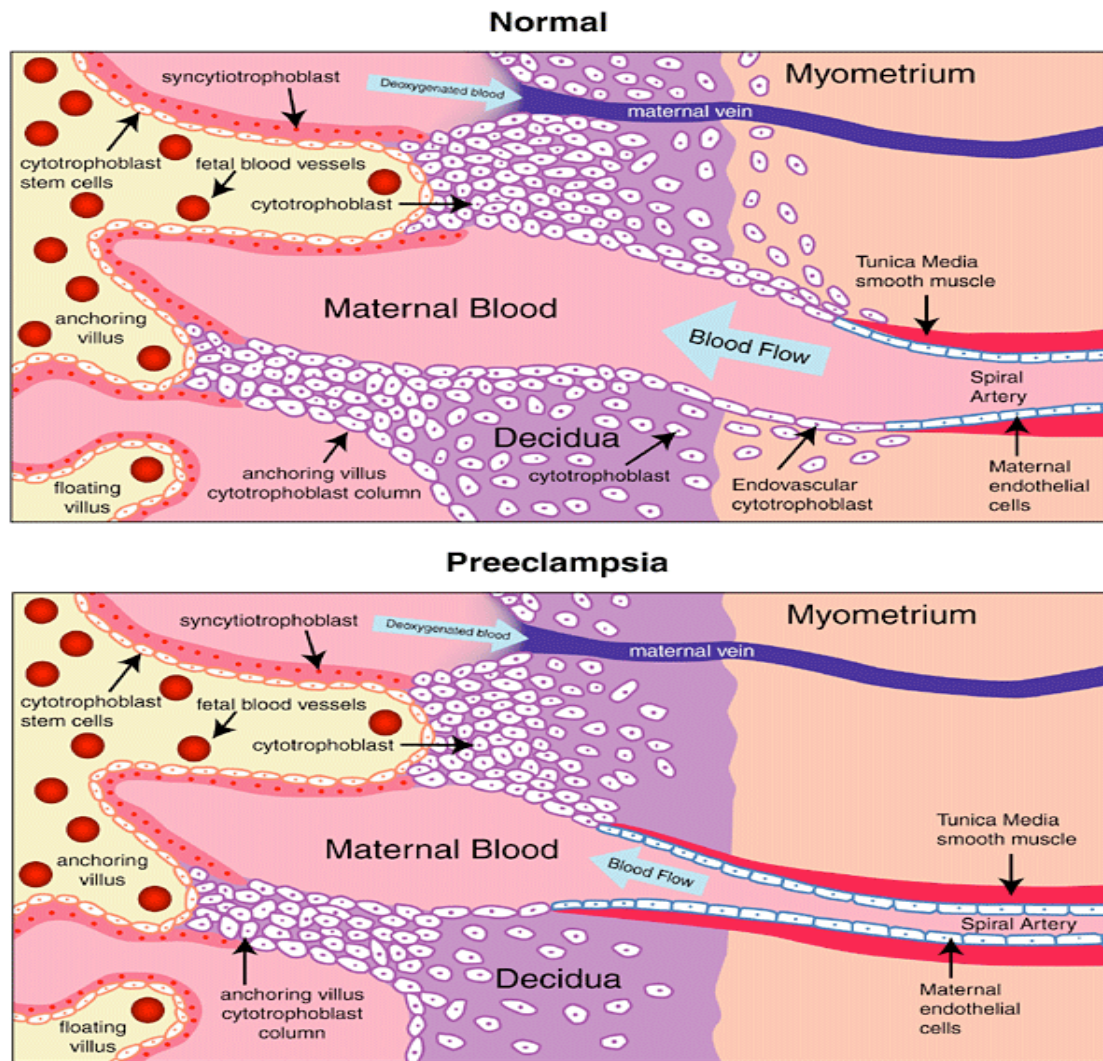
Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση του πλακούντα έχουν η ενδογλίνη (Eng) και η διαλυτή της μορφή (soluble Endoglin - sEng). Οι πρωτεΐνες Eng και sEng παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση στον πλακούντα και το περιφερικό αίμα, αντίστοιχα, εγκύων με Προεκλαμψία σε σχέση με τις εγκύους χωρίς την επιπλοκή. Η sEng είναι αντι-αγγειογενετικός παράγοντας που εκφράζεται από τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα και προσδένεται στους αυξητικούς παράγοντες TGF-β1 και TGF-β3 [73]. Η ποσοτικοποίηση της sEng στο περιφερικό αίμα της μητέρας αντανακλά την αύξηση της συγκέντρωσης των

αποπτωτικών τροφοβλαστικών κυττάρων STMBs [74]. Οι διαφορές στην έκφραση και στην ποσότητα των ανωτέρω μορίων φαίνεται να προκαλούνται από τη γενικότερη υποξία του πλακούντα και υποδηλώνουν τη γενικευμένη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων στη μητέρα. Η δυσλειτουργία αυτή συμβάλλει στις παθοφυσιολογικές διαταραχές που παρατηρούνται κατά τα αρχικά στάδια της Προεκλαμψίας, όπως η ενεργοποίηση πηκτικού μηχανισμού, υπέρταση και νεφρική ενδοθηλίωση.

Στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης της επιπλοκής, εφόσον τα τροφοβλαστικά κύτταρα δεν έχουν αποκτήσει επαρκή διεισδυτική ικανότητα, οι σπειροειδείς αρτηρίες παραμένουν αγγεία μικρής διαμέτρου και αυξημένης αντίστασης (Εικόνα 4) [75]. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε ισχαιμία και υποξία του πλακούντα και περαιτέρω ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας των τροφοβλαστικών και συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης της απόπτωσης δεν είναι σαφής, προτείνεται ότι είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού γενετικών παραγόντων με την ανοσολογική απάντηση της μητέρας στα πατρικής προέλευσης αντιγόνα του εμβρύου κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων τροφοβλαστικών κυττάρων [76].

Μια ακόμη σηματοδοτική οδός η οποία συμμετέχει στον παθογενετικό μηχανισμό της Προεκλαμψίας είναι το σύστημα Ρενίνης - Αγγειοτενσίνης - Αλδοστερόνης (RAAS). Σε φυσιολογικές κήσεις, στο πρώιμο στάδιο της αγγειογένεσης, παρατηρείται μεγάλος όγκος αίματος στη μητρική κυκλοφορία, μείωση της αντίστασης των αγγείων και της αρτηριακής πίεσης καθώς και ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης - αγγειοτενσίνης. Αντιθέτως, στην Προεκλαμψία, έχει διαπιστωθεί μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών της σηματοδοτικής οδού RAAS [77]. Μελέτες συνδέουν την αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (AT-1AA) με την ανάπτυξη υπέρτασης, πρωτεϊνουρίας και νεφρικής βλάβης σε κήσεις με Προεκλαμψία [78]. Οι Χία και συν., διαπίστωσαν ότι απενεργοποίηση του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (AT-1) προκαλεί μείωση των επιπέδων sFLT1 και IL-6 και αύξηση της βαρύτητας της επιπλοκής [79].

Η διαταραχή της ισορροπίας των αγγειογενετικών/αντι-αγγειογενετικών παραγόντων πιθανολογείται ως η κύρια αιτία της γενικευμένης δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων στη μητέρα και οδηγεί σε υπέρταση, νεφρική ενδοθηλίωση και ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός και οι επιπτώσεις στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων της επιπλοκής παραμένει αδιευκρίνιστος.



Εικόνα 4: Σπειροειδείς αρτηρίες της μητέρας στη φυσιολογική κύηση και την Προεκλαμψία. Οι σπειροειδείς αρτηρίες διατηρούν φυσιολογική μορφή ως αγγεία μικρής διαμέτρου και αυξημένης αντίστασης που τα περιβάλλουν λεία μυϊκά κύτταρα και μικροϊνίδια [80].

1.5.3 Υποξικό περιβάλλον και Οξειδωτικό stress στην Προεκλαμψία

Στο πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης, έως την ανάπτυξη και διεύδυση της εξωλάχνικης τροφοβλάστης (EVT) στις σπειροειδείς αρτηρίες και την αύξηση της αγγειογένεσης, ο πλακούντας και το έμβryo αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας [29,81]. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται αυξημένη έκφραση των παραγόντων HIF-1α (Hypoxia inducible factor-1) και TGF-β στον πλακούντα. Μετά την 12^η εβδομάδα κύησης, ακολουθεί ευρεία αγγειογένεση του πλακούντα και αύξηση των επιπέδων οξυγόνου.

Στην Προεκλαμψία ο ανωτέρω μηχανισμός παραμένει μετά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η χαμηλή ποσότητα οξυγόνου και το οξειδωτικό stress προκαλούν περαιτέρω αύξηση της έκφρασης των HIF-1α και TGF-β3 στον πλακούντα με αποτέλεσμα απελευθέρωση των παραγόντων αυτών στο περιφερικό αίμα της εγκύου [29].

1.5.4 Φλεγμονώδης αντίδραση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων

Η ανοσολογική απόκριση της μητέρας στα πατρικής προέλευσης αντιγόνα του εμβρύου μέσω ενεργοποίησης της ειδικής και της μη ειδικής (επίκτητης) ανοσολογικής αντίδρασης καθώς και η διαταραχή της ισορροπίας προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων έχουν συσχετιστεί με το πρώτο στάδιο εμφάνισης της Προεκλαμψίας [82].

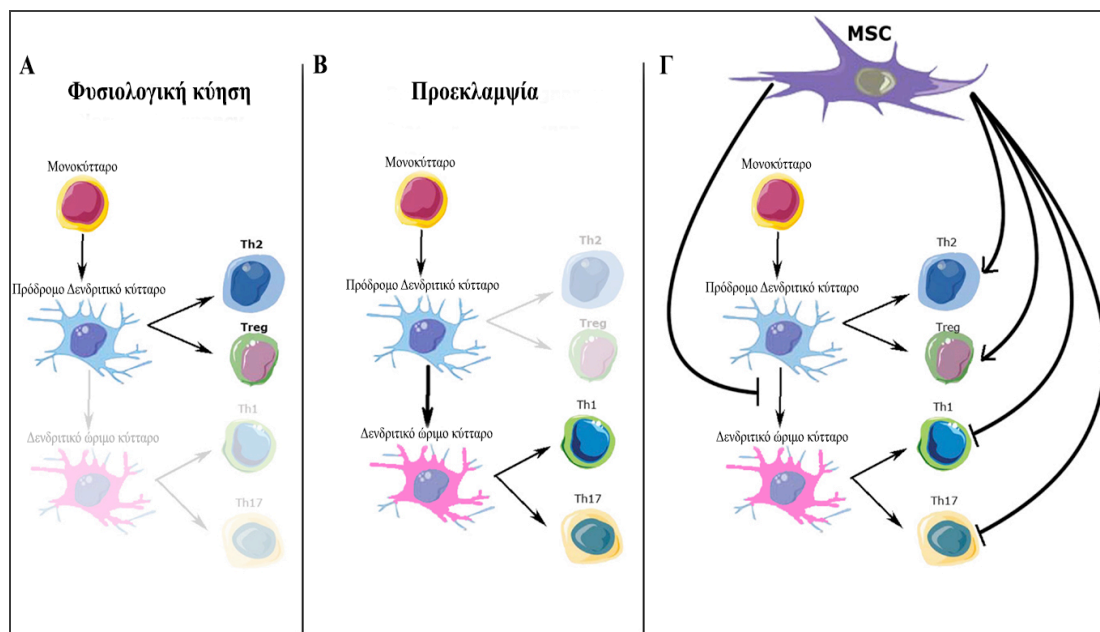
Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης ο αριθμός των T ρυθμιστικών $CD4^+$ (T regulator cells - Treg) και των T βοηθητικών (T helper - Th) λεμφοκυττάρων είναι αυξημένος στο φθαρτό και το περιφερικό αίμα της εγκύου. Τα κύτταρα αυτά ρυθμίζουν την ανοσοανοχή της μητέρας στο έμβρυο. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells - MSC) συμβάλλουν στην ισορροπία έκκρισης κυτοκινών μέσω της ρύθμισης της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων σε δένδριτικά ώριμα κύτταρα (tolerogenic dendritic cells - tDC) και στην ανοσοανοχή της μητέρας στο έμβρυο [83]. Τα MSCs αναστέλλουν την ανάπτυξη των Th17/Th1 κυττάρων και προωθούν την ανάπτυξη των Th2/Treg κυττάρων.

Τα Th2/Treg κύτταρα εκκρίνουν τις κυτοκίνες TGF- β και IL-10, με αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροτοξικής δράσης των Natural Killer κυττάρων (NK cells) στα αντιγόνα του εμβρύου. Αντιθέτως, τα Th17 και Th1 βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό σε φυσιολογικές κηύσεις διότι εκκρίνουν κυτοκίνες οι οποίες σχετίζονται με έντονη ανοσολογική αντίδραση, όπως οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-17 και IL-22 οι οποίες ενεργοποιούν την έκκριση των βασικών κυτοκινών της φλεγμονής συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ και TNF- α [84].

Στην Προεκλαμψία έχει παρατηρηθεί τροποποίηση του ανοσολογικού πρότυπου από Th2/Treg σε ενεργοποίηση των Th1/Th17 κυττάρων. Η υπερίσχυση της κυτταρικής ανοσίας (Th1 ανοσία) συνδέεται με έντονη φλεγμονώδη αντίδραση, παθολογική πλακουντοποίηση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων (Εικόνα 5) [85].

Η υπεροχή της Th1/Th17 ανοσίας έχει ως αποτέλεσμα αφενός μεν την παρουσία μεγάλου αριθμού προ-φλεγμονώδων κυτοκινών, δένδριτικών κυττάρων (dendritic cells-DCs) και μακροφάγων στο περιβάλλον της μήτρας, αφετέρου δε την απουσία αντι-φλεγμονωδών και ρυθμιστικών παραγόντων του ανοσοποιητικού συστήματος [86]. Η αλλαγή του ανοσολογικού προτύπου ενεργοποιεί περαιτέρω τα κύτταρα της φλεγμονής (μονοκύτταρα, NK κύτταρα και DCs). Τα μονοκύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κυτοκινών (IL-1 β , IL6, IL-8) οι οποίες επιτείνουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και προκαλούν γενικευμένη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων στη μητέρα. Η απορρύθμιση αυτή οδηγεί στην εμφάνιση των συμπτωμάτων της Προεκλαμψίας όπως υπέρταση, αιματολογικές διαταραχές, ηπατική δυσλειτουργία και γενικευμένο οίδημα [82]. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την συγκέντρωση

των κυτοκινών στη μητρική κυκλοφορία, σε εγκύους με Προεκλαμψία και σε αυτές χωρίς την επιπλοκή [87].



Εικόνα 5: Ανοσολογική αντίδραση της εγκύου. (Α) Στη φυσιολογική κύηση επικρατούν τα Th2/Treg Λεμφοκύτταρα. (Β) Στην Προεκλαμψία επικρατούν τα Th1/Th17 κύτταρα με αποτέλεσμα τη γενικευμένη φλεγμονώδη αντίδραση και (Γ) Η παρουσία των MSC, υποβοηθά το φαινότυπο Th2/Treg και καταστέλλει την ανάπτυξη των Th1/Th17 [85].

1.5.5 Γενετικοί παράγοντες και Προεκλαμψία

Η συμβολή γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας είναι κοινώς αποδεκτή και βασίζεται στην παρατήρηση ότι γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό Προεκλαμψίας έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής [88].

Παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια στα αποτελέσματα μελετών αναφορικά με τη συνεισφορά γονιδίων στην ανάπτυξη της επιπλοκής. Η πιθανότερη εκδοχή είναι ότι η Προεκλαμψία είναι αποτέλεσμα σύνθετης αλληλεπίδρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την ισοροπία μεταξύ αγγειογενικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, τη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας, τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, το μηχανισμό πήξης και την ανοσοανοχή [89].

Γονίδια που έχουν μελετηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη της Προεκλαμψίας σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF, MMP1), τη θρομβοφιλία (παράγοντας Von Leiden, γλυκοπρωτεΐνη αιμοπεταλίων, Β-ινωδογόνο, γλυκοπρωτεΐνη αιμοπεταλίων III, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμιδίου, προθρομβίνη), τους αιμοδυναμικούς παράγοντες (αγγειοτενσινογόνο, ρενίνη, υποδοχέας AT1, υποδοχέας AT-2, επιθηλιακοί διάλυοι νατρίου, μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης), τις κυτταροκίνες (παράγοντας νέκρωσης των όγκων - TNF, IGR-II, ιντερλευκίνη Ια, μέλος 6 της οικογένειας των υποδοχέων του TNF), το οξειδωτικό stress

(γλουταθειονίνη-s τρανσφεράση ρί, μυελουπεροξειδάση, κυτόχρωμα ΙΑΙ, απολιποπρωτεΐνη Ε), τους ενδοκρινολογικούς παράγοντες (υποδοχέας οιστρογόνων-α) και τη λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων (ενδοθηλιακή συνθετάση του οξειδίου του αζώτου και ενδοθηλίνη) [90].

1.6 Διαχείριση της Προεκλαμψίας - Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της Προεκλαμψίας είναι συμπτωματική και έχει σκοπό τον έλεγχο της υπέρτασης, την πρόληψη και καταστολή των σπασμών, την ανάταξη της οξεοβασικής ισορροπίας και την αποκατάσταση των αιματολογικών διαταραχών.

Η αντιϋπερτασική θεραπεία ξεκινάει όταν υπάρχει επίμονη διαστολική αρτηριακή πίεση της τάξης των 105-110 mm Hg ή υψηλότερη με σκοπό τον έλεγχο της υπέρτασης, της αιμάτωσης του πλακούντα και των υπόλοιπων οργάνων καθώς και τη μείωση της παρατεταμένης έκθεσης της εγκύου στη σοβαρή συστολική υπέρταση, η οποία προκαλεί την απώλεια της εγκεφαλικής αγγειακής αυτορρύθμισης [91].

Ως καταλληλότερες αντιϋπερτασικές θεραπείες θεωρούνται η μεθυλντόπα, η λαβεταλόλη, οι β-αναστολείς και η νιφεδιπίνη βραδείας αποδέσμευσης. Το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων - Γυναικολόγων (ACOG) χαρακτηρίζει τη μεθυλντόπα και τη λαβεταλόλη ως θεραπεία πρώτης γραμμής, ενώ δεν συνιστά τους β-αναστολείς και τους αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης [92]. Η χορήγηση μεθυλντόπα, ως αντιϋπερτασική αγωγή πρώτης γραμμής, δεν συνοδεύεται από επιβαρυντικές δράσεις στο έμβρυο, εντούτοις μπορεί να προκαλέσει κατάθλιψη, υπνηλία, ορθοστατική υπόταση, ηπατικές διαταραχές και αιμολυτική αναιμία στη μητέρα.

Σε κάποιες περιπτώσεις, εκτός από τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, απαραίτητη είναι η αύξηση του όγκου πλάσματος και η αντιθρομβωτική αγωγή. Η χορήγηση θειϊκού μαγνησίου προτείνεται για την πρόληψη εμφάνισης ή υποτροπής σπασμών και σε σπάνιες περιπτώσεις για την αντιμετώπιση τους.

Αναμφισβήτητα ο τερματισμός της κύησης είναι η μοναδική αιτιολογική θεραπεία της Προεκλαμψίας. Τοκετός δεν πρέπει να επιχειρείται πριν από την επαρκή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, της πηκτικότητας και των σπασμών. Σε κάθε περίπτωση γίνεται προσπάθεια παράτασης της κύησης, με σκοπό την πρόληψη των προβλημάτων προωρότητας για το νεογνό. Η συντηρητική αγωγή με σκοπό την παράταση της κύησης μόλις για πέντε ημέρες μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο νεογνικής αναπνευστικής δυσχέρειας [93].

Η απόφαση για τοκετό βασίζεται στην εξισορρόπηση ανάμεσα στους κινδύνους για την μητέρα και το έμβρυο από τη συνέχιση της εγκυμοσύνης και τους κινδύνους για το νεογνό

λόγω πρωιμότητας. Το Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2006) προτείνει άμεσο τοκετό στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Αδυναμία ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης,
2. Ταχεία επιδείνωση των βιοχημικών και αιματολογικών παραμέτρων της μητέρας,
3. Επίμονη κεφαλαλγία ή επιγαστραλγία,
4. Υπολειπόμενη ενδομήτρια εμβρυϊκή ανάπτυξη, εμβρυϊκή δυσχέρεια, αντίστροφη διαστολική ροή της ομφαλικής αρτηρίας,
5. Εκλαμψία, σύνδρομο HELLP, εγκεφαλική αιμορραγία, πνευμονικό οίδημα, αποκόλληση του πλακούντα, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, νεφρική ανεπάρκεια και ρήξη του ηπατικού παρεγχύματος.

1.7 Πρόληψη της Προεκλαμψίας

Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη των δυνατοτήτων πρόληψης εμφάνισης της Προεκλαμψίας με σκοπό την εξάλειψη του κινδύνου ανάπτυξης της επιπλοκής.

Για την πρόληψη της Προεκλαμψίας έχουν προταθεί διατροφικές και φαρμακολογικές μέθοδοι. Οι διαιτητικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την κατανάλωση τροφών με μικρή περιεκτικότητα σε αλάτι, τη χρησιμοποίηση συμπληρωμάτων ασβεστίου, καρδιοπροστατευτικών λιπαρών οξέων καθώς και αντιοξειδωτικών παραγόντων (βιταμίνες C και E), ωστόσο δεν φαίνεται να είναι κλινικά αποτελεσματικές [94-96].

Η χορήγηση βιταμινών (βιταμίνη D, το ιχθυέλαιο, το φολικό οξύ) και η μείωση πρόσληψης νατρίου δεν έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στη μείωση του κινδύνου της ανάπτυξης της επιπλοκής [97]. Αντίθετα, μελέτη μετα-ανάλυσης των ευρημάτων 13 κλινικών δοκιμών και συνολικά 15.730 γυναικών έδειξε σημαντική μείωση του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας μετά από χορήγηση συμπληρώματος ασβεστίου, ειδικότερα σε εγκύους με χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου στη διατροφή [98].

Στις φαρμακευτικές μεθόδους περιλαμβάνονται η αντιϋπερτασική αγωγή και τα αντιπηκτικά σκευάσματα, όπως η ασπιρίνη και η ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους.

➤ Ασπιρίνη

Η χορήγηση ασπιρίνης για την πρόληψη εμφάνισης Προεκλαμψίας, βασίζεται στην παρατήρηση ότι, όταν χορηγείται σε χαμηλή δόση προκαλεί αναστολή της θρομβοξάνης A2 [99]. Σε πρόσφατη πολυκεντρική, διπλά τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, χορηγήθηκε υψηλή δόση ασπιρίνης (150 mg ημερησίως) ή σκευάσματος χωρίς κάποια δραστική ουσία (placebo) σε εγκύους υψηλού κινδύνου για πρώιμης έναρξης Προεκλαμψία. Η χορήγηση έγινε μεταξύ

της 11^{ης} και της 14^{ης} εβδομάδας της κύησης έως την 36^η εβδομάδα [100]. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν σημαντική μείωση της Προεκλαμψίας με πρώιμη έναρξη συμπτωμάτων στην ομάδα εγκύων που είχε χορηγηθεί ασπιρίνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (1.6% έναντι 4.3%, odds ratio 0,38; 95%CI, 0,20-0,74; $p=0.04$). Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε μείωση στο ποσοστό της όψιμης μορφής της επιπλοκής.

Μελέτη μετα-ανάλυσης 45 τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών, έδειξε ότι καθημερινή χορήγηση μικρής δόσης ασπιρίνης, πριν από την 16^η εβδομάδα της κύησης, σε εγκύους με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας, έχει προστατευτικό ρόλο και σχεδόν μηδενίζει τον κίνδυνο εμφάνισης της πρώιμης Προεκλαμψίας [101]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της Προεκλαμψίας με σοβαρή συμπτωματολογία (relative risk 0,47, 95% CI, 0,26-0,83) και μέτρια μείωση της Προεκλαμψίας με ήπια συμπτωματολογία (relative risk 0,81, 95%CI, 0,66-0,99) [101]. Αντίθετα, χορήγηση ασπιρίνης μετά τις 16 εβδομάδες κύησης δεν μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής σε εγκύους υψηλού κινδύνου [101,102].

Με βάση τα ευρήματα αυτά συνιστάται χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης, 81mg ημερησίως, σε εγκύους με οποιονδήποτε από τους κλινικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας (νεφρική νόσο, αυτοάνοση ασθένεια, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή 2 και χρόνια υπέρταση) με σκοπό την πρόληψη [101,102]. Η προληπτική αγωγή μπορεί να ξεκινήσει μεταξύ της 12^{ης} εβδομάδας της κύησης και της 28^{ης} εβδομάδας, με τα βέλτιστα αποτελέσματα να παρατηρούνται όταν η χορήγηση ξεκινήσει πριν την 16^η εβδομάδα της κύησης και συνεχιστεί έως τον τοκετό.

Στον πίνακα 2 παρατίθεται τα νεότερα δεδομένα του ACOG για τη χρήση της ασπιρίνης σε υψηλού κινδύνου κυήσεις για την ανάπτυξη της επιπλοκής [97].

➤ Ηπαρίνη

Τα δεδομένα όσον αφορά στη χρήση της ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH, low-molecular - weight heparin) για την πρόληψη της Προεκλαμψίας είναι αντικρουόμενα. Από τα ευρήματα μελετών Cochrane προκύπτει ότι η προφυλακτική χρήση ηπαρίνης έναντι καμίας παρέμβασης μειώνει την περιγεννητική θνησιμότητα (Relative Risk 0,40; 95% CI 0,20 - 0,78), τον πρόωρο τοκετό (<34 εβδ. κύησης) (Relative Risk 0,46; 95% CI 0,29 - 0,73) και τη γέννηση μικρών για την ηλικία κύησης νεογνών (Relative Risk 0,41; 95% CI 0,27 - 0,61) [103]. Όταν όμως αξιολογήθηκε η ασφάλεια χορήγησης LMWH, διαπιστώθηκε ότι ευθύνεται για την εμφάνιση σοβαρών αιμορραγικών επεισοδίων σε ποσοστό 7.7% [104]. Για το λόγο αυτό, η χορήγηση LMWH, προς το παρόν τουλάχιστον δεν θεωρείται θεραπεία επιλογής για την πρόληψη της Προεκλαμψίας ειδικά όταν το όφελός τους αντισταθμίζεται από τους κινδύνους που συνδέονται με την χρήση τους.

Πίνακας 2: Η χρήση της ασπιρίνης για την πρόληψη της Προεκλαμψίας με βάση παράγοντες του ατομικού ιστορικού

Κίνδυνος	Παράγοντες κινδύνου	Χορήγηση Ασπιρίνης
Υψηλός (~8%)	<ul style="list-style-type: none"> • Ιστορικό Προεκλαμψίας, Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης με βαριά συμπτωματολογία • Πολύδυμη κύηση • Χρόνια Υπέρταση • ΣΔ τύπου 1 ή 2 • Ηπατική δυσλειτουργία • Αυτοάνοσα νοσήματα 	Χαμηλή δόση
Μέτριος	<ul style="list-style-type: none"> • Παχυσαρκία • Ηλικία >35 έτη • Πρωτοτόκος • Οικογενειακό Ιστορικό • Κοινωνικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά • Ατομικό ιστορικό (προηγούμενη εγκυμοσύνη με έμβρυο χαμηλού βάρους γέννησης ή υπολειπόμενη ανάπτυξη) 	Μικρή δόση σε εγκύους με > ένα παράγοντες κινδύνου
Χαμηλός	<ul style="list-style-type: none"> • Προηγούμενη κύηση χωρίς επιπλοκές 	Δεν προτείνεται

1.8 Πρόβλεψη της Προεκλαμψίας - Μέθοδοι πληθυσμιακού ελέγχου

Η ερευνητική προσπάθεια για την ταυτοποίηση δεικτών πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της Προεκλαμψίας, πριν ακόμη εμφανιστούν τα συμπτώματα της επιπλοκής είναι εντατική και παγκόσμια. Η χρησιμότητα ενός προγνωστικού τεστ εξαρτάται από την ικανότητα να ανιχνεύει το συνολικό ποσοστό των γυναικών (πληθυσμιακός έλεγχος/ screening), στο πρώτο τρίμηνο της κύησης οι οποίες αργότερα (δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο) θα αναπτύξουν επιπλοκή.

Για την πρόβλεψη της επιπλοκής έχουν προταθεί διάφοροι αλγόριθμοι στους οποίους συνδυαστικά λαμβάνονται υπ' όψιν παράγοντες από το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό της εγκύου, υπερηχογραφικοί δείκτες, βιοφυσικοί δείκτες και βιοχημικοί δείκτες.

Σύμφωνα με το ACOG τα προγράμματα πρόβλεψης του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας έχουν χαμηλή θετική προγνωστική δυναμική (positive predictive value) και η χρήση τους πρέπει να περιορίζεται στην κατάταξη των κυήσεων υψηλού ή χαμηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της επιπλοκής [105].

1.8.1 Ατομικό και Οικογενειακό ιστορικό εγκύου

Η λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού της εγκύου (ατομικό και οικογενειακό) αδιαμφισβήτητα συμβάλλει στην κατάταξη των γυναικών για τον κίνδυνο ανάπτυξης της Προεκλαμψίας. Βασικά στοιχεία για τη μελέτη είναι η μέτρηση του BMI της μητέρας, η ηλικία της εγκύου, το ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό Προεκλαμψίας, αποβολή σε προηγούμενη κύηση, προϋπάρχουσα υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 1 ή 2) και χρόνια νοσήματα (αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, θρομβοφιλία, νεφρική νόσος, νόσοι του κολλαγόνου και αυτοάνοσα νοσήματα) της μητέρας.

Η πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας χρησιμοποιώντας μόνο τα κλινικά στοιχεία ως παράγοντες κινδύνου έχει μια μέτρια προβλεπτική δυνατότητα. Οι *Roop και συν.* πραγματοποίησαν μελέτη στην οποία συμμετείχαν 8.366 γυναίκες με μονήρεις κυήσεις, από τις οποίες 37 ανέπτυξαν πρώιμης έναρξης και 128 όψιμης έναρξης Προεκλαμψία. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι με τη χρήση ατομικών χαρακτηριστικών της εγκύου και στοιχείων του ατομικού ιστορικού μπορεί να προβλεφθεί ποσοστό 37% των εγκύων που θα αναπτύξουν Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης και 29% αυτών που θα αναπτύξουν τον όψιμο τύπο της επιπλοκής, με 5% ψευδώς θετικά ευρήματα [106]. Το 2016, οι *O' Gorman και συν.* χρησιμοποιώντας ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο με το οποίο μελέτησαν 8775 μονήρεις κυήσεις από τις οποίες 17 ανέπτυξαν Προεκλαμψία πριν τις 32 εβδομάδες κύησης, 59 πριν τις 37 εβδομάδες και 180 μετά τις 37 εβδομάδες κύησης μελέτησαν την ικανότητα ανίχνευσης της Προεκλαμψίας μέσω ενός αλγορίθμου που περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά της εγκύου, το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης, ο συνδυασμός των ανωτέρω χαρακτηριστικών έχει ικανότητα πρόβλεψης 53% των περιπτώσεων πρώιμης έναρξης Προεκλαμψίας στο πρώτο τρίμηνο, 41% σε περιπτώσεις που ανέπτυξαν Προεκλαμψία πριν τις 37 εβδομάδες και 37 % σε γυναίκες οι οποίες μετέπειτα θα αναπτύξουν Προεκλαμψία (>37 εβδομάδες κύησης), με ποσοστό 10% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [107].

1.8.2 Βιοφυσικοί δείκτες

Μέση Αρτηριακή Πίεση (ΜΑΠ)

Η μέτρηση της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης (ΜΑΠ) αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη πρόβλεψης του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας. Η μέτρηση πρέπει να πραγματοποιείται από εξειδικευμένους γιατρούς, οι έγκυες να είναι ξεκούραστες σε άνετη καθιστή θέση, το χέρι στο οποίο γίνεται η μέτρηση να είναι στο ύψος της καρδιάς και η περιχειρίδα να είναι ανάλογη με την περίμετρο του βραχίονα. Η μέτρηση πραγματοποιείται και στα δυο χέρια από δύο φορές στο κάθε ένα. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται μια σταθερή τιμή για την αρτηριακή πίεση της εγκύου.

Σε μελέτη μετα-ανάλυσης στην οποία συμμετείχαν 5.590 έγκυες γυναίκες με μονήρεις κύσεις στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (11-13 εβδομάδες κύησης) διαπιστώθηκε ότι η μέτρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης σε συνδυασμό με ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου και στοιχεία από το ιστορικό έχει δυνατότητα πρόβλεψης 60% των εγκύων που θα αναπτύξουν Προεκλαμψία μετά την 24^η εβδομάδα της κύησης και 40% αυτών που θα εμφανίσουν υπέρταση της κύησης [108]. Επιπλέον, διαπιστώθηκαν αυξημένες τιμές ΜΑΠ σε εγκύους με ιστορικό Προεκλαμψίας, ατομικό ή οικογενειακό.

Υπερηχογραφικοί δείκτες

Ο πρώτος βασικός υπερηχογραφικός έλεγχος πρέπει να πραγματοποιείται μεταξύ της 11^{ης} και της 13^{ης} εβδομάδας της κύησης και θα πρέπει να περιλαμβάνει τη μέτρηση του κεφαλοουριαίου μήκους (Crown-rump length - CRL) του εμβρύου με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό της ηλικίας κύησης [109].

Για την πρόβλεψη της Προεκλαμψίας σε αρχικά στάδια της κύησης έχει μελετηθεί το υπερηχογράφημα Doppler της μητριάας αρτηρίας (uterine Artery Doppler Velocity - UtA) στο οποίο αποτυπώνονται οι αλλαγές της αιματικής ροής στις μητριάες αρτηρίες. Η μειωμένη διεισδυτικότητα, μειωμένη αιματική ροή στις μητριάες αρτηρίες και η ισχαιμία του πλακούντα δημιουργούν αυξημένη αντίσταση ροής (pulsatility index - PI) στις μητριάες αρτηρίες και παρουσία διασταλτικών εγχοπών, ήδη από το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης με αποτέλεσμα μη φυσιολογικό πρότυπο στο υπερηχογράφημα (waveform pattern).

Το υπερηχογράφημα Doppler των μητριάων αρτηριών έχει δυνατότητα πρόβλεψης 82% του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας πρώιμης έναρξης με ποσοστό 10% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [107]. Επιπλέον, αυξημένη PI στις μητριάες αρτηρίες το πρώτο τρίμηνο της κύησης έχει συνδυαστεί με την εμφάνιση επιπλοκών που χαρακτηρίζονται από αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα.

1.8.3 Βιοχημικοί δείκτες

Πολλές μελέτες και μετα-αναλύσεις επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση βιοχημικών δεικτών με σκοπό τον πληθυσμιακό έλεγχο για την ανίχνευση της Προεκλαμψίας σε πρώιμο στάδιο στην 11^η με 13^η εβδομάδα της κύησης.

Για την πρόγνωση της Προεκλαμψίας, έχει χρησιμοποιηθεί η PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein -A), μια πρωτεΐνη που παράγεται από τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Η συγκέντρωσή της στο περιφερικό αίμα της εγκύου αυξάνει από την πέμπτη εβδομάδα της κύησης έως τον τοκετό οπότε και ελαττώνεται άμεσα, με χρόνο ημιζωής 3 έως 4 ημέρες. Σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν 8.775 έγκυες με μονήρεις κυήσεις μεταξύ της 11^{ης} και 13^{ης} εβδομάδας κύησης, διαπιστώθηκε ότι ελαττωμένη συγκέντρωση της PAPP-A ανιχνεύεται στον ορό εγκύων οι οποίες αργότερα εμφάνισαν Προεκλαμψία [107].

Σε πρόσφατη πολυκεντρική διαπιστώθηκε ότι εκτός της PAPP-A και τα επίπεδα της PlGF (Placental Growth Factor) παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μείωση στον ορό εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας στις 11 - 13 εβδομάδες κύησης. Η μέτρηση αυτή μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας [102].

Ένας ακόμη δείκτης ο οποίος έχει μελετηθεί για την πρώιμη ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για Προεκλαμψίας είναι ο sFlt1 (Soluble fms-like tyrosine kinase-1), ο οποίος παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα στον ορό εγκύων που πρόκειται να αναπτύξουν την επιπλοκή. Η αύξηση της έκφρασης του παράγοντα αυτού είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της επιπλοκής, με τα υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται στην Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης με βαριά συμπτωματολογία [110].

Διάφορες άλλες πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη του πλακούντα έχουν προταθεί ως υποψήφιοι βιοδείκτες για την ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας. Μέχρι σήμερα, όμως δεν υπάρχει μελέτη η οποία να δικαιολογεί τη χρήση τους σε κλινικό επίπεδο. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-hCG), η ανασταλτίνη A, η ακτιβίνη A, η πλακουντιακή πρωτεΐνη 13 (PP-13), η λεπτίνη και η διαλυτή ενδογλίνη (sEng).

Το ελεύθερο DNA (cell free DNA - cfDNA) έχει επίσης προταθεί ως δείκτης για την εκτίμηση κινδύνου για την ανάπτυξη της Προεκλαμψίας, εφόσον διαπιστώθηκε ότι αυξάνεται το πρώτο τρίμηνο της κύησης, στο πλάσμα εγκύων, οι οποίες αργότερα ανέπτυξαν Προεκλαμψία [111]. Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η συνδυαστική μέτρηση του cfDNA, του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cell free fetal DNA - cffDNA) και της sEng έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της Προεκλαμψίας με ευαισθησία 81.2% [112].

1.8.4 Συνδυασμός δεικτών

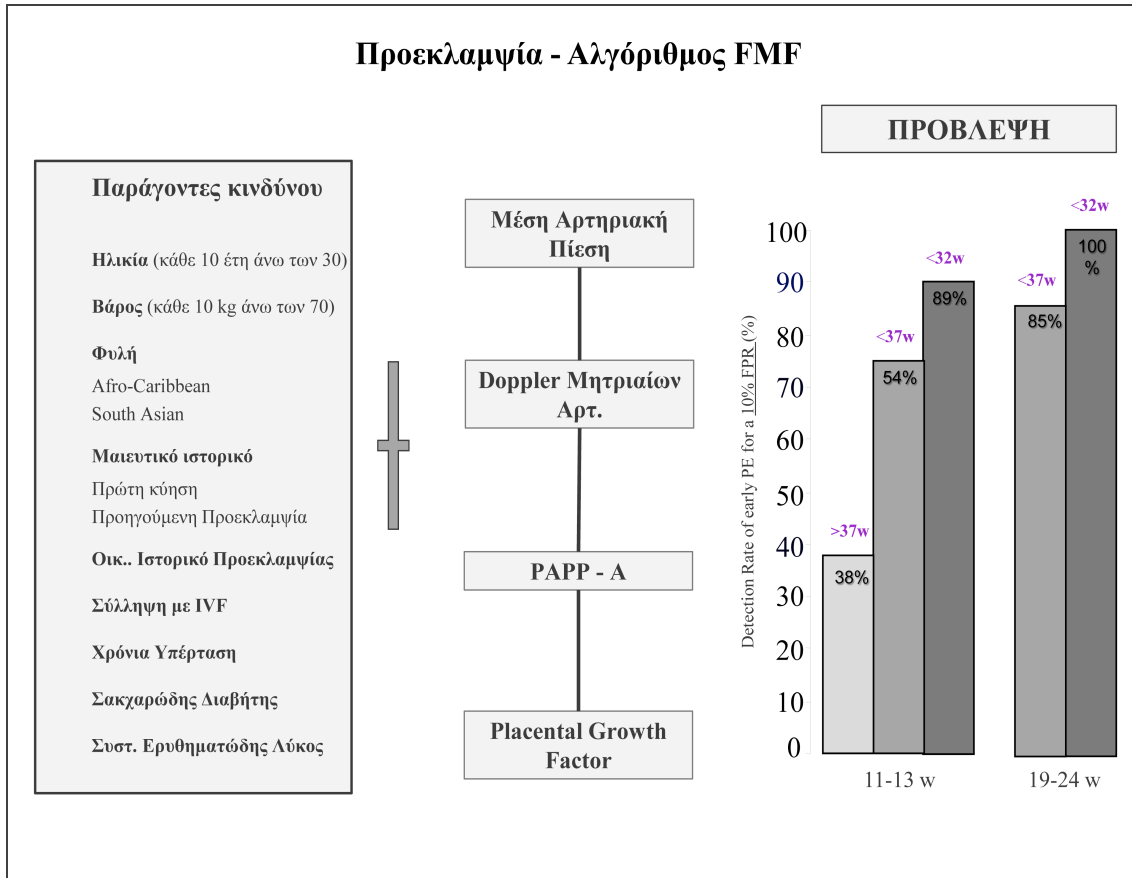
Λόγω της πολυπλοκότητας της επιπλοκής, είναι πιθανό η ανίχνευση των κήσεων υψηλού κινδύνου σε πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης να πραγματοποιηθεί με το συνδυασμό βιοχημικών, υπερηχογραφικών δεικτών και στοιχείων του ατομικού ιστορικού της εγκύου σε ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο.

Πρόσφατη μελέτη που περιλαμβάνει 9.462 έγκυες στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, έδειξε ότι η μέτρηση του κλάσματος PIGF/sFlt1 σε συνδυασμό με το ατομικό ιστορικό, τη μέτρηση της ΜΑΠ και υπερηχογραφικούς δείκτες έχει δυνατότητα ανίχνευσης ποσοστού 87.7% των εγκύων που αργότερα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης θα εμφανίσουν πρώιμης έναρξης Προεκλαμψία και 68.3% αυτών που θα αναπτύξουν τον όψιμης έναρξης υπότυπο, με 5% ψευδώς θετικά αποτελέσματα [113].

Οι *Roop και συν.*, σε πολυκεντρική μελέτη μελέτησαν τη χρησιμοποίηση του συνδυασμού λεπτομερούς ατομικού ιστορικού και υπερηχογραφήματος Doppler μητριάων αρτηριών το πρώτο τρίμηνο της κύησης, με την μέτρηση της PAPP-A και PIGF στο αίμα της μητέρας και έδειξαν δυνατότητα πρόβλεψης της Προεκλαμψίας πρώιμης έναρξης με 93% ευαισθησία και 95% ειδικότητα [114].

Σημαντική πρόοδο στον καθορισμό αλγόριθμου πρώιμης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας αποτέλεσε η μελέτη των *Rolnik και συν.* το 2017 στην οποία συμμετείχαν 25.797 έγκυες με μονήρεις κήσεις, από τις οποίες 180 ανέπτυξαν πρώιμης έναρξης και 450 όψιμης έναρξης Προεκλαμψία. Η μελέτη αυτή προτείνει τη χρησιμοποίηση αλγόριθμου που συνδυάζει τα ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου με τη ΜΑΠ, την αντίσταση των μητριάων αρτηριών μέσω Doppler και τη συγκέντρωση του PIGF την 11^η με 13^η εβδομάδα της κύησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης, ο συνδυασμός των παραγόντων έχει ικανότητα πρόβλεψης 76,7% των περιπτώσεων πρώιμης έναρξης Προεκλαμψίας και 43,1% όψιμης έναρξης, με ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ποσοστό 9,2% [100]. Στην εικόνα 6, παρουσιάζεται το ποσοστό ανίχνευσης της επιπλοκής ανάλογα με την ηλικία κύησης κατά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, σύμφωνα με τον αλγόριθμο πρόβλεψης της Προεκλαμψίας από τον *O' Gorman και συν.*, συνδυάζοντας το ατομικό ιστορικό, το υπερηχογράφημα Doppler μητριάων αρτηριών, τη μέτρηση της ΜΑΠ και των πρωτεϊνών PAPP-A και PIGF [107].

Προεκλαμψία - Αλγόριθμος FMF



Εικόνα 6: Αλγόριθμος πρόβλεψης του κινδύνου εμφάνισης Προεκλαμψίας στις 11 - 13 εβδομάδες κύησης (Αλγόριθμος Fetal Medicine Foundation) [107].

2. Micro RNAs (miRNAs)

2.1 Εισαγωγή στα miRNAs

Τα miRNAs αποτελούν ομάδα μικρών μορίων RNA με μέγεθος περίπου 22 νουκλεοτιδία που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο χωρίς να κωδικοποιούν για την παραγωγή πρωτεϊνών. Τα μόρια αυτά συνδέονται στην μη μεταγραφική περιοχή των mRNAs (messenger RNAs) με αποτέλεσμα την κατάτμηση ή την αναστολή της μετάφρασης τους. Κάθε μονόκλωνο miRNA έχει περίπου χίλια γονίδια στόχους και κάθε γονίδιο - στόχος μπορεί να ρυθμίζεται από περισσότερα από ένα miRNA [115]. Υπολογίζεται ότι τα μόρια αυτά ρυθμίζουν ποσοστό 30% των γονιδίων του ανθρώπου που κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζονται πολλές βιολογικές διεργασίες και κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Συμμετέχουν επίσης σε πολλές σηματοδοτικές οδούς (pathways) όπως η αγγειογένεση, ανάπτυξη ανοσοκυττάρων, μεταβολισμός, έκκριση ινσουλίνης και ανάπτυξη οργάνων [116,117].

Τα πρώτα microRNAs (miRNAs) που ανακαλύφθηκαν ήταν τα lin-4 και let-7 τα οποία εμπλέκονται σε σηματοδοτικές οδούς ανάπτυξης στον *C. Elegans*, ενώ ο όρος miRNAs άρχισε να χρησιμοποιείται το 2001 [118]. Την τελευταία δεκαετία έχουν ταυτοποιηθεί χιλιάδες miRNAs από αρκετούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου [117,119]. Ο αριθμός αυτός αυξάνεται συνεχώς καθώς οι μελέτες στον τομέα συνεχίζονται με αμείωτο ενδιαφέρον.

Οι αλληλουχίες των ώριμων miRNAs είναι φυλογενετικά συντηρημένες έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και σταθερότητα σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη από τα mRNAs [120,121]. Τα miRNAs δρουν ενδοκυττάρια ή και εξωκυττάρια, σε βιολογικά υγρά όπως το πλάσμα, ο ορός, το σάλιο και τα ούρα. Όταν ανιχνεύονται σε ελεύθερη μορφή στα βιολογικά υγρά ονομάζονται ελεύθερα (circulating) miRNAs και αποτελούν σχετικά σταθερά μόρια [122]. Το πρότυπο έκφρασης των μορίων αυτών είναι ιστοειδικό, κυτταροειδικό και το επίπεδο έκφρασης τους μεταβάλλεται σε διάφορες ασθένειες. Τα μοναδικά αυτά χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην δυνατότητα ανάπτυξης μη επεμβατικών διαγνωστικών, προβλεπτικών ή και προγνωστικών δοκιμασιών [123].

Έχει διαπιστωθεί διαφοροποίηση του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε ιστούς ή όργανα που δυσλειτουργούν, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν ενεργά στον παθογενετικό μηχανισμό διάφορων παθολογικών καταστάσεων. Οι αλλαγές του προτύπου έκφρασης των miRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο όπου και έχουν ταυτοποιηθεί miRNAs με

διαφοροποιημένη έκφραση σε διάφορους τύπους της νόσου συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών [124], μαστού [125], εγκεφάλου [126], δέρματος [127], λεμφώματα [128] κ.α. Έχει επίσης μελετηθεί ο ρόλος των miRNAs στα καρδιαγγειακά νοσήματα [129], τις ιογενείς λοιμώξεις [130], τις διαταραχές του μεταβολισμού [131], τα αυτοάνοσα νοσήματα [132], την κύηση [117,133] και την αναπαραγωγή [134]. Συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης των miRNAs έχει καταγραφεί στον πλακούντα και το περιφερικό αίμα εγκύων με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης και πρόωρο τοκετό [117,133].

2.2 Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs

2.2.1 Γονίδια και βιογένεση των miRNAs

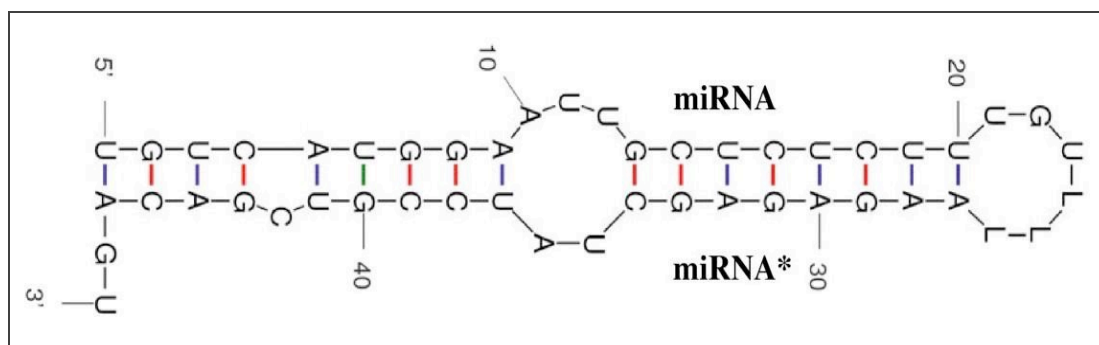
Στον άνθρωπο τα miRNA γονίδια αποτελούν ποσοστό 1 - 4% των εκφραζόμενων γονιδίων. Έχουν μήκος έως και μερικές χιλιάδες νουκλεοτίδια και εντοπίζονται σε όλα τα χρωμοσώματα εκτός από το χρωμόσωμα Y, σε εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις ή περιοχές όπου υπάρχει αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων [135].

Τα περισσότερα miRNA γονίδια βρίσκονται σε εσόνια mRNA μορίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (61%) ή μεταξύ γονιδίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (18%) [136]. Ποσοστό 20% των miRNA γονιδίων εντοπίζεται σε εξόνια mRNA γονιδίων, ενώ άλλα είναι ομαδοποιημένα και μεταγράφονται πολυσυστρονικά με δικό τους εκκινητή [135].

Η βιογένεση των miRNAs αποτελεί διαδικασία πολλαπλών σταδίων τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Τα miRNA γονίδια μεταγράφονται με την RNA πολυμεράση II με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρωτογενών miRNA μεταγράφων [primary (pri)-miRNA]. Τα μόρια αυτά έχουν μήκος 60-70 νουκλεοτιδίων, σχήμα φουρκέτας (hairpin structure, HPS) και αποτελούνται από μια ακραία θηλιά (T-loop) με δύο μονόκλωνες περιοχές (single stranded regions, SSR) [137]. Ακολουθεί πέψη του pri-miRNA από σύμπλοκο μικροεπεξεργαστών που αποτελείται από την πυρηνική πρωτεΐνη RNase III Droscha και το συνένζυμο DGCR8 (DiGeorge critical region of gene 8) το οποίο κατευθύνει και σταθεροποιεί τη δράση της Droscha μέσω περιοχών δέσμησης στο δίκλωνο μόριο RNA [138,139]. Η ακριβής θέση πέψης του πρόδρομου μορίου καθορίζεται από την DGCR8 και βρίσκεται σε απόσταση 11 ζευγών βάσεων από τη θέση σύνδεσης. Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός του πρόδρομου miRNA [precursor (pre) - miRNA], μήκους 17-24 νουκλεοτιδίων με δομή φουρκέτας η οποία διευκολύνει την έξοδο του μορίου στο κυτταρόπλασμα [138,140]. Το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5, πρωτεΐνης του συμπλέγματος του πυρηνικού πόρου και του συμπάραγοντα RAN-GTP (RAs related nuclear protein -Guanosine - 5' - triphosphate) [141-143].

Ακολουθεί πέψη του pre-miRNA από την ενδονουκλεάση RNase III, το Dicer, το συνένζυμο TRBP (transactivator RNA binding protein) και το σύμπλοκο PACT (protein activator of PKR). Το ώριμο miRNA προκύπτει από το 5' ή το 3' βραχίονα του pre-miRNA ή σε σπάνιες περιπτώσεις και από τους δυο, είναι δίκλωνο (miRNA:miRNA*) έχει μήκος 22 νουκλεοτιδία, 5' φωσφορυλιωμένα άκρα και 3' προεξέχοντα άκρα μήκους 2 νουκλεοτιδίων (Εικόνα 7) [144-148].

Μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης, το miRNA ενσωματώνεται στο ριβονουκλεϊνικό σύμπλοκο αποσιώπησης RISC (RNA-induced silencing complex) το οποίο περιλαμβάνει ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Argonaute (AGO) μέσω μιας ATP εξαρτώμενης διαδικασίας [149]. Το σύμπλοκο RISC συνδέεται μόνο με το ένα από τα δύο μόρια miRNA (miRNA:miRNA*) και ο διαχωρισμός εξαρτάται απόλυτα από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του δίκλωνου μορίου [150]. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο συμπληρωματικός κλώνος (miRNA*) είναι ανενεργός με μικρό χρόνο ημιζωής με αποτέλεσμα να αποδομείται γρήγορα χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα αφού τα μόρια αυτά έχουν αλληλουχηθεί σε βιβλιοθήκες κλωνοποιημένων miRNAs [151].



Εικόνα 7: Σύμπλοκο miRNA-miRNA* (pre-miRNA) (*mirbase.org*).

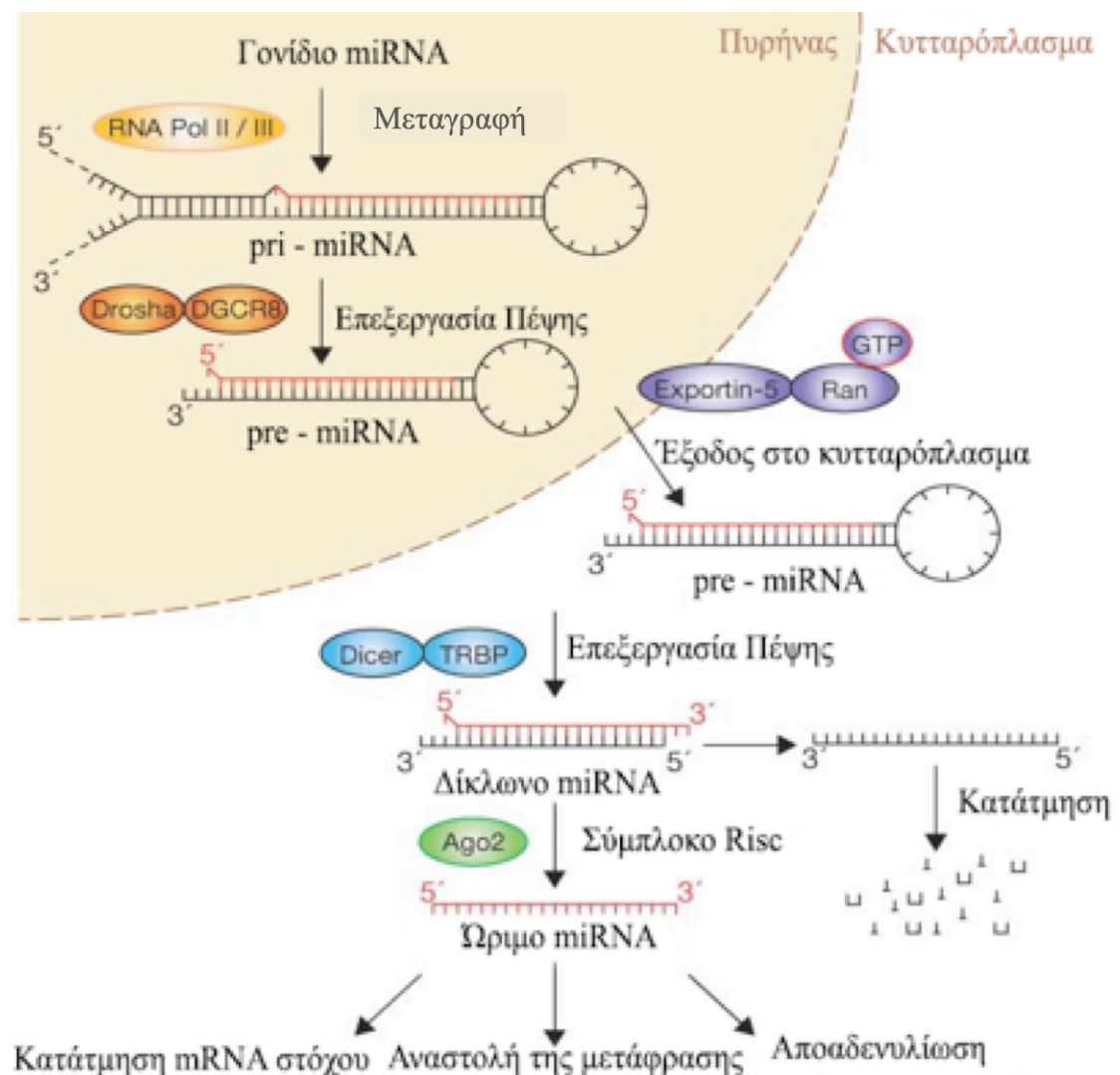
2.2.2 Μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των mRNAs

Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση αρχίζει στο σύμπλοκο RISC - miRNA όταν στη νουκλεοτιδική περιοχή στο 5' άκρο του miRNA (seed region - SR) προσδεθεί η συμπληρωματική αλληλουχία 3'-UTR του mRNA στόχου (microRNA recognition element - MRE) [152,153]. Αποτέλεσμα της σύνδεσης είναι η αναστολή της μετάφρασης, η πολυαδενυλίωση της αλληλουχίας του ή/και η κατάτμησή του mRNA (Εικόνα 8) [154,155].

Ο ρυθμιστικός μηχανισμός και ο βαθμός αποσιώπησης του γονιδίου στόχου είναι σε απόλυτη εξάρτηση από το βαθμό συμπληρωματικότητας της SR με την MRE περιοχή, τον τύπο και τη θέση των μη συμπληρωματικών βάσεων, τον αριθμό των επαναλήψεων του μοτίβου

αναγνώρισης του 5' άκρου και τη δομή του mRNA στην περιοχή πρόσδεσης [115,156,157]. Όταν ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ miRNA και mRNA είναι υψηλός (απόλυτη συμπληρωματικότητα), γίνεται κατάτμηση του mRNA με ενδονουκλεολυτική πέψη με τις πρωτεΐνες Argonaute (AGO) και GW182 [158]. Εναλλακτικά, σε περιπτώσεις μερικής συμπληρωματικότητας, δρα ο μηχανισμός καταστολής της μετάφρασης μέσω τροποποίησης ιστονών και μεθυλίωσης αλληλουχιών των εκκινητών των γονιδίων [159,160].

Άλλοι παράγοντες που μελετώνται για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία μεταγραφικής αποσιώπησης είναι η μεθυλίωση, η γονιδιακή ενίσχυση, η έλλειψη της πρωτεΐνης DICER και οι πολυμορφισμοί γονιδίων.



Εικόνα 8: Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs. Η βιογένεση των miRNAs αποτελεί διαδικασία πολλαπλών σταδίων στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Τα ώριμα miRNAs συνδέονται στη μη μεταγραφική περιοχή των mRNAs (messenger RNAs) με αποτέλεσμα την κατάτμηση ή αποαδενυλίωση ή αναστολή της μετάφρασης του mRNA στόχου [161].

2.3 Ονοματολογία

Η ονοματολογία των miRNAs προέρχεται από αρίθμηση με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας με ήδη χαρτογραφημένα μόρια. Κάθε νέο miRNA που χαρτογραφείται λαμβάνει τον αμέσως επόμενο αριθμό στη σειρά, με την προϋπόθεση ότι η αλληλουχία του είναι διαφορετική από ήδη καταγεγραμμένο μόριο.

Τα miRNA γονίδια και τα πρόδρομα μόρια καταγράφονται ως «mi_g» ακολουθούμενο από μοναδικό αριθμό ταυτοποίησης. Το ώριμο miRNA καταγράφεται αντίστοιχα ως «mi_R». Χαρακτηριστικό του είδους προέλευσης των miRNAs, αποτελεί ένα πρόθεμα 3 γραμμάτων. Στον άνθρωπο, το πρόθεμα είναι το *hsa* προερχόμενο από το Homo Sapiens, ενώ για τα αντίστοιχα miRNAs τα οποία χαρτογραφούνται από ανάλυση του γονιδιώματος του ποντικού είναι το *mmu* από το mus musculus.

Αλληλουχίες των οποίων τα ώριμα miRNAs διαφέρουν σε μια ή δυο βάσεις, χαρακτηρίζονται από μια κατάληξη ενός γράμματος, όπως για παράδειγμα *hsa-miR-10a* και *hsa-miR-10b*. Για αλληλουχίες οι οποίες διαφέρουν σε παραπάνω από δυο βάσεις, η ονοματολογία προτείνεται βάσει της ομοιότητάς τους στο τμήμα φουρκέτας του πρόδρομου μορίου με κάποιο ήδη καταγεγραμμένο miRNA. Αλληλουχίες ώριμων miRNAs που είναι όμοιες αλλά προέρχονται από διαφορετικό γενετικό τόπο (genetic loci) παίρνουν κατάληξεις αριθμών, όπως το *hsa-mir-16-1* και το *hsa-mir-16-2* [162].

Κάποια πρόδρομα μόρια miRNAs, δημιουργούν δυο ώριμα μόρια προερχόμενα από τους δυο βραχίονες της δομής φουρκέτας. Η ονοματολογία του antisense κλώνου συμβολίζεται με ένα αστεράκι, όπως για παράδειγμα το *miR-126* και *miR-126**. Ωστόσο, στην πρόσφατη βιβλιογραφία επικρατεί η ονοματολογία με την προσθήκη της κατάληξης 5p και 3p αναφερόμενες στον 5' βραχίονα (arm) και τον 3' βραχίονα (arm), αντίστοιχα. Παράδειγμα αποτελεί το *miR-142-3p* με το antisense *miR-142-5p*.

2.4 Ταυτοποίηση των miRNAs

Τα microRNAs καταγράφονται στη βάση δεδομένων miRBase, η οποία δημιουργήθηκε το 2003 και παρέχει πληροφορίες για την αλληλουχία, βιογένεση, χαρτογράφηση στο γονιδίωμα, βασικές λειτουργίες και την ονοματολογία [162]. Επιπλέον, στη miRBase καταχωρούνται και βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα γονίδια-στόχους. Στην τελευταία έκδοση της miRBase (v22) έχουν καταγραφεί 38.589 μοναδικές καταχωρήσεις πρόδρομων miRNAs με δομή φουρκέτας από 271 οργανισμούς. Από αυτά τα πρόδρομα μόρια προκύπτουν 48.860 διαφορετικές αλληλουχίες ώριμων miRNAs. Το ανθρώπινο γονιδίωμα (hsa) περιέχει 1.984 καταγεγραμμένα πρόδρομα miRNAs και 2.693 ώριμες αλληλουχίες (<http://www.mirbase.org/>).

Η εύρεση εκκινητών των miRNAs είναι δύσκολη διαδικασία ακόμη και με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής λόγω της ετερογένειας τόσο της γονιδιωματικής οργάνωσης όσο και του προτύπου έκφρασης. Σε μερικές περιπτώσεις, τα γονίδια των miRNAs έχουν το δικό τους, ανεξάρτητο εκκινητή, ενώ άλλα έχουν περισσότερους εκκινητές. Οι εκκινητές είναι ενδογενείς, όταν βρίσκονται ανάμεσα σε δυο εσώνια πριν το miRNA ή υβριδικοί, όταν βρίσκονται σε διαγονιδιακές περιοχές σε απόσταση από το miRNA. Κάθε τύπος εκκινητή έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα οι εκκινητές των ενδογονιδιακών miRNAs είναι συγκριτικά μεγαλύτεροι από αυτούς των διαγονιδιακών miRNAs. Παρόλα αυτά έχουν και κοινά στοιχεία, όπως το γεγονός ότι ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν μέγεθος <100 βάσεις και σχετίζονται με τις νησίδες CpG [163].

Την τελευταία δεκαετία οι μελέτες επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά, για τη μελέτη νοσημάτων όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τα μεταβολικά σύνδρομα, οι επιπλοκές της κύησης και οι νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Η ταυτοποίηση των miRNAs είναι εξαιρετικά σημαντική για την κατανόηση της σημασίας, λειτουργίας και συμβολής τους στο παθογενετικό μηχανισμό ανάπτυξης της ασθένειας.

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των miRNAs πραγματοποιείται με τη χρήση μικροσυστοιχιών, της τεχνικής qRT-PCR και των συστημάτων αλληλούχισης νέας γενιάς. Πλατφόρμες μικροσυστοιχιών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της Προεκλαμψίας περιλαμβάνουν την miRNA microarrays 821 (Agilent), TaqMan Open Array Human miRNA Panel 754 (Applied Biosystems), miRLink v16 Bioarray 300054-169 3PK (Applied Biosystems), TaqMan Low Density Array Human microRNA cARD sET 754, miScript miRNA PCR array 84 (Qiagen) ενώ η μελέτη μέσω της χρήσης αλληλούχισης νέας γενιάς

συμπεριλαμβάνει τα συστήματα Small RNA seq (TruSeq και miSeq, Illumina), Ion torrent (Thermo Fisher) και Small RNA seq SOLiD (Applied Biosystems). Με τις μικροσυστοιχίες είναι δυνατή η ταυτόχρονη ποσοτική μελέτη μεγάλου αριθμού miRNAs. Μέσω ειδικών σταθεροποιημένων αλληλουχιών (probes) σε ειδικές πλατφόρμες και καλά χαρακτηρισμένους αλγόριθμους μελετάται ποσοτικά η έκφραση των miRNAs. Με τη χρήση των συστημάτων αλληλούχισης νέας γενιάς γίνεται ταυτόχρονη αλληλούχιση του συνόλου των miRNAs στο υπό μελέτη υλικό [164]. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η δυνατότητα μελέτης της έκφρασης ήδη γνωστών miRNAs αλλά και η ταυτοποίηση νέων μορίων που δεν έχουν έως τώρα μελετηθεί.

2.5 Υπολογιστικές μέθοδοι για την αναγνώριση των mRNA στόχων

Μετά την ταυτοποίηση των miRNAs στο υπό μελέτη δείγμα χρησιμοποιούνται μέθοδοι βιοπληροφορικής για τον καθορισμό της έκφρασης και την εύρεση των γονιδίων - στόχων των μορίων αυτών. Το TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) είναι μια από τις πρώτες βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των miRNAs με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Κατά την ανάλυση των γονιδίων-στόχων χρησιμοποιείται ένα «context score» πολλών παραγόντων συνδυαστικά το οποίο περιλαμβάνει τον τύπο του mRNA στόχου, την τοπική συνιστώσα AU (συσταση μεταγράφου σε A, U στην περιχή 30 νουκλεοτιδίων πριν και μετά του γονιδίου στόχου), τη θέση της περιοχής του στόχου και το ποσοστό συμπληρωματικότητας (συνήθως στο 3'-UTR). Κάθε θέση συμμετέχει ανεξάρτητα στην τελική βαθμολογία. Με πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multiple linear regression) συνυπολογίζονται η δυνατότητα ταξινόμησης βάσει συμπληρωματικότητας και η διατήρηση της θέσης στόχου. Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί την ονοματολογία και τα χαρακτηριστικά των miRNAs που καταγράφονται στην τελευταία έκδοση του miRBase [165]. Περισσότερες βάσεις δεδομένων με αλγορίθμους πρόβλεψης γονιδίων - στόχων των miRNAs περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση των γονιδίων - στόχων των miRNAs

Tool	Είδος*	Κριτήρια για την πρόβλεψη & κατάταξη γονιδίων στόχων	Website URL
TargetScan	m,f,w	Ανίχνευση και πρόβλεψη συντηρημένων στόχων σε θηλαστικά (10 είδη). Αυστηρό ταίριασμα βάσεων, παράγοντες όπως τύπος τοποθεσίας, προσβασιμότητα τοποθεσίας στο UTR και συντηρημένης αλληλουχίας.	http://www.targetscan.org/
EMBL	f	Αυστηρή αντιστοίχιση βάσεων, τοποθεσίας και συνολικής σταθερότητας mRNA-miRNA	http://www.russelllab.org/miRNAs/
PicTar	m,f,w	Αντιστοίχιση βάσεων για τουλάχιστον μια περιοχή του miRNA (συνήθως του 3'-UTR) και συνολική σταθερότητα mRNA-miRNA	http://pictar.mdc-berlin.de
EIMMo	m,f,w	Ανάλυση των σηματοδοτικών οδών και της εξελικτικής συντήρησης	http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo
miRanda	m,f,w	Ταυτοποίηση βάσει κανόνων θέσης και συντήρησης μεταξύ των ειδών	http://www.microna.org
miRBase	m,f,w	Μη ισχυρή αντιστοίχιση βάσεων, συνολικό ταίριασμα αλληλουχιών	http://microrna.sanger.ac.uk
PITA Algorithm	m,f,w	Συνολική σταθερότητα του mRNA-miRNA και θέσης πρόσβασης του μορίου στην περιοχή UTR	https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html
mirWIP	w	Συνολική σταθερότητα του συμπλόκου mRNA-miRNA και της προβλεπόμενης τοποθεσίας του μορίου	http://146.189.76.171/query
RNA 22	m,f,w	Μη ισχυρή αντιστοίχιση βάσεων, ταιριάζει μοτίβα αλληλουχιών που δημιουργούνται από το σύνολο των miRNAs, συνολικό ταίριασμα αλληλουχιών	https://cm.jefferson.edu/rna22/
RNA-hybrid		Η ενέργεια υβριδισμού και της προσβασιμότητας συνήθως του 3'-UTR	http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/
DIANA (micro T3.0)	m,f,w	Υπολογισμός πολλαπλών παραμέτρων από κάθε miRNA ταυτόχρονα, συνδυασμός πληροφοριών από συντηρημένα και μη miRNAs	http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php
miRTar	m	Μη ισχυρή αντιστοίχιση, συσχέτιση βιολογικών λειτουργιών και γονιδίων στόχων	http://mirtar.mbc.ncsu.edu.tw/human/

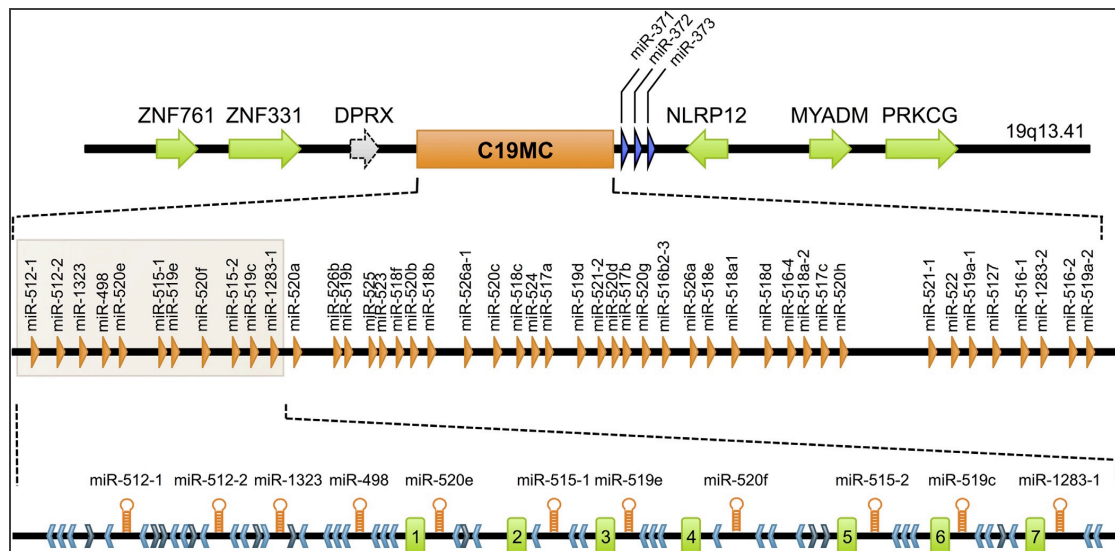
* m: θηλαστικά, f: Drosophila Melanogaster, w: C. Elegance

2.6 Τα miRNAs στη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα

Τα miRNAs έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργικότητα του πλακούντα. Περίπου 600 διαφορετικά μόρια miRNAs συντίθεται στον ανθρώπινο πλακούντα, τα περισσότερα από τα οποία έχουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης [166]. Ο λειτουργικός ρόλος των μορίων αυτών έχει μελετηθεί εκτενώς. Μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε κυτταρικές σειρές τροφοβλαστικών και χοριοκαρκινικών κυττάρων έχει δείξει ότι τα μόρια αυτά συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (miR-20a, miR-137, miR-141, miR-155, miR-210, miR-376c, miR-378a-5p και miR-675), τη διαφοροποίηση (miR-17/92 και miR-424), τη μετανάστευση - διείσδυση (miR-18a, miR-21, miR-34a, miR-29b, miR-155, miR-195, miR-137, miR-376c και miR-378a-5p), την απόπτωση (miR-18a, miR-29b, miR-101 και miR-182) και την αγγειογένεση (miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-29b, miR-126, miR-155 και miR-210). Στον Πίνακα 4, συνοψίζονται οι κυριότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs του πλακούντα, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, τα γονίδια στόχοι και ο ρόλος στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα.

Τα γονίδια των περισσότερων miRNAs με αποκλειστική έκφραση στον πλακούντα έχουν χαρτογραφηθεί σε συνεργειακά σύμπλοκα [167]. Τα συμπλόκα C19MC, C14MC και miR-371-3, αποτελούν τα κυριότερα ιστοειδικά εκφραζόμενα σύμπλοκα του πλακούντα.

Το σύμπλοκο C19MC έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19, στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.41. Είναι ένα από τα μεγαλύτερα σύμπλοκα miRNAs που έχουν καταγραφεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα με μέγεθος περίπου 100kb. Περιλαμβάνει 46 pri-miRNAs και 59 ώριμα miRNAs που είναι μετάγραφα του γονιδίου *POL-II* (Εικόνα 9). Το πρότυπο έκφρασης του συμπλόκου ρυθμίζεται από το πρότυπο μεθυλίωσης CpG rich του υποκινητή ο οποίος έχει χαρτογραφηθεί 17.6 kb ανοδικά από το σύμπλοκο. Οι Noquer-Dance και συν., διαπίστωσαν ότι λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων μόνο το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο του συμπλόκου C19MC εκφράζεται στον πλακούντα, γεγονός που επισημαίνει τον κεντρικό ρόλο του στην εμβρυϊκή ανάπτυξη [168].



Εικόνα 9: Σύμπλοκο C19MC. Το σύμπλοκο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19q13.41, περιλαμβάνει 46 pri-miRNAs και 59 ώριμα miRNAs που είναι μετάγραφα του γονιδίου *POL-II*. Απεικονίζεται η γονιδιακή θέση κάθε miRNA και η οργάνωση του 5' άκρου του συμπλόκου. Με γαλάζιο και μπλε σκούρο απεικονίζονται οι παράγοντες Alu που σχετίζονται με τα αντίστοιχα miRNA γονίδια σε αντίθετο (antisense) και παράλληλο προσανατολισμό, αντίστοιχα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα πρώτα επτά εξόνια (1- 7) [122].

DPRX, divergent-paired related homeobox; MYADM, myeloid-associated differentiation marker; NLRP, NLR family, pyrin domain; PRKCG, protein kinase C, gamma; ZNF, zinc finger protein.

Το C14MC είναι το δεύτερο κατά σειρά μεγέθους σύμπλοκο που εκφράζεται ιστοειδικά στον πλακούντα [169]. Έχει μέγεθος 40kb, αποτελείται από 52 miRNA γονίδια και έχει χαρτογραφηθεί στη χρωμοσωμική θέση 14q32, στην περιοχή μεθυλίωσης DLK-DIO3 [170]. Σε αντίθεση με το C19MC, το σύμπλοκο αυτό εκφράζεται μόνο από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο και ρυθμίζεται από συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης. Ένα σύμπλοκο με μικρότερο μέγεθος που εκφράζεται στον πλακούντα είναι το miR-371-3 το οποίο έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19, σε περιοχή μεγέθους 1050bp μετά την περιοχή του C19MC. Αποτελείται από έξι miRNAs (miR-371a-3p, miR-371a-5p, miR-371b-3p, miR-372, miR-373-3p και miR-373-5p) με εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες [167].

Οι Morales-Pietro και συν., μελέτησαν με μικροσυστοιχίες 4 διαφορετικές τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές (HTR-8/Vneo, JEG-3, ACH-3P και AC1-M59) και διαπίστωσαν ότι το πρότυπο έκφρασης των miRNAs του πλακούντα μεταβάλλεται με την ηλικία κύησης. Η έκφραση των miRNAs των συμπλόκων C19MC και miR-371-3 αρχίζει το πρώτο τρίμηνο της κύησης και αυξάνει σταδιακά όσο προχωρά η εγκυμοσύνη. Το αντίθετο διαπιστώθηκε για τα miRNAs του συμπλόκου C14MC καθιστώντας τα miRNAs ως βασικά μόρια για τα αρχικά στάδια της πλακουντοποίησης [171].

Τα miRNAs του πλακούντα έχουν μελετηθεί επίσης σε διάφορους τύπους βιολογικών υγρών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται ο ορός, το πλάσμα, τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο

υγρό [172-174]. Τα ελεύθερα ή κυκλοφορούντα miRNAs απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, από τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα κατά τη διάρκεια της κύησης κυρίως σε εξωσωμάτια, μικροσωματίδια και αποπτωτικά σωμάτια [122]. Σπανιότερα, ελεύθερα miRNAs του πλακούντα έχουν βρεθεί επίσης σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute (AGO) [175].

Το πρότυπο έκφρασης των μορίων αυτών εξαρτάται άμεσα από την ηλικία κύησης και σχετίζεται με τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στα στάδια ανάπτυξης του πλακούντα [172,173]. Τα περισσότερα από τα μόρια αυτά ανήκουν στο σύμπλοκο C19MC. Οι Kotlabova και συν., ταυτοποίησαν στο πλάσμα εγκύων τα miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525 και miR-526a τα οποία απουσιάζουν από το γενικό πληθυσμό [173]. Οι Miura και συν., ταυτοποίησαν 5 miRNAs που εκφράζονται αποκλειστικά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (miR-7-2*, miR-196a, miR-452, miR-548a-3p και miR-619) και 13 miRNAs που εκφράζονται το τρίτο τρίμηνο (miR-1, miR-23b*, miR-214*, miR-31*, miR-34a*, miR-135b, miR-141, miR-143*, miR-204, miR-375, miR-551b*, miR-629 και miR-934) [176]. Η έκφραση των ελεύθερων miRNAs του πλακούντα μειώνεται στο περιφερικό αίμα εγκύων μετά τον τοκετό.

Διαφορές στο πρότυπο έκφρασης τόσο των ενδοκυττάρων όσο και των ελεύθερων miRNAs έχουν διαπιστωθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις της κύησης συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη κύησης, του πρόωρου τοκετού και της Προεκλαμψίας [117,177,178].

Πίνακας 4: Micro RNAs του πλακούντα

miRNA	Τύπος Δείγματος	Μέθοδος	Γονίδιο στόχος	Λειτουργία	Βιβλιογραφία
miR-16	MSC, HTR8/SVNeo	Cell culture miRNA Microarray analysis Western blot analysis qRT-PCR Elisa analysis	CCNE1	Διακοπή κυτταρικού κύκλου, Μείωση μετανάστευσης & αγγειογένεσης	[179]
miR-18a	HTR8/SVNeo	Cell culture miRNA Microarray analysis Western blot analysis qRT-PCR Luciferase assay	Smad 2	Αναστολή κυτταρικής διείσδυσης	[180]
miR-20a	JEG-3	Cell culture RT-PCR Western blot analysis Luciferase assay In situ Hybridization	FOXA1	Αναστολή πολλαπλασιασμού & διείσδυσης τροφοβλαστικών κυττάρων	[181]
miR-20b	HUVEC, BeWo	Cell culture miRNA Microarray analysis Western blot analysis qRT-PCR Elisa analysis	Ephrin- B2, EPHB4	Αναστολή διείσδυσης τροφοβλαστικών κυττάρων και αγγειογένεση	[179]
miR21	TCL-1	Cell culture Western blot analysis qRT-PCR	PTEN	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διείσδυσης	[182]

miR-29b	BeWo, HTR8/SVNeo	Cell culture RT-PCR Western blot analysis Elisa analysis	<i>MCL1, MMP2, VEGFA, ITGB1</i>	Απόπτωσης, αναστολή μετανάστευση και αγγειογένεσης	[183]
miR-34a	JAR	Cell culture Human placental explant Culture Immunoblot analysis RT-PCR	<i>NOTCH1, JAGGED1</i>	Αναστολή πολλαπλασιασμού & διείσδυσης	[184]
	JEG-3	Cell culture qRT-PCR Luciferase assay	<i>SERPINA3</i>		[185]
miR-125b- 1-3p	HTR8/SVNeo	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Luciferase assay	<i>SIPRI</i>	Αναστολή διείσδυσης τροφοβλαστικών κυττάρων	[186]
miR-152	JEG-3	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Luciferase assay	<i>HLA-G</i>	Κυτταρόλυση μέσω τα NK κυττάρων	[187]
miR-155	HTR8/SVNeo	Cell culture Flow cytometry Western blot analysis Luciferase assay	<i>CYCLIN D1</i>	Αναστολή πολλαπλασιασμού & μετανάστευσης κυττάρων	[188]
miR-195	HTR8/SVNeo	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Dual luciferase assay	<i>ACTRIIA</i>	Κυτταρική διείσδυση	[189]
miR-205	PHT,CTB,HTR8/ SVNeo	Cell culture miRNA Microarray analysis qRT-PCR Northern blot ISH Western blot analysis	<i>Med1</i>	Υποξία	[190]
miR-210	CTB	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Luciferase assay	<i>EFNA3, homeobox-A9</i>	Αναστολή πολλαπλασιασμού & διείσδυσης κυττάρων	[191]
	Swan 71, primary trophoblasts	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis	<i>ISCU</i>	Αναστολή δράσης των μιτοχονδρίων & αγγειογένεσης	[192]
miR-376c	HTR8/SVNeo, placental explants	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Luciferase assay	<i>ALK5 ALK7</i>	Κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση & διείσδυση	[66]
miR-378- 5p	HTR8/SVNeo, placental explants	Cell culture Human placental explant culture miRNA Microarray analysis qRT-PCR Western blot analysis	<i>Nodal</i>	Κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση & διείσδυση	[193]
miR-512- 3p	BeWo	Cell culture miRNA Microarray analysis qRT-PCR Western blot analysis	<i>PPP3R1</i>	Μείωση Ca ²⁺ / calcineurin/NFAT & διείσδυσης τροφοβλαστικών κυττάρων	[194]
miR-675	JEG-3	Cell culture qRT-PCR Western blot analysis Luciferase assay	<i>NOMO-1</i>	Αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού	[195]

MSC: Mesenchymal Stem Cell, HTR8/SVNeo: Immortalized, human, first-trimester, extravillous trophoblast cells, HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells, CTB: Cytotrophoblast, EVT: Primary extravillous trophoblast cells, PHT: primary human trophoblast, CCNE1: Cyclin E1, FOXA1: Forkhead Box Protein A1, EPHB4: Ephrin Type-B Receptor, MCL1: Myeloid Cell Leukaemia 1, MMP2: Encoding Matrix Metal Proteinase 2, VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A, ITGB1: Integrin β 1, SIPR1: Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1, PPP3R1: Protein Phosphatase 3, ISCU: Iron Sulfur Cluster, Med1: Mediator Complex subunit 1, EFNA3 : Ephrin A3

2.7 Τα miRNAs στην Προεκλαμψία

Μελέτες του συνόλου των miRNAs (miRNAome) σε υλικό βιοψίας πλακούντα, περιφερικό αίμα εγκύων, μεσεγχοματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), ομφάλιο λώρο και ενδοθηλιακά κύτταρα των ομφάλιων φλεβών του ανθρώπου έδειξαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των miRNAs στην Προεκλαμψία σε σχέση με τη φυσιολογική κύηση [117,177,178,196]. Η διαπίστωση αυτή έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον στη διερεύνηση της σημασίας των miRNA στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας του πλακούντα και στην μετέπειτα εκδήλωση των συμπτωμάτων της επιπλοκής.

Η σταδιακή ανάπτυξη της παθοφυσιολογίας του πλακούντα συνοδεύεται από την αλλαγή του προτύπου έκφρασης των miRNAs που συμμετέχουν στις σηματοδοτικές οδούς μετανάστευσης (miR-210, miR-519d) και διείσδυσης (miR-181a, miR-210, miR-517c, miR-519d, miR-299, miR-134) των τροφοβλαστικών κυττάρων στις σπειροειδείς αρτηρίες της μητέρας μέσω της αρνητικής ρύθμισης γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των *Small mothers against decapentaplegic (SMAD2)* [180], *Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)* [197], *Stromal cell-derived Factor 6 (CXCL6)* [198], *Stromal cell-derived Factor 12 (CXCL12)* [199] και *Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2)* [200]. Παράλληλα, *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι συγκεκριμένα miRNAs επηρεάζουν τη μετανάστευση (miR-18a, miR-126, miR-29a, miR-152, miR-223) και τη διείσδυση (miR-29a) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενδοθηλιακή βλάβη οδηγεί στην έκφραση παραγόντων φλεγμονής.

Στην ανάπτυξη ισχαιμίας του πλακούντα παρατηρείται επίσης ανισορροπία μεταξύ απόπτωσης και πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων. Το miR-210 έχει μελετηθεί εκτενώς για τη δράση του στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και της διείσδυσης μέσω άμεσης μεταμεταγραφικής ρύθμισης του *Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)* [197]. Το miR-29a συμβάλλει στην ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω της στόχευσης του *Myeloid leukemia cell differentiation protein 1 (MCL1)* [201]. Η υπερέκφραση του miR-20a μειώνει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διεισδυτική ικανότητα των JEG-3 κυττάρων μέσω της άμεσης ρύθμισης του *Forkhead box protein A1* [181].

Τα miRNAs ρυθμίζουν επίσης σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, το οξειδωτικό stress, τη φλεγμονή, το μεταβολισμό και την έκκριση ινσουλίνης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της συνοδού συμπτωματολογίας της Προεκλαμψίας [180,202-210]. Σε εγκύους με Προεκλαμψία, η συστηματική αγγειακή δυσλειτουργία πιθανώς προκύπτει από την απελευθέρωση εξωκυττάρων ελεύθερων miRNAs από τα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα δημιουργώντας σταδιακά τη γενικευμένη φλεγμονή. Η αγγειακή δυσλειτουργία

χαρακτηρίζεται από αυξημένο όγκο αιμοπεταλίων, δυσλιπιδαιμία και ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης [51].

Ειδικότερα, τα miRNAs συμβάλλουν στην ανισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο PlGF, ο bFGF και ο VEGF, ως αναστολείς της αγγειογένεσης έχουν μελετηθεί πολλά miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-152, miR-181a, miR-195, miR-517c. Διάφορα miRNAs έχουν μελετηθεί ως προς το ρόλο τους στις σηματοδοτικές οδούς του NF-Kb (Let-7) και TGF-β (miR-181), του συστήματος ρενίνης - αγγειοτενσίνης (miR-27a, miR-155, miR-199b και miR-429), του NOS3 (ενδοθηλιακή συνθετάση του οξειδίου του Αζώτου) (miR-93, miR-155, miR-205, miR-224, miR-451, miR-491 και miR-424), των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-G (miR-133a) και της Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) (Let-7 και miR-181).

Η υπερέκφραση του miR-195-5p σε εγκύους με Προεκλαμψία έχει συνδεθεί με αύξηση της έκφρασης του sFLT-1 και μείωση της έκφρασης του VEGF [211]. Σε μελέτες με τροφοβλαστικά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικών αγγείων διαπιστώθηκε ότι το miR-20b έχει άμεσο στόχο τον παράγοντα Ephrin-b2 και τον υποδοχέα B4 του Eph (Epinephrine Receptor) και ελέγχει την έκφραση του HIF-1A (Hypoxia Inducible Factor 1A), του Matrix Metalloproteinase 2 και του VEGFA [212]. Το miR-155 έχει στόχο το γονίδιο *CYR61* (cysteine-rich angiogenic inducer 61) που εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης [213]. Επιπλέον, το miR-126 ρυθμίζει θετικά τον παράγοντα VEGF, στοχευμένη αναστολή της έκφρασης του σε ποντίκια οδηγεί σε γενικευμένο οίδημα, αιμορραγία και εμβρυϊκό θάνατο λόγω της βλάβης των αγγείων και απορρύθμισης της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων [214].

Στη διεθνή βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών είναι συχνά αντικρουόμενα, γεγονός το οποίο οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των προαναλυτικών και αναλυτικών παραγόντων κάθε μελέτης. Στον Πίνακα 5, παρουσιάζονται τα miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση τα οποία ανιχνεύτηκαν σε περισσότερες από τέσσερις μελέτες, τα πιθανά γονίδια στόχοι τους αναφορικά με τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της Προεκλαμψίας, συμπεριλαμβάνονται μελέτες σε κυτταρικές σειρές τροφοβλαστικών κυττάρων πλακούντα (JEG-3, HTR-8/SVneo, TCL-1), ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC) καθώς επίσης και σε πλάσμα εγκύων με την επιπλοκή.

Πίνακας 5: MiRNAs που βρέθηκαν να σχετίζονται με την Προεκλαμψία (σε τουλάχιστον 4 μελέτες)

miRNA	Χρωμόσωμ. Θέση	Ιστός πλακούντα	Πλάσμα	Γονίδια Στόχοι	Λειτουργία
miR-210	11p15.5	↑ [180,202,207,215-220]	↑ [221-225]	<i>EFNA3</i> ↓ <i>HOXA9</i> ↓ <i>KCMF1</i> ↓ <i>ISCU</i> ↓ <i>THSD7A</i> ↓ <i>STAT6</i> ↓ <i>HSD17B1</i> ↓	T μετανάστευση ↓, T διείσδυση ↓ T μετανάστευση ↓, T αγγειογένεση ↓ T μετανάστευση ↓, T διείσδυση ↓ T μετανάστευση ↓, T διείσδυση ↓ T διείσδυση ↓ T πολλαπλασιασμός ↓, T διείσδυση ↓, ED ↑ ED ↑
miR-233	Xq12	↑ [226,227] ↓ [180,215,219,220,228,229]	↑ [230,231]	<i>STAT3</i> ↓ <i>GALNT1</i> ↓ <i>ICAM1</i> ↓ <i>ELF4E3</i> ↓ <i>IGF1R</i> ↓	T επιβίωση ↑, T διείσδυση ↑ - E προσκόλληση ↓, ED ↓ E πολλαπλασιασμός ↑, E μετανάστευση ↑
miR-18a	13q31.3	↑ [216,232] ↓ [180,215]	↑ [230,232] ↓ [222]	<i>ESR1</i> ↓ <i>SMAD2</i> ↓ <i>ERI</i> ↓ <i>HIF1A</i> ↓	T διείσδυση ↑, T απόπτωση ↓ T διείσδυση ↑ Τα απόπτωση ↓ E πολλαπλασιασμός ↓, E μετανάστευση ↓
miR-181a	1q32.1, 9q33.3	↑ [205,215,220,228]	↑ [224,233]	<i>IGF2BP2</i> ↓ <i>VEGFR1</i> ↓ <i>PROX1</i> ↓	T διείσδυση ↓ E αγγειογένεση ↓ E διαφοροποίηση ↓
miR-21	17q23.1	↑ [232] ↓ [203,229]	↑ [222,230]	<i>PDCD4</i> ↓ <i>PTEN</i> ↓	T πολλαπλασιασμός ↑, T διείσδυση ↑, T μετανάστευση ↑, T απόπτωση ↓ T αγγειογένεση ↑, T πολλαπλασιασμός ↑, T διείσδυση ↑, T μετανάστευση ↑
miR-29a	7q32.2	↑ [232] ↓ [228]	↑ [230-232]	<i>MCL1</i> ↓ <i>HBPI</i> ↓ <i>PTEN</i> ↓	T απόπτωση ↑ E κυτταρικός κύκλος ↑, E πολλαπλασιασμός ↑, E αγγειογένεση ↑ E αγγειογένεση ↑
miR-126*	9q34.3	↑ [216,226,232] ↓ [196,215]	↑ [232]	<i>DLKI</i> ↓	E πολλαπλασιασμός ↓
miR-517c	19q13.42	↑ [216,226,232]	↑ [230-232]	-	T διείσδυση ↓, T αγγειογένεση ↓
miR-518b	19q13.42	↑ [180,215] ↓ [226,227]	↑ [221,230]	<i>RAP1B</i> ↓	T πολλαπλασιασμός ↑
miR-126	9q34.3	↑ [174,232] ↓ [220]	↑ [232] ↓ [221]	<i>SPRED1</i> ↓ <i>PIK3R2</i> ↓ <i>VEGFA</i> ↑ <i>CXCL12</i> ↓	T αγγειογένεση ↑ E αγγειογένεση ↑ E μετανάστευση ↓
miR-182	7q32.2	↑ [220,228]	↑ [223,230] ↓ [234]	-	T απόπτωση ↓
miR-518e	19q13.42	↑ [219,226,232]	↑ [231,232]	-	-
miR-27a	19p13.12	↑ [205,232]	↑ [230,232]	<i>SEMA6A</i> ↓	E αγγειογένεση ↑
miR-130a	11q12.1	↑ [226,232]	↑ [230,232]	<i>GAX</i> ↓ <i>HOXA5</i> ↓	E αγγειογένεση ↑

				<i>SIPR2</i> ↓	ED ↓
miR-152	17q21.32	↑ [215,220]	↑ [221,223]	<i>HLA-G</i> ↓ <i>PLGF</i> ↓ <i>ITGA5</i> ↓	Λύση κυττάρων από NK-κύτταρα ↑ Ε αγγειογένεση ↓ Ε προσκόλληση ↓, Ε αγγειογένεση ↓, Ε μετανάστευση ↑
miR-195	17p13.1	↑ [205] ↓ [180,215,219]	-	<i>ACVR2A</i> ↓ <i>NOS3</i> ↓ <i>VEGFA</i> ↓	T διείσδυση ↑ ED ↑ Ε αγγειογένεση ↓
miR-335	7q32.2	↑ [205,220] ↓ [228]	↓ [221]	<i>CALM1</i> ↓ <i>NOS3</i> ↓	- ED ↑
miR-519d	19q13.42	↑ [232]	↑ [230-232]	<i>MMP2</i> ↓ <i>CXCL6</i> ↓ <i>NR4A2</i> ↓ <i>FOXL2</i> ↓	T διείσδυση ↓, T μετανάστευση ↓ T διείσδυση ↓, T μετανάστευση ↓
miR-584	5q32	↑ [215,220] ↓ [202,228]	-	<i>NOS3</i> ↓	ED ↑

↑-αύξηση; ↓-μείωση; T- τροφοβλαστικά κύτταρα; E- ενδοθηλιακά κύτταρα; ED- δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων; *EFNA3*: Ephrin A3; *ACVR2A*: Activin A Receptor Type 2A; *CXCL12*: Stromal cell-derived Factor; *DLK1*: Delta Like 1 Homolog 1; *ESR1*: Estrogen Receptor 1; *GALNT1*: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1; *HBPI*: HMG box-containing protein 1; *HIF1A*: Hypoxia-inducible factor 1-alpha; *HLA-G*: HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain G; *HOXA5*: Homeobox protein Hox-A5; *HOXA9*: Homeobox protein Hox-A9; *HSD17B1*: Estradiol 17-beta-dehydrogenase 1; *ICAM1*: Intercellular Adhesion Molecule 1; *IGF1R*: Insulin-like growth factor 1 receptor; *IGF2BP2*: Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2; *ISCU*: Iron-sulfur cluster assembly enzyme; *ITGA5*: Integrin alpha-5; *KCMF1*: Potassium Channel Modulatory Factor 1; *PDCD4*: Programmed cell death protein 4; *PIK3R2*: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2); *PLGF*: Placental growth factor; *PROX1*: Prospero homeobox protein 1; *PTEN*: Phosphatase and tensin homolog; *RAP1B*: Ras-related protein Rap-1b; *SIPR2*: Sphingosine 1-phosphate receptor 2; *SEMA6A*: Semaphorin 6A; *SMAD2*: Small mothers against decapentaplegic 2; *SPRED*: Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein; *STAT3*: Signal transducer and activator of transcription 3; *STAT6*: Signal transducer and activator of transcription; *THSD7A*: Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7A; *VEGFA*: Vascular endothelial growth factor; *VEGFR1*: Vascular endothelial growth factor receptor 1

2.8 Τα miRNAs ως βιοδείκτες

Τα miRNAs αποτελούν αντικείμενο έντονης μελέτης για τη δυναμική τους ως υποψήφιοι διαγνωστικοί ή και προγνωστικοί βιοδείκτες. Λόγω του ρυθμιστικού ρόλου και της ιστοειδικότητας τους, τα τελευταία χρόνια πολλά miRNAs έχουν μελετηθεί για τη χρήση τους ως σημαντικοί βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης για την ανάπτυξη αρκετών τύπων καρκίνου, καρδιαγγειακών νοσημάτων και άλλων ασθενειών καθώς συγκεντρώνουν όλα τα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ιδανικά μόρια. Έχουν μελετηθεί επίσης για τη συμβολή τους ως δείκτες για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων φαρμάκων.

Τα ελεύθερα miRNAs βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά και η ανάλυσή τους μπορεί να γίνει με μη επεμβατικό τρόπο. Τα μόρια αυτά έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς απομονώνονται εύκολα, δεν υπόκεινται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, ποσοτικοποιούνται με ακρίβεια με τη χρήση ευαίσθητων τεχνικών, έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής *in vivo* και η συγκέντρωσή τους μπορεί να αποτελέσει χαρακτηριστικό αποτύπωμα σε διάφορες βιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις.

Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα για τη χρήση τους στην Προεκλαμψία αποτελεί το ότι μπορούν να μελετηθούν στο περιφερικό αίμα της εγκύου, σε πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων [174,178]. Αρκετοί ερευνητές μελετώντας τα miRNAs, τα χαρακτηρίζουν όχι μόνο ισχυρούς δυνητικούς διαγνωστικούς δείκτες, αλλά και δείκτες που σχετίζονται με διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου.

Εως σήμερα κανένα miRNA δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε διαγνωστικό επίπεδο, εφόσον θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μεγαλύτερης κλίμακας μελέτες πριν τη χρήση των μορίων αυτών σε κλινικό επίπεδο.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης είναι η ταυτοποίηση miRNAs που σχετίζονται με την πρόβλεψη και τον παθογενετικό μηχανισμό της Προεκλαμψίας μετά από μελέτη της έκφρασης τους σε

1. Υλικό βιοψίας πλακούντα κατά τον τοκετό,
2. Περιφερικό αίμα εγκύων το 1^ο τρίμηνο της κύησης που αργότερα (μετά την 20^η εβδομάδα κύησης), εμφάνισαν την επιπλοκή σε σχέση με εγκύους με φυσιολογική πορεία και έκβαση της κύησης. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση δειγμάτων περιφερικού αίματος από εγκύους με Προεκλαμψία όψιμης έναρξης η οποία αποτελεί ποσοστό 80% των περιστατικών με την επιπλοκή διεθνώς.

Η ταυτοποίηση της έκφρασης των miRNAs του πλακούντα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση miRNA μικροσυστοιχιών. Για την ανάλυση των δειγμάτων περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq. Και στις δύο περιπτώσεις ακολούθησε ανάλυση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων με προγράμματα βιοπληροφορικής, για την ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων, των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν και την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) (βιολογική διαδικασία, μοριακή λειτουργία και κυτταρική σύσταση). Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, η διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA που διαπιστώθηκε με τη χρήση των μικροσυστοιχιών και του συστήματος μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο qRT-PCR η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να:

- Εμπλουτίσουν την υπάρχουσα γνώση με δεδομένα που αφορούν τα miRNAs, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων διαταράσσονται στην Προεκλαμψία
- Συμβάλλουν στη δημιουργία νέων προβλεπτικών εργαλείων για πρόωμη, ακριβής και μη επεμβατική ανίχνευση εγκύων υψηλού κινδύνου
- Αποσαφηνίσουν τους παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εμφάνιση της επιπλοκής
- Οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπειών

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Υλικό της μελέτης

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν:

A. Υλικό βιοψίας πλακούντα από εγκύους κατά τον τοκετό που διαγνώστηκαν με Προεκλαμψία και από εγκύους στις 34⁺² - 38⁺⁵ εβδομάδες που δεν παρουσίασαν την επιπλοκή και γέννησαν νεογνά με φυσιολογικό βάρος για την ηλικία κύησης. Σε όλες τις περιπτώσεις η διάγνωση και ο τοκετός πραγματοποιήθηκαν στη Γ' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική ΕΚΠΑ.

B. Δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους στις 11⁺⁴ - 13⁺⁰ εβδομάδες κύησης, οι οποίες προσήλθαν στη Μονάδα Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Γ' Μαιευτικής - Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο πρώτου τριμήνου (screening) για ανίχνευση του κινδύνου χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο έμβρυο. Την ομάδα ελέγχου (controls) αποτέλεσαν, δείγματα περιφερικού αίματος γυναικών με νορμοτασικές κύσεις οι οποίες γέννησαν τελειόμηνα έμβρυα.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα υλικού βιοψίας πλακούντα ή περιφερικού αίματος από εγκύους με μονήρεις κύσεις που γέννησαν μετά από φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή νεογνά χωρίς εμφανή χρωμοσωμική ανωμαλία. Δείγματα από κύσεις μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν είχαν ελεύθερο ατομικό και οικογενειακό ιστορικό Προεκλαμψίας και δεν παρουσίαζαν οποιοδήποτε συστηματικό χρόνιο νόσημα (καρδιαγγειακή νόσο, νοσήματα κολλαγόνου, αυτοάνοσα νοσήματα, χρόνια υπέρταση, νεφρική νόσο κ.α.).

Ορισμός της επιπλοκής

Η διάγνωση της Προεκλαμψίας έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Task Force Hypertension in Pregnancy [16], με την παρουσία *de novo* υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης. Επί απουσίας πρωτεϊνουρίας, η διάγνωση βασίστηκε στην παρουσία υπέρτασης και συμπτωμάτων από άλλα συστήματα και όργανα.

Ως υπέρταση, ορίζεται η συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mm Hg και/ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mm Hg σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους. Η υπέρταση κρίνεται βαριά όταν η συστολική αρτηριακή πίεση είναι ≥ 160 mm Hg ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 110 mm Hg σε 2 διαφορετικές μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών μεταξύ τους.

Ως πρωτεϊνουρία ορίζεται η παρουσία ποσότητας πρωτεΐνης ≥ 300 mg σε δείγμα ούρων 24ώρου. Στο σοβαρό υπότυπο της Προεκλαμψίας οι πρωτεΐνες των ούρων έχουν συγκέντρωση ≥ 2 g σε αντίστοιχη μέτρηση 24ώρου [235].

Η διάγνωση της υπολειπόμενης ανάπτυξης του νεογνού (IUGR) γίνεται μέσω υπολογισμού του βάρους του εμβρύου με τη χρήση της υπολογιστικής φόρμας Hadlock (Astraia Software GmbH), όταν αυτό είναι μικρότερο της 10^{ης} εκατοστιαίας θέσης για την ηλικία κύησης [236]. Στις περιπτώσεις του όψιμου τύπου της επιπλοκής η διάγνωση γίνεται με βάση την αξιολογούμενη μείωση της ανάπτυξης η οποία εκφράζεται με σταθερά μη αυξανόμενες τιμές στο υπερηχογράφημα Doppler (static growth of abdominal velocity and abnormal placental Doppler's).

Διασφάλιση προσωπικών δεδομένων

Η πραγματοποίηση της μελέτης, η οποία είναι σύμφωνη με την τελευταία αναθεώρηση της Διακήρυξης του Helsinki, έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΠΓΝ «Αττικών» αρ. ΕΒΔ 474/30-10-14. Πριν τη λήψη του βιολογικού υλικού γινόταν λεπτομερής ενημέρωση όλων των γυναικών, συμπεριλαμβανομένων των γυναικών στην ομάδα ελέγχου, για το σκοπό της μελέτης και έδιναν εγγράφως τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους σε αυτήν.

Τα στοιχεία του ατομικού ιστορικού των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη, τα υπερηχογραφικά ευρήματα, οι βιοχημικές μετρήσεις και τα στοιχεία που αφορούν στην έκβαση της κύησης καταγράφηκαν σε Η/Υ μέσω του λογισμικού ταξινόμησης και αξιολόγησης Astraia Software (GMBH), μετά από τη σήμανση με ατομικό κωδικό. Με τον ίδιο κωδικό έγινε σήμανση των δειγμάτων υλικού βιοψίας πλακούντα και περιφερικού αίματος που αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Πρόσβαση στη βάση δεδομένων έχουν μόνο τα μέλη της ερευνητικής ομάδας, με σκοπό τη διαφύλαξη του απορρήτου των προσωπικών δεδομένων των γυναικών.

3.1 Συλλογή δειγμάτων υλικού βιοψίας πλακούντα

Κατά τον τοκετό πραγματοποιήθηκε συλλογή τμημάτων πλακουντιακών λαχνών μεγέθους 1x1x1 cm και βάρους 100mg από δυο διαφορετικά σημεία του πλακούντα, από το κεντρικό τμήμα της μητρικής πλευράς. Ακολούθησε καθαρισμός της περίσσειας αίματος με τη χρήση αποστειρωμένου απορροφητικού χαρτιού, επικάλυση με RNA σταθεροποιητικά μόρια (RNA later stabilization reagent) (Ambion, Austin, USA) και αποθήκευση των δειγμάτων σε σωληνάρια τύπου eppendorf στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Έγινε συλλογή υλικού βιοψίας πλακούντα από 24 εγκύους, 11 από αυτές διαγνώστηκαν με τον πρώιμο τύπο της επιπλοκής, 5 με Προεκλαμψία όψιμης έναρξης και 8 από εγκύους με νορμοτασικές κυήσεις (ομάδα ελέγχου). Οκτώ (8) από τα 16 δείγματα προήλθαν από εγκύους που κυοφορούσαν έμβρυο με υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR), 6 από αυτά στην ομάδα της πρώιμης Προεκλαμψίας και 2 στην ομάδα της όψιμης Προεκλαμψίας (Πίνακας 6).

Η συλλογή στοιχείων του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη έγινε από το ιατρικό αρχείο της Κλινικής.

Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων και νεογνών των δειγμάτων Προεκλαμψίας και της ομάδας ελέγχου							
	Ομάδα Ελέγχου (n=8)	EOPE** (n=11)	LOPE*** (n=5)	p-value ^a	p-value ^b	p-value ^c	p-value ^d
Ηλικία Μητέρας	35.7 (35-39)	35.1 (28-45)	28.4 (20-35)	0.051	0.820	0.036	0.055
*BMI (kg/m²)	29.2 (22.96-31.99)	29.9 (19.83-41.77)	28.6 (24.02-36.57)	0.942	0.835	0.867	0.778
Αρτηριακή Πίεση							
Συστολική (mmHg)	121 (118-122)	197.75 (160-250)	172.25 (152-197)	0.702	0.889	0.612	0.412
Διαστολική (mmHg)	75 (72-85)	113.5 (90-150)	107.75 (94-135)	0.966	0.962	0.923	0.798
Πρωτεϊνουρία (n)							
Ναι	0	10 (91%)	4 (80%)	0.0002			
Όχι	8 (100%)	1 (9%)	1 (20%)				
Υπολειπόμενη ανάπτυξη Εμβρύου	0	6 (54.5%)	2 (40%)				
Ηλ. Κύησης κατά τον τοκετό (εβδ.)	36.3 (34.2-38.5)	31.2 (28-33.5)	35.6 (34.4-37.3)	0.051	0.0003	0.29	0.78
Βάρος Νεογνού (g)	2792.6 (2215-3560)	1335 (1025-1540)	2454 (190-3020)	0.0003	0.0002	0.336	0.002
>10^η εκ. θέση (n)	8 (100%)	5 (45.4%)	3 (60%)				
<10^η εκ. θέση (n)	0	4 (36.4%)	1 (20%)				
<5^η εκ. θέση (n)	0	2 (18.2%)	1 (20%)				

*BMI: Δείκτης Σωματικού Βάρους **EOPE: Προεκλαμψία Πρώιμης Έναρξης *** LOPE: Προεκλαμψία Όψιμης Έναρξης

^a Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των ομάδων.

^b Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ Controls και EOPE.

^c Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ Controls και LOPE.

^d Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ EOPE και LOPE.

3.2 Συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος εγκύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2014 έως 2018, συλλέχθηκαν δείγματα από 2437 γυναίκες οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Γ΄ Μαιευτικής - Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΠΓΝ «Αττικών», για τον προγραμματισμένο πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο (screening) πρώτου τριμήνου (11⁺⁰ - 13⁺⁶ εβδομάδες κύησης), για την ανίχνευση του κινδύνου εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο έμβρυο.

Το screening περιλαμβάνει:

1. Λήψη και καταγραφή του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού των εγκύων,
2. Καταγραφή σωματομετρικών χαρακτηριστικών, μέτρηση του BMI με βάση το βάρος και το ύψος των εγκύων,
3. Υπερηχογραφικό έλεγχο: μέτρηση του κεφαλοουριαίου μήκους του εμβρύου (CRL) για τον ακριβή προσδιορισμό της ηλικίας κύησης, μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, έλεγχο παρουσίας ρινικού οστού και υπερηχογράφημα Doppler για τη μέτρηση της αντίστασης ροής του αίματος των μητριαίων αρτηριών (δείκτης παλμικότητας- UtA-PI) και
4. Αιμοληψία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοχημικών δεικτών (PAPP-A, β-hCG και PIGF).

Κατά την αιμοληψία, όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση, νεφρική λειτουργία και δεν έκαναν χρήση οποιασδήποτε φαρμακευτικής αγωγής.

Από κάθε γυναίκα συλλέχθηκαν μετά από φλεβοκέντηση 5 ml περιφερικού αίματος σε σωληνάκια με αντιπηκτικό EDTA (Becton Dickinson UK Ltd, Oxfordshire, United Kingdom). Το αίμα φυγοκεντρήθηκε δύο φορές στις 3500 rpm για 10 λεπτά στους 24°C για την απομόνωση του πλάσματος. Η φυγοκέντρηση έγινε σε διάστημα έως δυο ωρών από τη φλεβοκέντηση με στόχο τη μείωση του χρόνου δράσης των ριβονουκλεασών (RNAse) οι οποίες καταστρέφουν ή καταλύουν τη διάσπαση του RNA. Το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για τις βιοχημικές μετρήσεις των πρωτεϊνών (PAPP-A, β-hCG και PIGF) ενώ το πλεονάζων αποθηκεύτηκε στους -80°C σε νέα ειδικά σωληνάκια *RNA/DNA enzyme-free frozen* τύπου eppendorf χωρητικότητας 250μl (Thermo F, Foster City, CA, USA).

Μετά τον τοκετό τα στοιχεία που αφορούν στην έκβαση της κύησης και στην εμφάνιση ή όχι επιπλοκών συγκεντρώθηκαν είτε από το ηλεκτρονικό αρχείο της Κλινικής είτε μέσω τηλεφωνικής επικοινωνίας με τις ίδιες τις γυναίκες.

Για την ταυτοποίηση του προτύπου έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα της μητέρας, μελετήθηκαν 17 δείγματα από εγκύους στο πρώτο τρίμηνο της κύησης που αργότερα, μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης εμφάνισαν όψιμης έναρξης Προεκλαμψία και 17 από εγκύους με νορμοτασικές κύησεις. Τα κλινικά στοιχεία των εγκύων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων και νεογνών των δειγμάτων Προεκλαμψίας και της ομάδας ελέγχου

	LOPE** (n=17)	Ομάδα Ελέγχου (n=17)	p-value
Εβδομάδα κύησης κατά την αιμοληψία (εβδομάδες)	12.43 (11.80 - 14.14)	12.29 (11.43 - 13.00)	0.17
Ηλικία Μητέρας	31.81 (21.28 - 39.50)	33.19 (26.75,41.27)	0.09
BMI (kg/m2)*	27.10 (18.60 - 46.90)	22.60 (19.10 - 44.80)	0.30
Κάπνισμα			
<i>Ναι</i>	3 (17.6%)	6 (35.2%)	
<i>Όχι</i>	14 (82.4%)	11 (64.8%)	
Ηλικία κύησης κατά τον τοκετό (εβδ.)	36.40 (34.40 - 38.50)	39.80 (39.00 - 40.50)	0.00
Βάρος Νεογνού (gr)	2860.00 (2410.00 - 3280.00)	3445.00 (2950.00 - 30500.00)	0.50
Φύλο νεογνού			
<i>Αγόρι</i>	10 (59%)	9 (53%)	
<i>Κορίτσι</i>	7 (41%)	8 (47%)	

*BMI: Δείκτης Σωματικού Βάρους ** LOPE: Προεκλαμψία όψιμης μορφής

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Απομόνωση ολικού RNA και εμπλουτισμός σε miRNAs

Απομόνωση miRNAs από υλικό βιοψίας πλακούντα

Έγινε τεμαχισμός και ομογενοποίηση των τμημάτων πλακούντα με ομογενοποιητή (Kisker Scientific, Germany), με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol (Life Technologies, Foster City, CA), το οποίο αποτελεί μίγμα φαινόλης και θειοκυανίου γουανιδίνης σε μονοφασικό διάλυμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.500 rpm και αποθήκευση στους -80°C για 24 ώρες.

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα τμήματα του ομογενοποιημένου ιστού έγινε με την τεχνική απομόνωσης με βασικό αντιδραστήριο το TRIzol (Life Technologies, Foster City, CA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε καθαρισμός του ολικού RNA με DNase I - RNAfree (Ambion, Austin, USA) και εμπλουτισμός σε μικρά μόρια RNA (siRNAs, miRNAs etc) με το εμπορικά διαθέσιμο kit (mirVANA microRNA Isolation kit, Ambion, Austin, USA) για την απομόνωση RNA από κύτταρα ή ιστούς, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Απομόνωση miRNAs από το περιφερικό αίμα εγκύων

Για την απομόνωση ολικού miRNA από το πλάσμα εγκύων χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit miRCURY RNA Isolation kit (Exiqon, MA, USA) το οποίο ενδείκνυται για την απομόνωση μικρών μορίων RNA (<200 βάσεων) από βιολογικά υγρά, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ποσοτικοποίηση RNA

Η ποσοτικοποίηση του ολικού RNA και ο έλεγχος καθαρότητας έγινε με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop-1000 (ND-1000, NanoDrop Technologies, Houston, TX, USA). Ο λόγος καθαρότητας A260/A280 μεταξύ 1.7 και 2.0 κρίθηκε ικανοποιητικός. Η παρουσία επιμόλυνσης ελέγχθηκε με αντίδραση PCR σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη 2% (w/v) με χρώση Gelstar stain (BioWhittaker, Rockland, ME, USA) και UV. Η καθαρότητα και ακεραιότητα του RNA που απομονώθηκε από τον ιστό ήταν σημαντικοί παράγοντες για την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων. Για την αύξηση της καθαρότητας των δειγμάτων έγινε επαρκής διάσπαση και ομογενοποίηση του ιστού, απενεργοποίηση των ενεργών ριβονουκλεασών και καθαρισμός του RNA από DNA και πρωτεΐνες.

4.2 Ανίχνευση διαφορών έκφρασης των miRNAs σε εγκύους με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

4.2.1 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs του πλακούντα με miRNA μικροσυστοιχίες

Με τις μικροσυστοιχίες επιτυγχάνεται ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης χιλιάδων miRNAs στο βιολογικό δείγμα. Λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της τεχνικής, σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας απαιτούνται προσεκτικοί χειρισμοί με σκοπό τη μείωση του θορύβου και τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας των μετρήσεων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μικροσυστοιχίες miRLink v16 Bioarray 300054-169 3PK (Applied Biosystems, Foster City, CA) που περιέχουν 1211 miRNA ανιχνευτές (probes) για ολόκληρο το miRNAome και 85 αλληλουχίες ελέγχου (controls). Διαθέτουν 8 θέσεις δειγμάτων, στις οποίες κάθε miRNA βρίσκεται σε πολλές επαναλήψεις ώστε να υπάρχει δυνατότητα παράλληλης ανάλυσης 8 διαφορετικών δειγμάτων.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε:

Σήμανση των miRNA του πλακούντα με την Cy3 φωτοευαίσθητη φθορίζουσα χρωστική με το LabelIT miRNA labeling kit (Mirus, Bio LLC, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Αναστολή της σήμανσης (blocking) με τη χρήση του αντιδραστηρίου *stop reagent*, για μείωση του θορύβου.

Υβριδοποίηση σε miRNA μικροσυστοιχίες: Μετά την τοποθέτηση του δείγματος στη μικροσυστοιχία με τη χρήση του οδηγού θέσεων, πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση στους 37°C για 16 ώρες σε επωαστικό κλίβανο υπό ανάδευση σε 40 rpm. Σε αυτό το στάδιο σημαντικό ρόλο είχε η θερμοκρασία υβριδισμού με σκοπό τη μείωση της μη ειδικής υβριδοποίησης, ο όγκος του δείγματος ώστε να καλύπτει ομοιογενώς όλη την επιφάνεια της περιοχής των αλληλουχιών αναφοράς στη μικροσυστοιχία, ο χρόνος υβριδοποίησης και η υγρασία.

Έκπλυση των miRNA μικροσυστοιχιών για απομάκρυνση των αλληλουχιών που δεν υβριδοποιήθηκαν ή υβριδοποιήθηκαν μερικώς με τις αλληλουχίες αναφοράς. Πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση (80rpm), σε χαμηλό επίπεδο φωτισμού λόγω της φωτοευαισθησίας των μικροσυστοιχιών μετά την υβριδοποίηση. Σε αυτό το στάδιο σημαντικό ρόλο είχε η χαμηλή συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα έκπλυσης των πλακιδίων.

Η διαδικασία έκπλυσης πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα στάδια:

1. 2xSSC-0.1%SDS για 5 min στους 37°C

2. 1xSSC για 5 min στους 37°C
3. 0.1xSSC για 1 min στους 37°C
4. 0.1xSSC για 1 min στους 37°C

Σάρωση των μικροσυστοιχιών και λήψη ψηφιακής εικόνας με το σαρωτή Agilent Microarray Scanner G2565CA (Agilent, Santa Clara, CA) σε μήκος κύματος 532nm, διακριτική ικανότητα σάρωσης 10 μm, Tiff στα 16 bit και ρύθμιση στο 100% του φωτοπολλαπλασιαστή για το κόκκινο τμήμα χρωστικής.

Ο σαρωτής, μέσω της φωτεινής δέσμης κατάλληλου μήκους κύματος (532nm), διεγείρει τη φθορίζουσα χρωστική των υβριδοποιημένων αλληλουχιών και καταγράφει την ακτινοβολία που εκπέμπει η χρωστική. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύθηκε η ποσότητα των αλληλουχιών που υβριδοποιήθηκαν με τις αλληλουχίες αναφοράς. Ο σαρωτής αναπαράγει την εικόνα της υβριδοποιημένης μικροσυστοιχίας. Η ψηφιακή εικόνα απεικονίζει την ένταση του φθορισμού κάθε περιοχής της μικροσυστοιχίας σε pixel με τη μορφή TIFF (Tagged Image File Format). Οι ψηφιακές εικόνες της υβριδοποιημένης μικροσυστοιχίας αποθηκεύτηκαν σε H/Y.

Ανάλυση ψηφιακής εικόνας και κανονικοποίηση αποτελεσμάτων: Τα πρωτογενή δεδομένα από την ψηφιακή επεξεργασία των εικόνων επεξεργάστηκαν περαιτέρω με το λογισμικό Image 6.0 (Biodiscovery Inc., USA) για την εξαγωγή των τιμών κάθε θέσης υβριδισμού (σημείο υβριδισμού ή spot) και την αντιστοίχησή τους με γνωστά miRNAs. Ταυτόχρονα έγινε διόρθωση του θορύβου (background correction) με αφαίρεση της έντασης υποβάθρου (background intensity) από το αντίστοιχο σημείο υβριδισμού που προέκυψε από την ανάλυση κάθε spot (foreground intensity). Οι βασικές τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διόρθωση του θορύβου ήταν η μέση τιμή, η διάμεσος και η μέση απόκλιση μεταξύ των επιπέδων φθορισμού και υποβάθρου.

Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με το φίλτρο Signal to Noise Ratio (SNP), όπου απορρίφθηκαν τα miRNAs με σήμα φθορισμού μικρότερο από τον φθορισμό του υποβάθρου (SNP>1).

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του quantile αλγορίθμου (quantile normalization), με σκοπό τη μείωση των σφαλμάτων στο επίπεδο έκφρασης των υπό μελέτη miRNAs, που προέκυψαν από τη διαφορετική κατανομή έντασης σε κάθε μικροσυστοιχία.

Το σημαντικότερο στάδιο στην ανάλυση του επιπέδου της γονιδιακής έκφρασης ήταν η εξαγωγή των τιμών φθορισμού κάθε σημείου υβριδισμού, από το οποίο προέκυψαν οι πληροφορίες για τη διαφοροποιημένη ή μη έκφραση των miRNAs στα υπό μελέτη δείγματα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

4.2.2 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των ελεύθερων miRNAs (circulating miRNAs) πλάσματος εγκύων με τη χρήση του συστήματος μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq

Η διαδικασία της μελέτης του ολικού miRNA με το σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq, περιλαμβάνει την προετοιμασία του δείγματος, την κατασκευή βιβλιοθήκης, τον εμπλουτισμό του στόχου, την αντίδραση αλληλούχισης και την ανάλυση των δεδομένων.

Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης : Για τη δημιουργία της cDNA βιβλιοθήκης, έγινε σύνδεση των μορίων RNA κάθε δείγματος με ειδικούς RNA προσαρμοστές (adaptors) στο 3' και στο 5' άκρο τους με τη χρήση της T4 RNA λιγάσης (T4 RNA ligase). Οι προσαρμοστές αποτελούνται από αλληλουχίες συμπληρωματικές προς τους εκκινητές της αλληλούχισης.

Ακολούθησε σύνθεση και πολλαπλασιασμός του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση ειδικών RT εκκινητών (Illumina, San Diego, CA) με τη μέθοδο PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών και επιλογή των μορίων cDNA μήκους 130 με 150 βάσεις τα οποία αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες miRNA μήκους 15 - 35 βάσεων. Οι αλληλουχίες αυτές απομονώθηκαν και εμπλουτίστηκαν με κριτήριο το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε γέλη ακριλαμίδης 6% (Page gel).

Ποσοτικός έλεγχος της βιβλιοθήκης: Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος κάθε ολοκληρωμένης βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε σε αναλυτή Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit Agilent DNA 1000 chip (Agilent, Part # 5067 - 1504) το οποίο έχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιεί προϊόντα PCR.

Δημιουργία Clusters και Αλληλούχιση: Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα Illumina NextSeq 500 με το kit TruSeq SBS (#FC-402-4002, Illumina, San Diego, CA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε:

1. Αραίωση των δειγμάτων σε τελική συγκέντρωση 8pM και μετατροπή των δίκλωνων θραυσμάτων cDNA της βιβλιοθήκης σε μονόκλινα με τη χρήση NaOH 0.1M.
2. Καθορισμό των παραμέτρων αλληλούχισης.
3. Πρόσδεση των μονόκλωνων θραυσμάτων στην ειδική επιφάνεια Illumina flow cells η οποία περιλαμβάνει τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων με συμπληρωματικές αλυσίδες υβριδισμού με τους προσαρμογείς των θραυσμάτων cDNA.
4. Επιμηκόνιση των αλληλουχιών *in situ* και δημιουργία συμπλεγμάτων θραυσμάτων αλληλουχιών (κλωνικά συμπλέγματα - clusters) με τη χρήση του Illumina cBot TruSeq SR

cluster kit (#GD-402-4001, Illumina San Diego, CA). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως επιμήκυνση με μορφή γέφυρας (bridge amplification) γιατί κάθε θραύσμα πολλαπλασιάζεται ξεχωριστά έως ότου να δημιουργηθούν κλωνικά συμπλέγματα.

5. Αλληλούχιση των κλωνικών συμπλεγμάτων στην πλατφόρμα Illumina Next seq, με διαδικασία 51 κύκλων σύνθεσης DNA με ενσωμάτωση φθορίζουσων βάσεων (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια) σύμφωνα με την αρχική αλληλουχία DNA (αλληλουχία μήτρα DNA). Κατά τη διαδικασία αυτή κάθε νουκλεοτίδιο αναγνωρίστηκε ως μεμονωμένη βάση από τον φθορισμό που εκπέμπει κατά την ενσωμάτωση στην αλληλουχία (τεχνολογία αντιστρεπτού τερματισμού). Κατά συνέπεια πραγματοποιήθηκε επέκταση όλων των θραυσμάτων με παράλληλο τρόπο και παράλληλη παραγωγή αντίστοιχων αναγνώσεων (reads) που αποτέλεσαν τα αρχικά δεδομένα (raw data) της αλληλούχισης.

Ανάλυση των δεδομένων των αλληλουχιών και κανονικοποίηση αποτελεσμάτων: Ο τεράστιος όγκος των δεδομένων αναλύθηκε με υπολογιστικούς αλγορίθμους, για τη μετατροπή των raw data σε βασικές πληροφορίες. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση της έκφρασης των miRNAs και στη σύγκριση των επιπέδων έκφρασής μεταξύ των δειγμάτων περιφερικού αίματος από εγκύους με Προεκλαμψία όψιμης έναρξης και δειγμάτων από εγκύους χωρίς την επιπλοκή.

Στην πρωτογενή ανάλυση έγινε συλλογή, αποθήκευση και ανάλυση των δεδομένων. Τα raw data από την ένταση του φθορισμού μετατράπηκαν μέσω υπολογιστικών μεθόδων σε βασική πληροφορία για τη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Στο δεύτερο στάδιο της ανάλυσης (secondary analysis), πραγματοποιήθηκε στοίχιση και χαρτογράφηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που διαβάστηκαν από τον ανιχνευτή ως αναγνώσεις (reads). Έγινε επίσης ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών και αφαίρεση του θορύβου σε πραγματικό χρόνο από το Illumina NextSeq μέσω του Solexa CHASTITY quality filter. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω στην ανάλυση (clean reads) καταγράφηκαν σε FASTQ μορφή η οποία περιλαμβάνει τις βασικές πληροφορίες για τα miRNAs όπως η αλληλουχία και ο βαθμός ποιοτικού ελέγχου (Εικόνα 10A). Τα δεδομένα σε μορφή FASTQ χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ποιότητας και ακρίβειας της αναγνώρισης βάσεων (base calling), σύμφωνα με τον αλγόριθμο Phred ή Q score ($Q = -10 \log_{10} P$). Ο ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο υπολογιστικό πρόγραμμα FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Εικόνα 10B).


```

Raw Data (51bp)
Sample_sequence.fastq (FASTQ format)
@NB501664:6:HLNK5BGXY:1:11101:20532:1050 1:N:0:GGCTAC
AAATGNATTTTTGGAGCAGGGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAG
+
/AAAA#EEEEEEEE/EEEEEEEEEEEE//AEEEEEEEEE<EEEEEEA
@NB501664:6:HLNK5BGXY:1:11101:19232:1050 1:N:0:GGCTAC
TTTCNGCTCGCGGGGTGTGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAG
+
A. AAAAA#AAEE/EEAAAAEEEEEEEEEEEE/E//EEEE<EEEEEEEE/
                                     >2-YD_0_x523569
                                     TGGAAAGACTAGTGATTTTGTGTGTT
                                     >2-YD_1_x464471
                                     TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG
                                     >2-YD_2_x421036
                                     TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA
                                     >2-YD_3_x401815
                                     TCAGTGCACACTACAGAACCTTTGT
                                     >2-YD_4_x341519
                                     AACCCGTAGATCCGATCTTGT
B.

```

Εικόνα 10: Αντιπροσωπευτική εικόνα των δεδομένων των αναγνώσεων σε μορφή FASTQ με το Solexa CHASTITY quality filter: (A) Αρχικές αναγνώσεις μετά τον ποιοτικό έλεγχο (clean reads), (B) Αναγνώσεις μετά την αποκοπή των ανεπιθύμητων αλληλουχιών (trimmed reads).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση των αλληλουχιών μήκους περίπου 15 βάσεων του αντάπτορα που είναι τοποθετημένος στο 3' άκρο, με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος FASTX-toolkit (Trimmer and Clipper). Οι αναγνώσεις μετά την αποκοπή των ανεπιθύμητων αλληλουχιών (trimmed reads) καταγράφηκαν επίσης σε μορφή FASTQ. Οι αλληλουχίες είχαν μήκος περίπου 15 - 25 βάσεις, αλληλουχίες με μικρότερο μήκος απορρίφθηκαν σε αυτό το στάδιο.

Τα trimmed reads που καλύψαν τις προϋποθέσεις του ποιοτικού ελέγχου, συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες του γονιδιώματος αναφοράς από τη βάση δεδομένων miRBase v.21 (www.mirbase.org), με τη χρήση του Novoalign λογισμικού το οποίο επιτρέπει μόνο την αναντιστοιχία έως ένα νουκλεοτιδίου σε κάθε αλληλουχία. Στο στάδιο αυτό αποκλείστηκαν αλληλουχίες που προήλθαν από λάθος στοίχιση. Τα δεδομένα έπειτα αποθηκεύτηκαν σε μορφή Sequence Alignment Map (SAM) (Εικόνα 11).

Ακολούθησε στοίχιση των αλληλουχιών ανάλογα με τη χρωμοσωμική θέση και το αρχείο μετατράπηκε σε μορφή binary Alignment Map (BAM). Με αυτό τον τρόπο αυξήθηκε η ειδικότητα των αλληλουχιών, μειώθηκαν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω της απομάκρυνσης των πολλαπλών αντιγράφων που είχαν δημιουργηθεί από την αντίδραση της PCR κατά τη δημιουργία της βιβλιοθήκης.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση και ανίχνευση των παραλλαγών της αλληλουχίας στα υπό μελέτη δείγματα σε σχέση με τις αλληλουχίες του γονιδιώματος αναφοράς (variant calling). Σε αυτό το στάδιο με τη χρήση της βάσης δεδομένων miRDeep2 [237] ανιχνεύθηκαν miRNAs για τα οποία δεν υπάρχουν έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα (novel miRNAs).

SampleName	TagID	TagCount	TagSequence	TagLength	AlignmentSequence	AlignmentLength
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_1_x451969	451969	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_1_x451969	451969	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_1_x451969	451969	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	21
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_2_x305573	305573	AAACCGTTACCATTACTGAGTT	22	AAACCGTTACCATTACTGAGTT	22
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_3_x229212	229212	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	22	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	22
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_3_x229212	229212	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	22	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	22
AcTIA-bld10	AcTIA-bld10_4_x206035	206035	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	22	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	22

AlignmentStatus	premiRNAName	Left	Right	AlignmentInformation	Mismatch	Insert	Delete	Strand
R	hsa-let-7a-1	11	31					F
R	hsa-let-7a-2	10	30					F
R	hsa-let-7a-3	9	29					F
R	hsa-mir-451	22	43					F
R	hsa-let-7f-2	13	34					F
R	hsa-let-7f-1	12	33					F
R	hsa-let-7a-2	10	31					F

Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτική εικόνα των δεδομένων από τη στοίχιση και τη σύγκριση των αλληλουχιών σε μορφή Sequence Alignment Map (SAM).

Στο τρίτο στάδιο της ανάλυσης, μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών με την αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος, υπολογίστηκε ο αριθμός εμφάνισης κάθε αλληλουχίας miRNA σε κάθε δείγμα (total counts/ tag counts of miRNAs).

Ακολούθησε η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και η μέτρηση των μεταγράφων ανά εκατομμύριο συνολικών στοιχισμένων miRNA αναγνώσεων (tags per million of aligned miRNAs - TPM) [238]. Σε αυτό το στάδιο, οι αλληλουχίες miRNAs που διαβάστηκαν σε λιγότερο από δυο αναγνώσεις αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων σε σχέση με την προέλευση, τη μοναδικότητα και τη λειτουργικότητα του κάθε miRNA. Πραγματοποιήθηκε σύνδεση της αλληλουχίας με τις βασικές βιβλιογραφικές πληροφορίες όπως η θέση στο γονιδίωμα, το γονίδιο και η περιοχή του γονιδίου που εδράζεται.

4.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Το σύστημα προσομοίωσης MATLAB® (The Mathworks, Inc., Natick, MA) εφαρμόστηκε για την πολυπαραγοντική ανάλυση μέσω της παράλληλης εισαγωγής δεδομένων από τα εργαστηριακά ευρήματα και τα κλινικά χαρακτηριστικά της Προεκλαμψίας [239].

Η σχετική έκφραση μελετήθηκε ως ο λόγος του \log_2 Ratio του επιπέδου έκφρασης του υπό μελέτη miRNA σε σχέση με το μέσο επίπεδο έκφρασης όλων των δειγμάτων ελέγχου. Οι τελικές τιμές έκφρασης κάθε miRNA, υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή όλων των επαναλήψεων του συγκεκριμένου miRNA σε κάθε δείγμα.

Η σύγκριση των μεταβλητών μεταξύ των δύο ομάδων (δείγματα Προεκλαμψίας και δείγματα ελέγχου) έγινε με τη χρήση του Student t-test (για τις ποσοτικές μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή), του Mann-Whitney U test (για τις ποσοτικές μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή), του Chi-square test και του Fisher's exact test (για τις ποιοτικές μεταβλητές). Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως η μέση τιμή \pm της τυπικής απόκλισης και με τον τρόπο αυτό απεικονίστηκαν και στα γραφήματα της μελέτης. Ως στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε η πιθανότητα στατιστικού σφάλματος τύπου I $p \text{ value} < 0.05$ και το False Discovery Rate (FDR) ≤ 0.05 .

Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (binary logistic regression model) πραγματοποιήθηκε στην προσπάθεια να προβλεφθεί η ύπαρξη της Προεκλαμψίας από μια σειρά από ανεξάρτητες μεταβλητές.

Το τεστ Krustal-Wallis χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τιμών έκφρασης των miRNAs με τα κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων και τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης τους. Η μέθοδος πολλαπλής σύγκρισης Bonferoni correction χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των p -values με σκοπό τη μείωση των πιθανώς ψευδώς θετικών (false-positive) αποτελεσμάτων (σφάλματα τύπου I), τα οποία μπορούσαν να προληφθούν μέσω των πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη στο σύνολο των δεδομένων. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.02$.

Η ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (Receiver Operating Characteristics - ROC) πραγματοποιήθηκε με το σύστημα προσομοίωσης MATLAB® (The Mathworks, Inc., Natick, MA), για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ικανότητας των miRNA με διαφοροποιημένη έκφραση για τον κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής (με 95% Standard Error - SE και 95% Confidence Intervals - CI). Οι ROC καμπύλες αξιολογήθηκαν ως σημαντικές όταν η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη ήταν μεγαλύτερη από 0.8 (Area Under the Curve, AUC > 0.8) με στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$.

Ιεραρχική ομαδοποίηση (Hierarchical Clustering - HCL) και K-Means Clustering

Στην ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης παρόμοια πρότυπα ομαδοποιήθηκαν και αποτέλεσαν έναν κλάδο από ένα ιεραρχικό δέντρο. Ανάλογα με το βαθμό ομοιότητας των κλάδων σχηματίστηκε το μέγεθος του ιεραρχικού δενδρογράμματος.

Η ανάλυση K-Means clustering πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός αλγορίθμου (unsupervised) για την ταξινόμηση των ομάδων γονιδίων με βάση το πρότυπο έκφρασης τους. Η ομαδοποίηση αυτή συσχέτισε τα γονίδια βάσει της κοινής συμπεριφοράς τους μέσω των επιπέδων έκφρασης τους.

Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology)

Τα RNA γονίδια στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ταυτοποιήθηκαν *in silico* με τη χρήση των αλγορίθμων TargetScan v.7.0 [165], DIANA [240-242], miROB (<http://mirob.interactome.ru/>), PicTar και Miranda.

Για την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology - GO) χρησιμοποιήθηκε το Webgestalt web-tool [243]. Η ανάλυση αποτελεί μέθοδο πρόβλεψης της λειτουργίας των γονιδίων μέσω λειτουργικών πληροφοριών από καλά χαρακτηρισμένα γονιδιώματα σε άλλα μερικώς μελετημένα. Οι τρεις οντολογίες της GO ανάλυσης - βιολογική διαδικασία, μοριακή λειτουργία και κυτταρική σύσταση - αποτελούνται από καλά μελετημένες ομάδες ορθόλογων γονιδίων. Κάθε δίκτυο αντιμετωπίζεται ανεξάρτητα στην GO ανάλυση, χωρίς να καθορίζεται καμία οντολογική σχέση μεταξύ τους.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία μελετήθηκαν με τη χρήση της βάσης δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος GOmiR για τον περισσότερο εμπειριστατωμένο λειτουργικό συσχετισμό των υπό μελέτη miRNAs και της συμμετοχής τους σε σηματοδοτικές οδούς (pathways analysis) [244]. Σε όλες τις αναλύσεις τιμές $p < 0.05$ κρίθηκαν ως στατιστικώς σημαντικές.

4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (qRT-PCR)

Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, η διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA που διαπιστώθηκε με τη χρήση μικροσυστοιχιών και συστημάτων μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Quantitative Reverse Transcription PCR - qRT-PCR) η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών.

Στην παρούσα μελέτη, με τη χρήση της qRT-PCR ελέγχθηκε το επίπεδο έκφρασης του miR-518a-5p/miR-527 σε 24 δείγματα υλικού βιοψίας πλακούντα και το επίπεδο έκφρασης του miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-99b και miR-23b σε 34 δείγματα πλάσματος εγκύων (Προεκλαμψία και δείγματα ελέγχου).

Η μεταβολή της συγκέντρωσης των προϊόντων PCR εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στο υπό μελέτη δείγμα. Για το λόγο αυτό απαιτήθηκε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με ενδογενές γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene), το οποίο παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε διαφορετικά δείγματα. Ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το RNU44 (Applied Biosystem, Inc., USA).

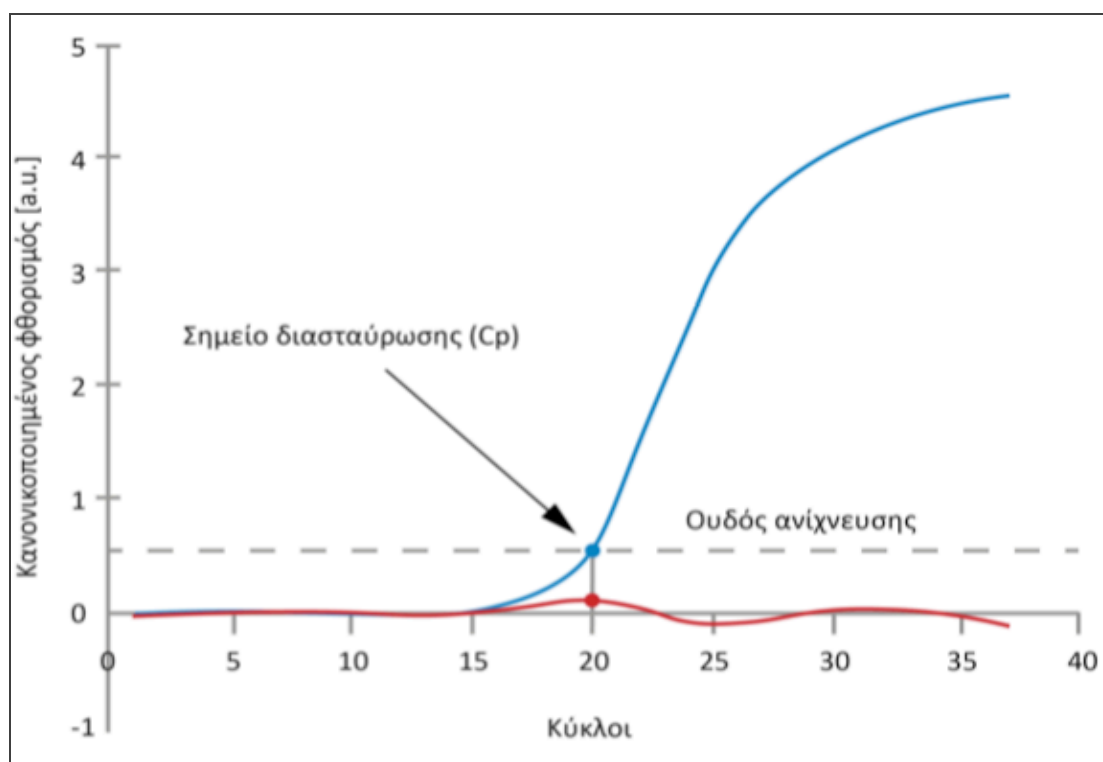
Η διαδικασία περιλάμβανε τη σύνθεση συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας (complementary DNA) με εκμαγείο την υπό μελέτη αλληλουχία RNA. Το cDNA δημιουργήθηκε από το ολικό miRNA με τη διαδικασία TaqMan αντίστροφης μεταγραφής με το εμπορικά διαθέσιμο kit TaqMan Micro-RNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Inc., USA) και το TaqMan Universal Master Mix με εκκινητές και ανιχνευτές (probes) για τα miR-518a-5p/miR-527, miR-99b, miR-23b, miR-525-5p και miR-548e-3p (PN4427975, Applied Biosystem, Inc., USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή μέσω πολύπλοκου συστήματος κατόπτρων και φίλτρων που κωδικοποιούν το φθορισμό που εκπέμπεται συνεχώς καθώς η φθορίζουσα χρωστική ενσωματώνεται στις αλληλουχίες της PCR. Ο πολλαπλασιασμός της υπό μελέτης αλληλουχίας παρουσίασε γραμμική συσχέτιση με το φθορισμό που ανιχνεύθηκε από το θερμικό κυκλοποιητή. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης PCR. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε σε μια αντίδραση θερμοκρασίας 60°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια υπό υψηλή θερμοκρασία (95°C) πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του δίκλωνου RNA:cDNA.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν με σκοπό να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα στο θερμικό κυκλοποιητή - αναλυτή LC480 LightCycler System (Roche GmbH,

Switzerland). Ο πολλαπλασιασμός κάθε αλληλουχίας μετρήθηκε πριν από τον 40^ο κύκλο, ο οποίος θεωρήθηκε ως οριακός κύκλος για τον πολλαπλασιασμό.

Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση τις τιμές ποσοτικοποίησης (C_p) που αντιστοιχούν στον κύκλο της αντίδρασης (C_t) κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού που προκύπτει από τα προϊόντα PCR υπερβαίνει την ουδό ανίχνευσης (Εικόνα 12). Τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου στο σημείο αυτό υπολογίστηκαν από πρότυπη καμπύλη. Η σχετική ποσοτικοποίηση των miRNAs υπολογίστηκε με τη χρήση μεθόδου 2- $\Delta\Delta C_t$. Η τιμή ΔC_t προσδιορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ των τιμών C_t στο υπό μελέτη miRNA και το miRNA αναφοράς για κάθε δείγμα ($\Delta C_t = C_t$ miRNA στόχος - C_t miRNA αναφοράς). Η τιμή $\Delta\Delta C_t$ προσδιορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ των τιμών ΔC_t στο παθολογικό δείγμα και την ομάδα ελέγχου ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ παθολογικού δείγματος - ΔC_t ομάδας ελέγχου). Κατά την ποσοτικοποίηση ισχύει ότι στα δείγματα που η υπό μελέτη αλληλουχία ανιχνεύεται σε πολλά αντίγραφα έχουν μικρότερη τιμή C_t εφόσον απαιτούνται λιγότεροι κύκλοι πολλαπλασιασμού έως ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το όριο ανίχνευσης.



Εικόνα 12: Καμπύλη αντίδρασης qRT-PCR. Ο άξονας x δείχνει τον αριθμό των κύκλων και ο άξονας y το φθορισμό που προκύπτει από τα προϊόντα της PCR. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το βασικό επίπεδο και το σημείο Cp (Crossing point), το οποίο είναι ο κύκλος στον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης, ο κύκλος αυτός ονομάζεται C_t . Με βάση την τιμή αυτή πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση του δείγματος.

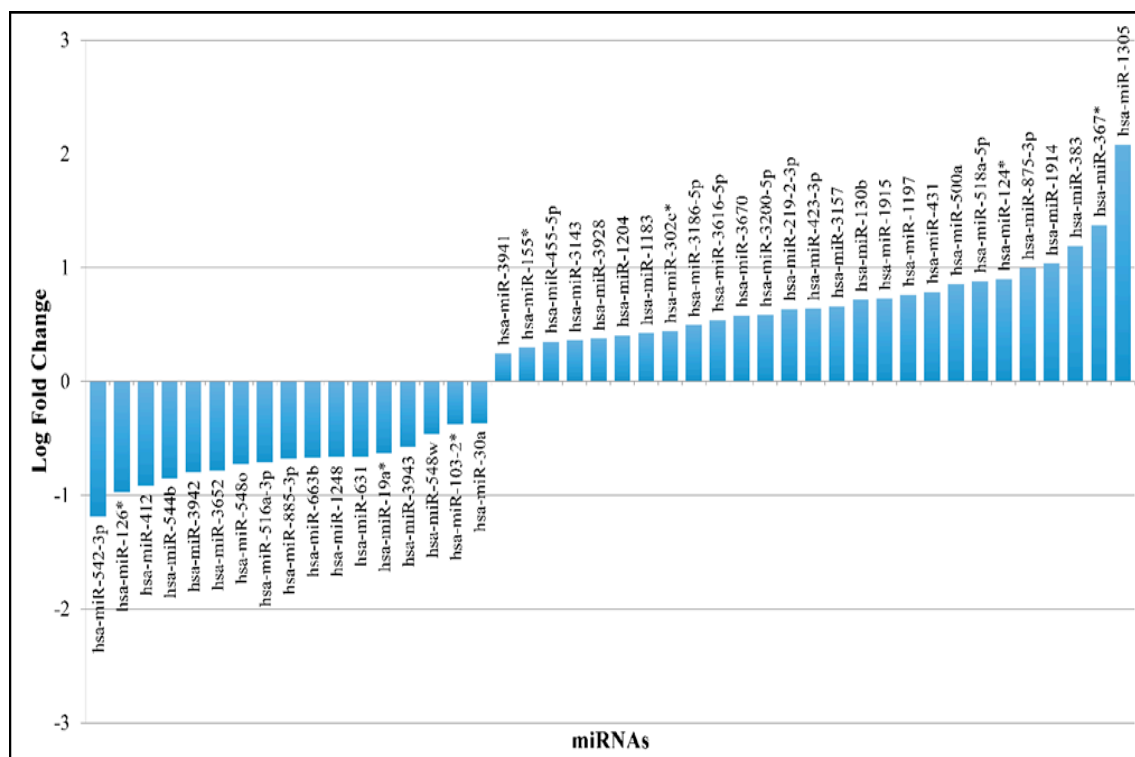
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Πρότυπο έκφρασης των miRNAs του πλακούντα σε εγκύους με Προεκλαμψία και εγκύους χωρίς την επιπλοκή με τη μέθοδο των RNA μικροσυστοιχιών

Με RNA μικροσυστοιχίες (miRLink v16 Bioarray 300054-169 3PK Applied MicroArrays) μελετήθηκαν 16 δείγματα υλικού βιοψίας πλακούντα από κυήσεις με Προεκλαμψία και 8 από κυήσεις χωρίς την επιπλοκή. Η πλατφόρμα μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιήθηκε καθώς και τα αποτελέσματα (raw data) έχουν αναρτηθεί στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), με κωδικούς GPL23980 και GSE103542, αντίστοιχα.

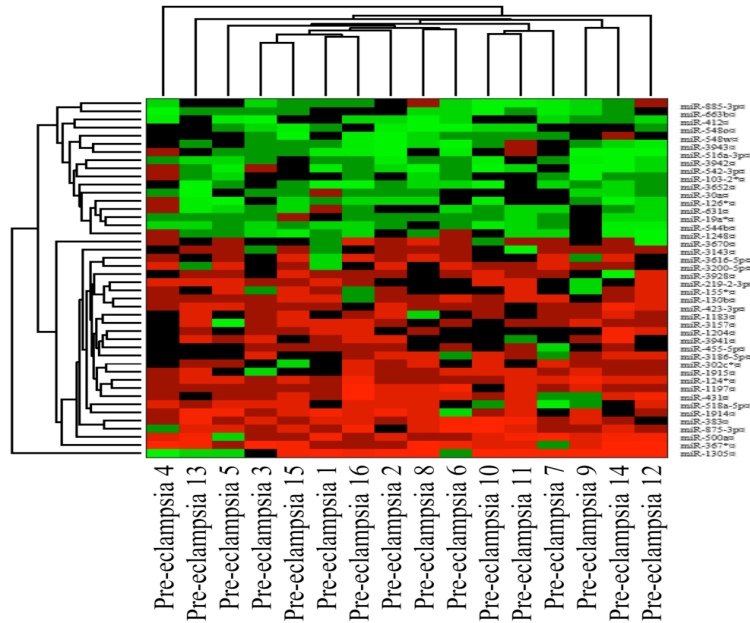
5.1.1 Διαφορές στο επίπεδο έκφρασης των miRNAs του πλακούντα σε κυήσεις με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs του πλακούντα σε κυήσεις με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου οδήγησε στην ταυτοποίηση 44 miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση, $p < 0.05$, $FDR < 0.05$ και $FC > 2$ (περίπου διπλάσια διαφορά στην έκφραση) μεταξύ των δύο ομάδων. Είκοσι επτά (27) miRNAs (61.4%) παρουσίασαν αυξημένη έκφραση και 17 microRNAs (38.6%) μειωμένη έκφραση στην Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 13).

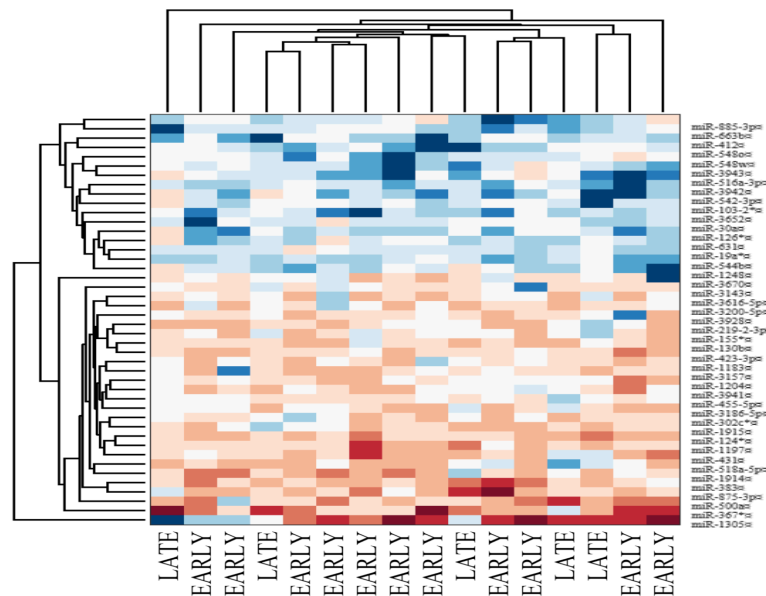


Εικόνα 13: MiRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση από την ανάλυση υλικού βιοψίας πλακούντα από γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$ και $FDR \leq 0.05$).

Η ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης (Hierarchical clustering-HCL) σε heat map διάγραμμα δεν έδειξε δυνατότητα διαχωρισμού των δύο ομάδων (Εικόνα 14). Ομοίως, δεν διαπιστώθηκε δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ του πρώιμου και όψιμου υπότυπου της επιπλοκής πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις δυο ομάδες (Εικόνα 15).



Εικόνα 14: Ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται τα υπο μελέτη δείγματα και στον οριζόντιο άξονα τα miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία. Με δενδρόγραμμα στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων και αριστερά η ομαδοποίηση των miRNAs.



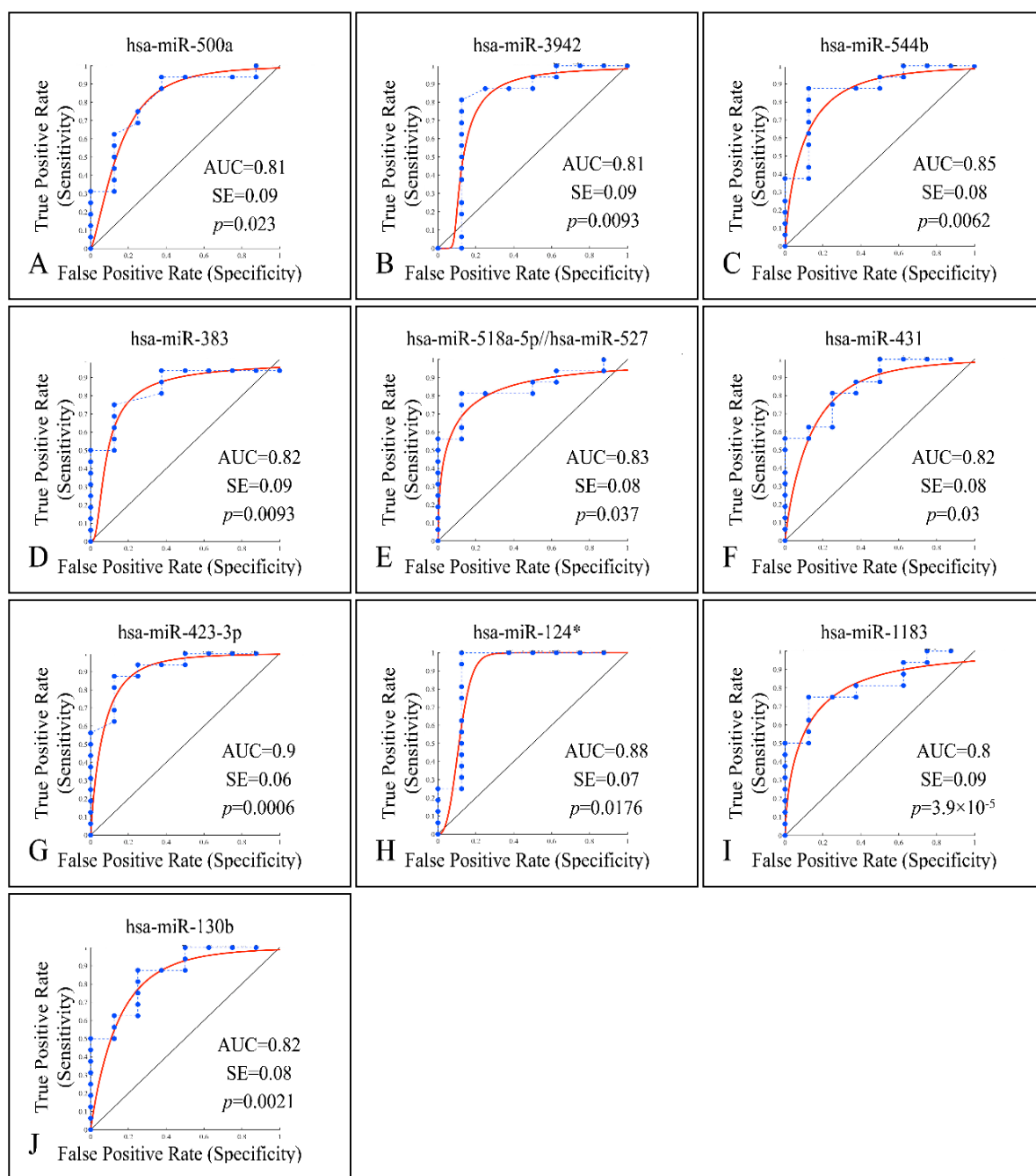
Εικόνα 15: Ιεραρχική ανάλυση ομαδοποίησης των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία ανάλογα με τον υπότυπο της επιπλοκής. Στον κάθετο

άξονα παρουσιάζονται τα δείγματα από εγκύους με τον πρώιμης έναρξης και όψιμης έναρξης υπότυπο της επιπλοκής και στον οριζόντιο άξονα τα miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία. Με δένδρογραμμα στο πάνω μέρος παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων και αριστερά η ομαδοποίηση των miRNAs.

5.1.2 Ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC curve analysis)

Η αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των miRNAs έγινε με τη χρήση της καμπύλης ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) με δείκτη αξιολόγησης της ακρίβειας το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the curve - AUC). Το εμβαδόν αυτό παίρνει τιμές $0.5 < AUC < 1.0$.

Στην παρούσα μελέτη, οι καμπύλες ROC έδωσαν τις παρακάτω τιμές: miR-500a (AUC=0.8, $p=0.023$), miR-3942 (AUC=0.8, $p=0.0093$), miR-544b (AUC=0.84, $p=0.0062$), miR-383 (AUC \approx 0.82, $p=0.0093$), miR-518a-5p/miR-527 (AUC=0.83, $p=0.037$), miR-431 (AUC=0.82, $p=0.03$), miR-423-3p (AUC \approx 0.90, $p=0.0006$), miR-124* (AUC=0.88, $p=0.0176$), miR-1183 (AUC=0.80, $p=3,9 \times 10^{-5}$) και miR-130b (AUC=0.82, $p=0.0021$) και κατά συνέπεια εμφάνισαν σημαντική διαγνωστική χρησιμότητα για την Προεκλαμψία (Εικόνα 16). Τα miR-423-3p και miR-124* παρουσίασαν ελαφρώς ισχυρότερη αξία ως βιοδείκτες. Επομένως, τα δυο μόρια θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως διαφοροδιαγνωστικοί δείκτες για την επιπλοκή.

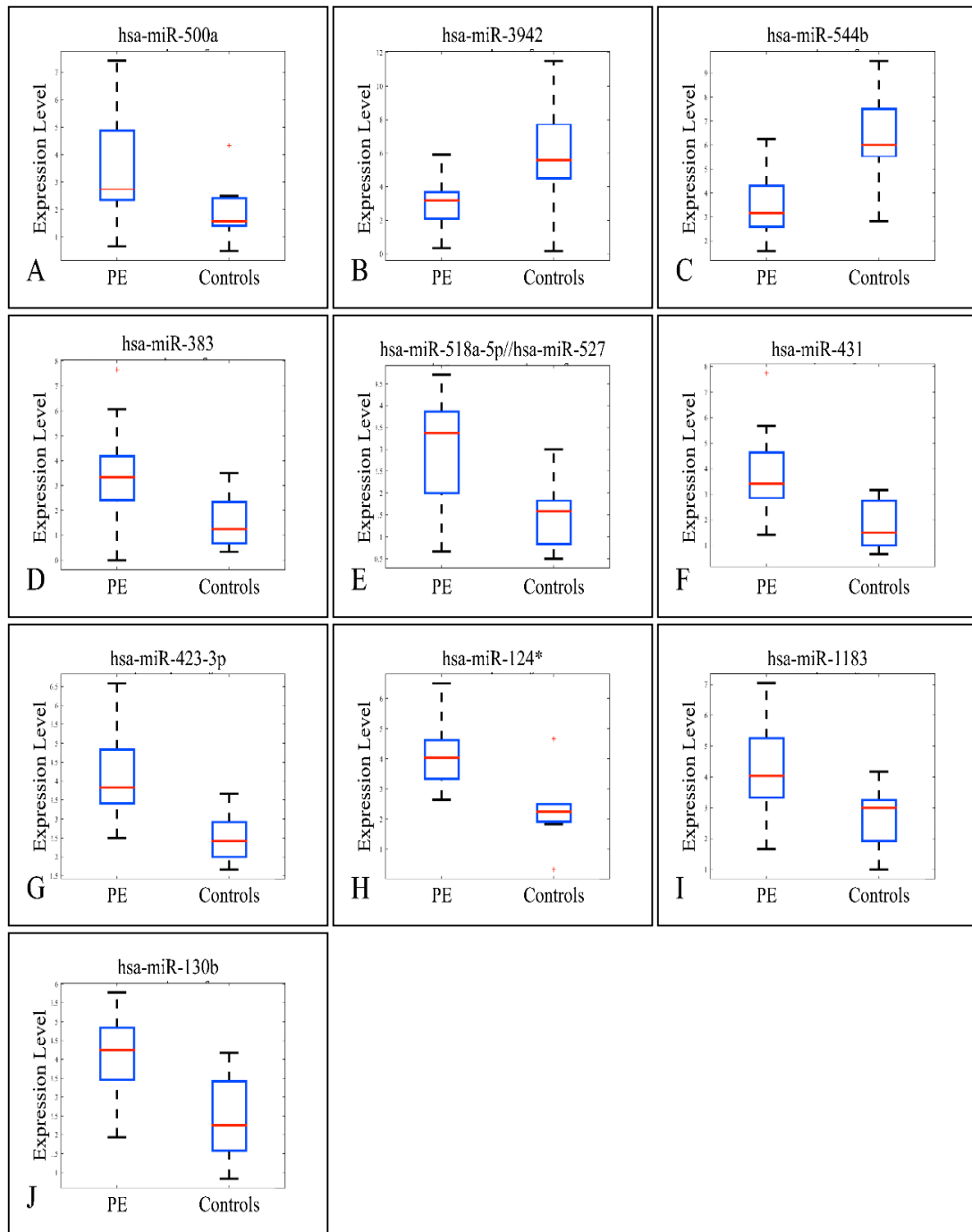


Εικόνα 16: Καμπύλη ανάλυσης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC) για τη διερεύνηση της διαγνωστικής αξίας των miRNAs με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης σε υλικό βιοψίας πλακούντα από Προεκλαμψία σε σύγκριση με δείγματα από την ομάδα ελέγχου. Στον κάθετο άξονα της καμπύλης παριστάνεται η ευαισθησία (%) και στον οριζόντιο άξονα η ειδικότητα (%). Σημειώνεται η θέση της διαγωνίου που αντιπροσωπεύει τη μηδενική διαγνωστική αξία. **A.** miR-500a (AUC=0.8), **B.** miR-3942 (AUC=0.8), **C.** miR-544b (AUC=0.84), **D.** miR-383 (AUC≈0.82), **E.** miR-518a-5p/miR-527 (AUC=0.83), **F.** miR-431 (AUC=0.82), **G.** miR-423-3p (AUC≈0.90), **H.** miR-124* (AUC=0.88), **I.** miR-1183 (AUC=0.80) και **J.** miR-130b.

5.1.3 Περιγραφική στατιστική ανάλυση: Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία με τα κλινικά στοιχεία (subgroup exploratory analysis)

Η μελέτη της έκφρασης των miRNAs έγινε με περιγραφική στατιστική ανάλυση των συνεχών μεταβλητών στις οποίες περιλαμβάνονται η ηλικία κύησης κατά την εμφάνιση των συμπτωμάτων (Προεκλαμψία πρώιμης ή όψιμης έναρξης), η παρουσία πρωτεϊνουρίας και η ύπαρξη υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου (IUGR). Η ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση του μη παραμετρικού ελέγχου U των Mann-Whitney (Mann-Whitney U test). Ακολούθησε απεικόνιση της κατανομής της έκφρασης των υπο μελέτη miRNAs με θηκογράμματα (box plots).

Η αξιολόγηση των θηκογραμμάτων έγινε με κριτήριο *p*-value, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Οκτώ miRNAs, τα miR-500a, miR-383, miR-518a-5p/miR-527, miR-431, miR-423-3p, miR-124*, miR-1183 και miR-130b διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζονται στον πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία. Ομοίως, τα miR-3942 και miR-544b παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη έκφραση (Εικόνα 17).



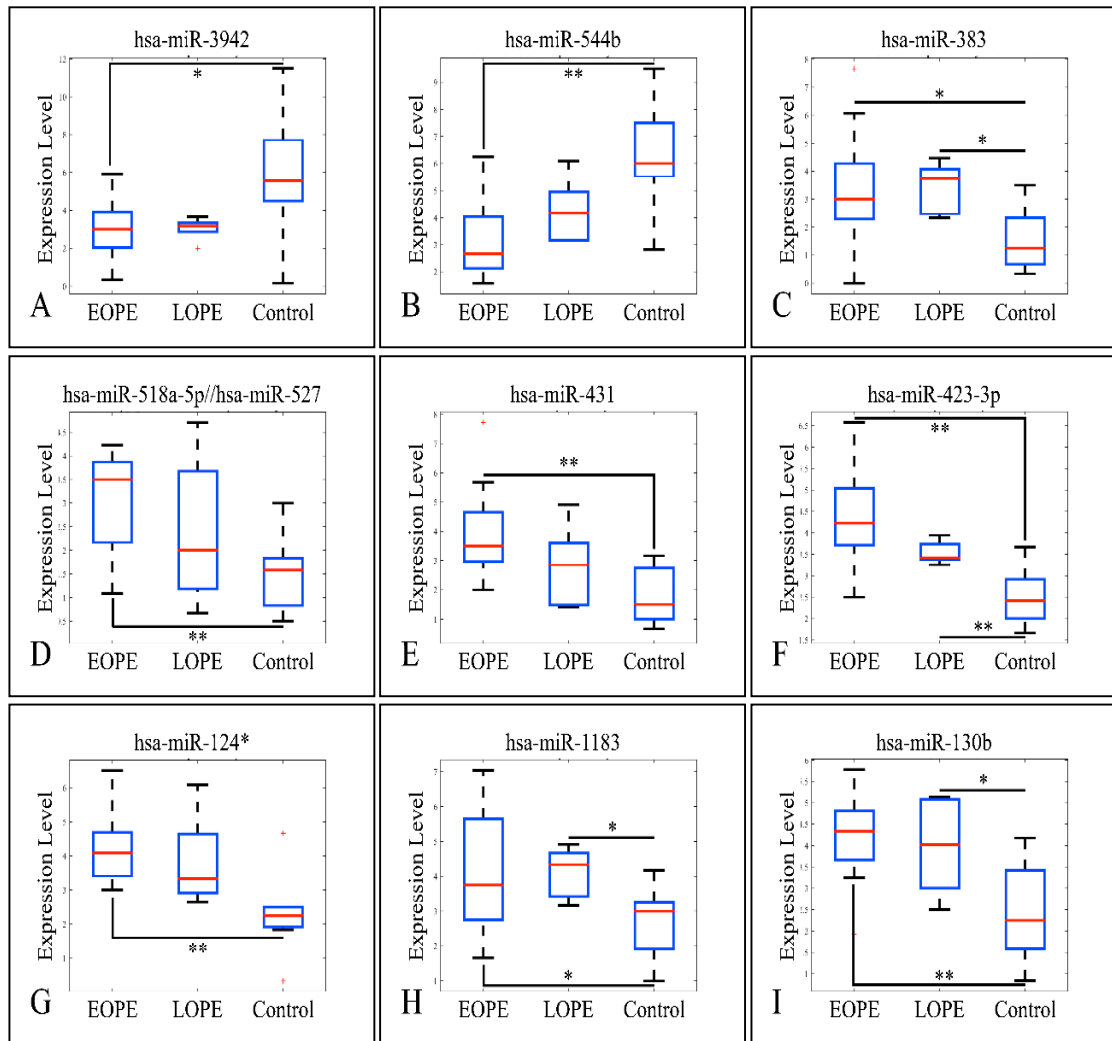
Εικόνα 17: Τα miRNAs με στατιστικώς σημαντική διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα από εγκύους με Προεκλαμψία σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Τα miR-500a (A), miR-383 (D), miR-518a-5p/miR-527 (E), miR-431 (F), miR-423-3p (G), miR-124* (H), miR-1183 (I) και miR-130b (J) βρέθηκαν να υπερεκφράζονται. Τα miR-3942 (B) και miR-544b (C) βρέθηκαν να υποεκφράζονται.

Επίπεδο έκφρασης miRNA: \log_2 , $p < 0.05$; PE: δείγματα Προεκλαμψίας, CONTROL: ομάδα ελέγχου

A. Αξιολόγηση miRNAs ως προς τη δυνατότητα διαχωρισμού του πρώιμου και του όψιμου υπότυπου της Προεκλαμψίας

Ταυτοποιήθηκαν 9 miRNAs με σημαντική συσχέτιση με την εβδομάδα κύησης κατά την έναρξη των συμπτωμάτων της επιπλοκής (Εικόνα 18). Τα miR-431 ($p=0.003$), miR-518a-5p/miR-527 ($p=0.002$) και miR-124* ($p=0.001$) παρουσιάζουν σημαντική υπερέκφραση στο υλικό βιοψίας πλακούντα από κυήσεις με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως το miR-544b ($p=0.001$) παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη έκφραση και το miR-3942 ($p=0.02$) οριακή υποέκφραση στην ίδια ομάδα.

Τα miR-130b και miR-423-3p, με p values 0.004 και 0.001, αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ότι εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη έκφραση στους πλακούντες εγκύων με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ το miR-383 είχε οριακά αυξημένη έκφραση στους πλακούντες εγκύων με πρώιμη έναρξη Προεκλαμψία ($p=0.02$) και σημαντική υπερέκφραση στην ομάδα της Προεκλαμψίας όψιμης έναρξης ($p=0.01$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

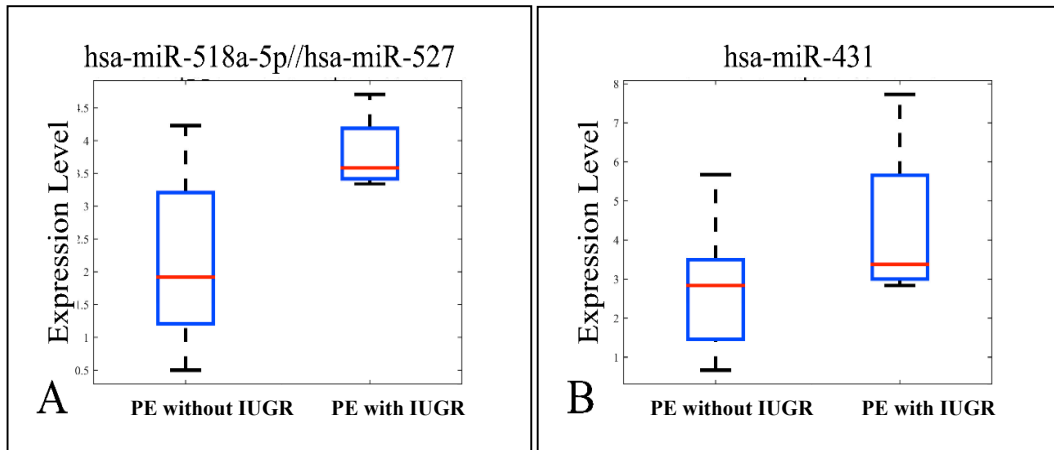


Εικόνα 18: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης (n=11), όψιμης έναρξης (n=5) και της ομάδας ελέγχου (n=8). Σημαντική διαφοροποιημένη έκφραση διαπιστώθηκε για το miR-3942 (A) μεταξύ EOPE και controls, miR-544b (B) μεταξύ EOPE και controls, miR-383 (C) μεταξύ EOPE και controls καθώς επίσης LOPE και controls, miR-518a-5p/miR-527 (D) μεταξύ EOPE και controls, miR-431 (E) μεταξύ EOPE και controls, miR-423-3p (F) μεταξύ EOPE και controls καθώς επίσης LOPE και controls, miR-124* (G) μεταξύ EOPE και controls, miR-1183 (H) μεταξύ EOPE και controls καθώς επίσης LOPE και controls, miR-130b (I) μεταξύ EOPE και controls καθώς επίσης LOPE και controls.

Επίπεδο έκφρασης miRNA:log₂, *p<0.05, **p<0.01; **EOPE**: Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης, **LOPE**: Προεκλαμψία όψιμης έναρξης, **CONTROL**: ομάδα ελέγχου

B. Αξιολόγηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των miRNAs του πλακούντα για τη διάγνωση Προεκλαμψίας με Υπολειπόμενη Ανάπτυξη του Εμβρύου (IUGR)

Η αξιολόγηση των miRNA με χρήση του μη παραμετρικού στατιστικού κριτηρίου Mann Whitney U ως προς τη δυνατότητα διαχωρισμού κυήσεων με Προεκλαμψία (n=8) από αυτές με Προεκλαμψία που κυοφορούσαν έμβρυο με υπολειπόμενη ανάπτυξη (n=8) έδειξε σημαντικά αυξημένη έκφραση των miR-431 και miR-518a-5p/miR-527, με $p < 0.05$ (Εικόνα 19).

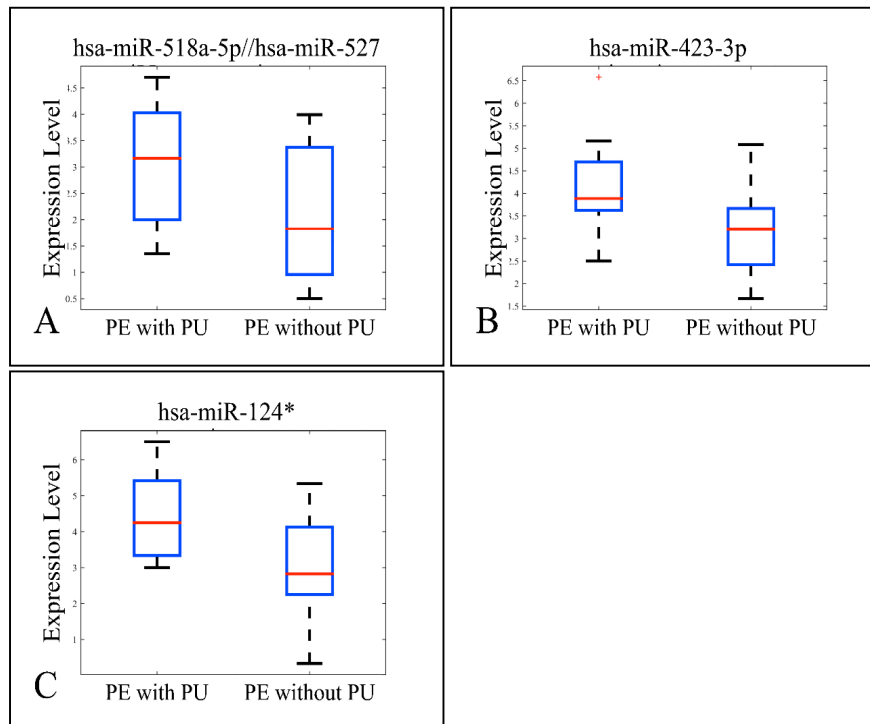


Εικόνα 19: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία και έμβρυα με υπολειπόμενη ανάπτυξη (n=8) σε σύγκριση με τα δείγματα Προεκλαμψία χωρίς IUGR (n=8). Σημαντικά αυξημένη έκφραση διαπιστώθηκε για το miR-518a-5p/miR-527 (A) και το miR-431 (B) στην ομάδα εγκύων με Προεκλαμψία και IUGR.

Επίπεδο έκφρασης miRNA: \log_2 , $p < 0.05$; **PE**: Προεκλαμψία, **IUGR**: Υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου

Γ. Αξιολόγηση των miRNAs ως προς τη δυνατότητα διαχωρισμού των δειγμάτων Προεκλαμψίας με το κλινικό σύμπτωμα της πρωτεϊνουρίας

Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs με την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας έδειξε στατιστικώς σημαντική υπερέκφραση των miR-423-3p, miR-124* και miR-518a-5p/miR-527 στις εγκύους με λεύκωμα ούρων 24/ώρου >300mg (n=14) σε σχέση με αυτές χωρίς το κλινικό εύρημα (n=2) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Θηκογράμματα κατανομής της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας (n=14) όταν αυτά συγκρίθηκαν με τα δείγματα Προεκλαμψίας χωρίς την εμφάνιση του συμπτώματος της πρωτεϊνουρίας (n=2). Τα miR-518a-5p/miR-527 (A), miR-423-3p (B) και miR-124* (C) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφοροποιημένη έκφραση στα δείγματα με Προεκλαμψία και παράλληλη ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας.

Επίπεδο έκφρασης miRNA: \log_2 , $p < 0.05$; PE: Προεκλαμψία, PU: Πρωτεϊνουρία

5.1.4 Ανάλυση γονιδίων στόχων των miRNAs

Η ταυτοποίηση των γονιδίων στόχων των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε πλακούντες εγκύων με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και οι σχετικές τους λειτουργίες ταυτοποιήθηκαν με *in silico* ανάλυση, με τις βάσεις δεδομένων TargetScan, DIANA και miROB.

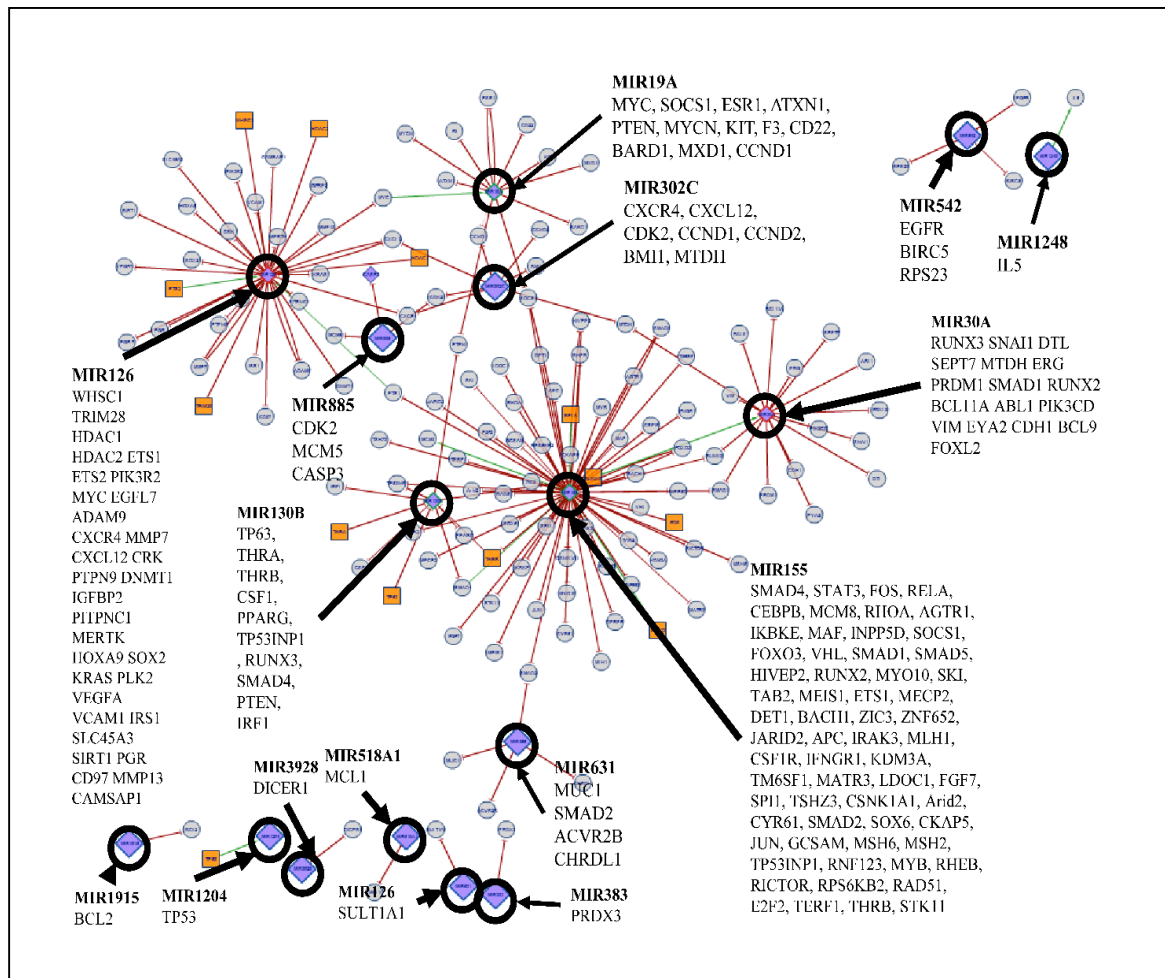
Τα miRNAs, miR-126*, miR-885, miR-130B, miR-1915, miR-1204, miR-3928, miR-518a-5p/miR-527, miR-631, miR-383, miR-19a, miR-302c, miR-155, miR-30a, miR-542 και miR-1248 παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με τα γονίδια *SMAD1/2/4/5* (*Small mothers against decapentaplegic 1/2/4/5*), *ADAM9* (*a disintegrin and metalloproteinase*), *VCAM1* (*Vascular cell adhesion 1*), *TGF-β P2*, *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), *TP53* (*Tumor Protein 53*) και *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 1*) (Εικόνα 21).

Με βάση τα ευρήματα της *in silico* ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια στόχοι *MYC*, *PIK3R2* (*Phosphoinositide -3 Kinase Regulatory Subunit 2*), *EGFL7* (*Epidermal Growth Factor 7*), *ADAM9*, *CXCR4* (*Chemocin Receptor type 4*), *MMP7* (*Matrix Metalloproteinases 7*), *PTPN9* (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 9*), *IGFBP2* (*Insulin Like Growth Factor binding protein 2*), *SOX2*, *KRAS*, *PLK2* (*polo-like kinase 2*), *VEGFA* (*Vascular endothelial growth factor A*), *VCAM1* (*Vascular cell adhesion protein 1*), *CD97* (*Cluster of differentiation protein 97*) για το miR-126* και τα *TP63* (*Tumor protein 63*), *TP53INP1* (*Tumor protein p53 – inducible nuclear protein 1*), *RUNX3*, *SMAD4*, *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) και *IRF1* (*Interferon regulatory factor 1*) για το miR-130b.

Στους στόχους του miR-155 περιλαμβάνονται τα γονίδια *SMAD2/4/5*, *STAT3* (*Signal transducer and Activator of Transcription protein 3*), *FOS*, *MAF*, *RUNX2*, *ZIC3*, *ZNF652* (*Zinc finger protein 652*), *MATR3*, *FGF6/7* (*Fibroblast growth factor 6/7*), *SOX6*, *TP53INP1* και *E2F2*. Ως στόχοι του miR-30a ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια *RUNX2/3*, *SMAD1*, *BCL1A/9* (*B cell lymphoma 1*) και *PIK3CD*. Τα γονίδια *BCL2* (*B cell lymphoma 2*), *TP53* και *SULT1A1* (*Sulfotransferase A1*) αποτελούν στόχο των miR-1915, miR-1204 και miR-126, αντιστοίχως.

Μεταξύ των γονιδίων - στόχων των miR-3928, miR-518a-5p/miR-527, miR-383, miR-1248 περιλαμβάνονται τα γονίδια *DICER1*, *MCL1* (*Myeloid leukemia cell differentiation protein 1*), *PRDX3* (*Peroxiredoxin 3*), *IL* (*Interleukin*) ενώ οι βασικοί γονιδιακοί στόχοι του miR-302c είναι τα *CXCR4* (*Chemokine receptor type 4*), *CXCL12* (*chemokine ligand 12*), *CDK2* (*Cyclin dependent kinase 2*), *CCND2* (*Cyclin D2*), *BMI1* (*B lymphoma Mo insertion region 1*), *MTD1*, του miR-19a τα *MYC*, *SOCS1* (*Suppressor of cytokine signaling 1*), *PTEN*, *MYCN*, *CD22*, *CCND* και του miR-885 τα γονίδια *CDK2*, *MCM5* (*Minichromosome maintenance*

protein 5), CASP3 (Critical Assessment of protein structure prediction 3). Τέλος, τα γονίδια MUC1 (Mucin protein 1), SMAD2 αποτελούν στόχο του miR-631 και τα EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), BIRV5, RSP23 του miR-542.



Εικόνα 21: Γονίδια - στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βάση δεδομένων miROB web tool.

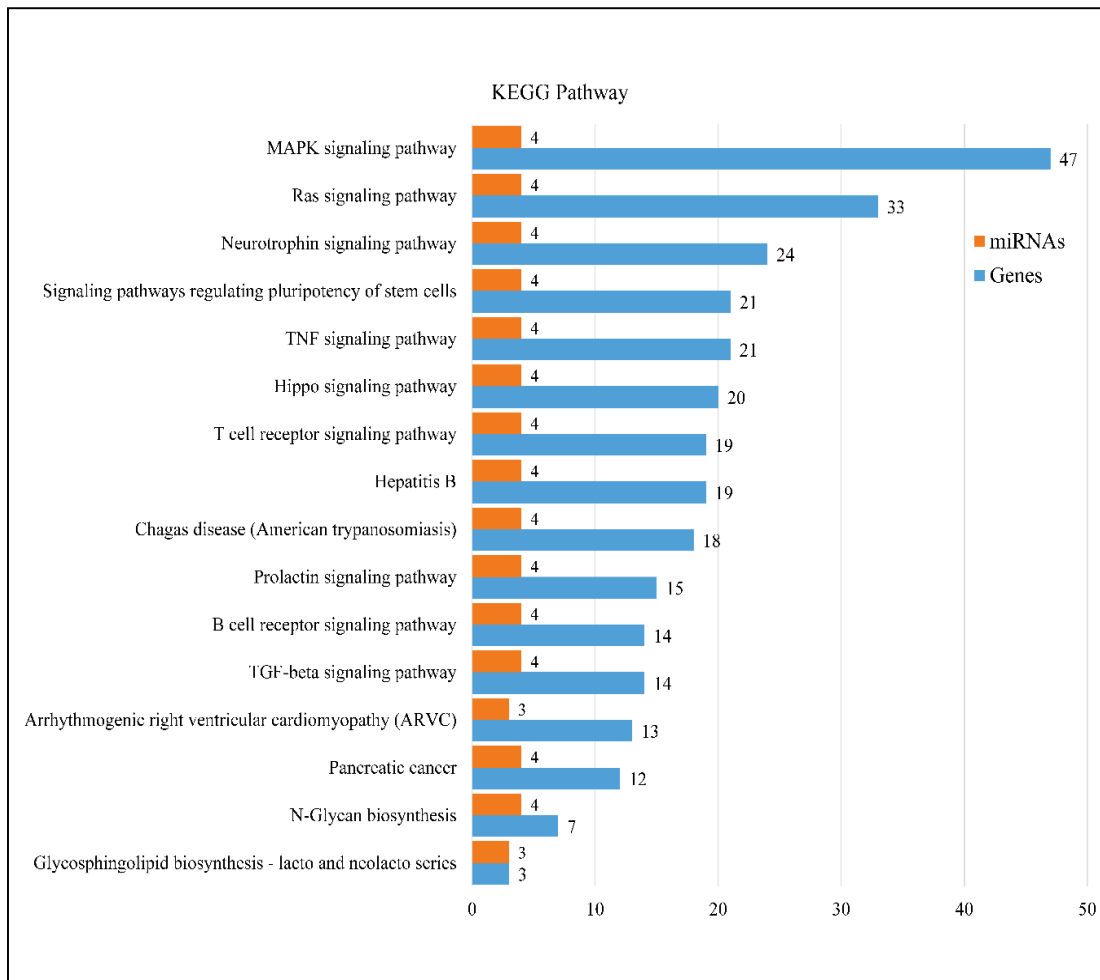
5.1.5 Ταυτοποίηση του ρυθμιστικού ρόλου των miRNAs και των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν

Για την ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας (GO) των γονιδίων στόχων των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση χρησιμοποιήθηκε το Webgestat web tool. Ταυτοποιήθηκαν γονίδια - στόχοι που σχετίζονται με την κυτταρική σύσταση, συγκεκριμένα με τη λειτουργία του κυτταροπλάσματος (3 γονίδια), του κυτοσολίου (2 γονίδια), του ενδοπλασματικού δικτύου (2 γονίδια) και 2 γονίδια που σχετίζονται με μεμβρανικά οργανίδια. Αναφορικά με τη μοριακή λειτουργία, ταυτοποιήθηκαν γονίδια - στόχοι τα οποία σχετίζονται με τη ριβονουκλεοτιδική σύνδεση (3 γονίδια), τη νουκλεοτιδική σύνδεση της αδενίνης (3 γονίδια) και την αλληλουχία δέσμησης των ATP εξαρτώμενων πρωτεϊνών (3 γονίδια). Στην GO ανάλυση ταυτοποιήθηκαν γονίδια σχετικά με τη βιολογική διαδικασία που σχετίζονται με την κυτταρική απόκριση (2 γονίδια) και την αλληλεπίδραση ιών και ξενιστή (2 γονίδια).

Η ανάλυση των σηματοδοτικών οδών των miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση (p value<0.05) καθώς και των γονιδίων στόχων αυτών, έγινε με τη χρήση της βάσης δεδομένων KEGG (Εικόνα 22).

Οι βασικές σηματοδοτικές οδοί στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία είναι η MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), TNF (Tumor Necrosis Factor), T-cell receptor, B-cell receptor και TGF- β (Transforming Growth Factor- β). Επιπλέον σηματοδοτικοί οδοί που ταυτοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνουν τη ρύθμιση RAS, Νευροτροφίνης, Ηπατίτιδας Β, τρυπανοσωμιάσης, προλακτίνης, καρδιομυοπάθειας δεξιάς κοιλίας, καρκίνου στο πάγκρεας, βιοσύνθεσης φωσφολιπιδίων και της Ν-γλυκάνης.

Ακολούθησε ανάλυση των γονιδίων στόχων των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία με τη χρήση του GOmiR tool, κατά την οποία επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα που αντλήθηκαν από άλλες βάσεις δεδομένων. Με την ανάλυση αυτή επιβεβαιώθηκε ότι τα γονίδια - στόχοι των miR-126* και miR-130b συμμετέχουν στο TNF σηματοδοτικό μονοπάτι. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι από την GOmiR ανάλυση επιβεβαιώθηκε ότι το miR-518a-5p/miR-527 και το miR-30a έχουν γονίδια στόχους που συμμετέχουν στο MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι. Επιπλέον, το miR-631 φαίνεται ότι έχει στόχο τα γονίδια *TBX2*, *HDAC1* (*Histone deacetylase C1*) και *AXIN1*, ενώ παράλληλα γονίδια στόχοι του miR-631 συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού της ινσουλίνης.



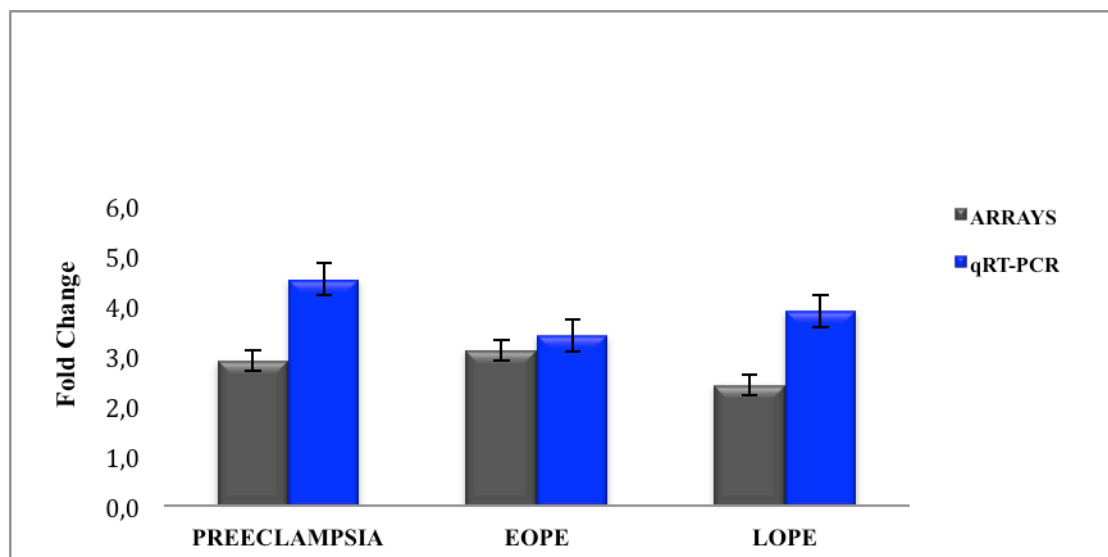
Εικόνα 22: Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συσχετίζονται με τη διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα από κήσεις με Προεκλαμψία.

5.1.6 Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με qRT-PCR

Το miR-518a-5p/miR-527 επιλέχθηκε να μελετηθεί και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (qRT-PCR) μερικής ποσοτικοποίησης διότι βρέθηκε να έχει χαρακτηριστικό πρότυπο έκφρασης στα δείγματα τόσο της πρώιμης όσο και της όψιμης Προεκλαμψίας. Επιπλέον, βρέθηκε να συνδέεται με τη βασική συμπτωματολογία που μελετήθηκε, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνουρίας και της υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου.

Η έκφραση του miR-518a-5p/miR-527 μελετήθηκε αρχικά στο σύνολο των δειγμάτων υλικού βιοψίας πλακούντα από κυήσεις με Προεκλαμψία (n=16) και στη συνέχεια στους υπότυπους της επιλοκής, σε δείγματα από εγκύους με πρώιμη Προεκλαμψία (n=11) και όψιμη Προεκλαμψία (n=5), σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου (n=8). Μετά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς RNU44 και τη χρήση της εξίσωσης $\Delta\Delta Ct$.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης του miR-518a-5p/miR-527 με qRT-PCR επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των miRNA μικροσυστοιχιών (Εικόνα 23). Αναφορικά με την Προεκλαμψία βρέθηκε η διαφορά στην έκφραση σε επίπεδο FC=4.5, για την πρώιμη μορφή της επιλοκής FC=3.5 και για την όψιμη μορφή FC=4.



Εικόνα 23: Στο γράφημα καταγράφεται ο λόγος διαφοροποιημένης έκφρασης του miR-518a-5p/miR-527 με τη μέθοδο των miRNAs μικροσυστοιχιών (γκρι) και της qRT-PCR (μπλε). Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε στην Προεκλαμψία και στις δυο υποκατηγορίες της, οι οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με τον χρόνο έναρξης των συμπτωμάτων της Προεκλαμψίας σε πρώιμη (EOPE) και όψιμη έναρξης (LOPE). Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς RNU44 χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

5.2 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των ελεύθερων miRNAs με τη χρήση του συστήματος μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq

Αναλύθηκαν 5 δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, που αργότερα εμφάνισαν όψιμης έναρξης Προεκλαμψία (P1-P5) και 5 από εγκύους που δεν εμφάνισαν την επιπλοκή (C1-C5). Όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση ολικού RNA σε επαρκή ποσότητα και ικανοποιητική καθαρότητα (λόγος καθαρότητας A260/A280: 1.7-2.0) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ελέγχου ποιότητας και καθαρότητας ολικού RNA πλάσματος εγκύων

Δείγμα	OD260/280	OD260/230	Συγκέντρωση (ng/μl)	Όγκος (μl)	Ποσότητα (ng)
C1*	1.8	1.89	77.09	15	1156.35
C2	1.78	1.07	85.79	15	1286.85
C3	1.7	1.42	70.2	15	1053
C4	1.79	1.63	64.61	15	966.15
C5	1.77	1.02	73.61	15	1104.15
P1**	1.71	0.78	60	15	900
P2	1.71	1.24	56.83	15	853.45
P3	1.71	1.35	51.21	15	768.15
P4	1.61	0.87	39.59	15	593.85
P5	1.68	1.48	45.74	15	686.1

*C1-C5 Δείγματα ομάδας ελέγχου **P1-P5: Δείγματα από εγκύους με όψιμης έναρξης Προεκλαμψίας

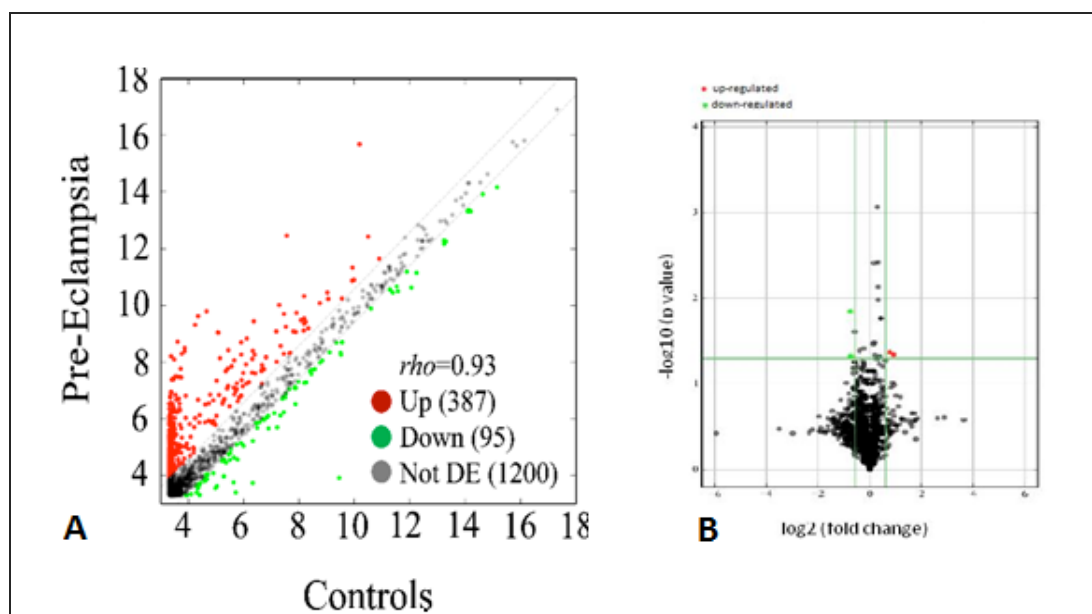
Το πρότυπο έκφρασης των ελεύθερων miRNAs στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, μελετήθηκε με το σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq. Στον πίνακα 9 παρουσιάζεται συνολικός αριθμός αναγνώσεων της αλληλούχισης αναφορικά με την παρουσία miRNA αλληλουχιών στα υπό μελέτη δείγματα στα τρία στάδια επεξεργασίας της αρχικής πληροφορίας της αλληλούχισης.

Πίνακας 9: Συνολικός αριθμός αναγνώσεων της αλληλούχισης

Δείγμα	Clean Reads	Trimmed Reads (μήκος \geq 15nt)	Reads aligned to known Human pre-miRNA in miRBase v.21
C1	11,151,412	10,851,755	7,107,238
C2	11,646,312	11,283,011	7,685,146
C3	10,942,562	10,416,726	4,178,806
C4	8,810,759	8,277,617	1,226,729
C5	13,149,041	11,549,455	6,569,273
P1	13,253,786	9,403,739	968,176
P2	7,670,761	7,479,202	5,899,494
P3	8,433,074	2,086,133	236,618
P4	15,198,549	14,140,580	10,400,804
P5	18,645,060	16,891,763	11,776,982

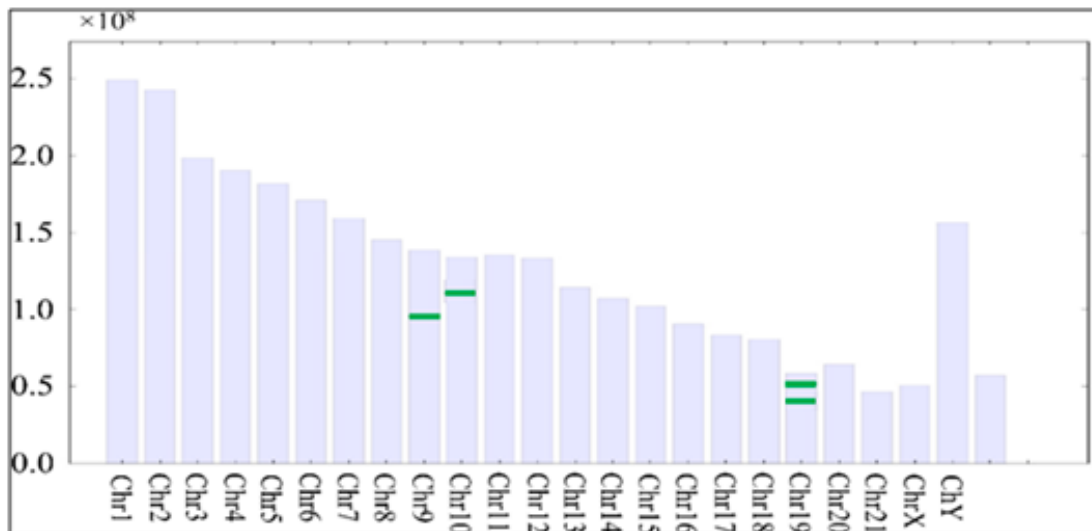
5.2.1 Ταυτοποίηση miRNAs με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης στο πλάσμα εγκύων με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία

Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 1682 miRNAs στο πλάσμα εγκύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ των δύο ομάδων έδειξε 1200 miRNAs (71,3%) με ίδιο πρότυπο έκφρασης στο πλάσμα εγκύων που αργότερα εμφάνισαν όψιμης έναρξης Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, 387 (23%) με αυξημένη έκφραση στην Προεκλαμψία και 95 (5,7%) με μειωμένη έκφραση. (Εικόνα 24A). Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η διαφοροποιημένη έκφραση τεσσάρων miRNAs, των miR-23b-5p, miR-99b-5p, miR-525-5p και miR-548e-3p καλύπτει τις προϋποθέσεις στατιστικής σημαντικότητας που έχουν οριστεί στη μελέτη με $p < 0.046$, $p < 0.025$, $p < 0.04$ και $p < 0.038$, αντιστοίχως (Εικόνα 24B). Τα αποτελέσματα (raw data) έχουν αναρτηθεί στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), με κωδικό GSE119799.



Εικόνα 24: Α. Διάγραμμα κατανομής (scatter plot) της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης, Β. Διάγραμμα volcano plot των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα miRNA. Ο άξονας x αντιστοιχεί στο δυαδικό λογάριθμο του λόγου διαφορικής έκφρασης και κάθε θέση στον άξονα y στον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της τιμής p -value. Οι κάθετες πράσινες γραμμές ορίζουν το επίπεδο σημαντικότητας [p -value ≤ 0.05] και [$\log_2FC \geq 1.5$].

Τα miR-99b-5p και miR-525-5p έχουν χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19, το miR-23b-5p στο χρωμόσωμα 9 και το miR-548e-3p στο χρωμόσωμα 10 (Εικόνα 25). Οι αλληλουχίες τους έχουν δημοσιευτεί στη βάση δεδομένων miRBase ως CACCCGUAGAACCGACCUUGCG, UGGGUUCCUGGCAUGC-UGAUUU, CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU και GGGACU AGGAUGCAGACCUCC, αντίστοιχα.



Εικόνα 25: Χρωμοσωμική θέση των miRNAs (miR-99b-5p, miR-23b-5p, miR-525-5p και miR-548e-3p) με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων από το πρώτο τρίμηνο της κύησης που αργότερα εμφάνισαν όψιμης μορφής Προεκλαμψία.

5.2.2 Ανάλυση γονιδίων στόχων των miRNAs

In silico, με τη χρήση των αλγορίθμων TargetScan, PicT και MiRanda ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια - στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία όψιμης έναρξης με βάση το $-\log(p\text{-value})$.

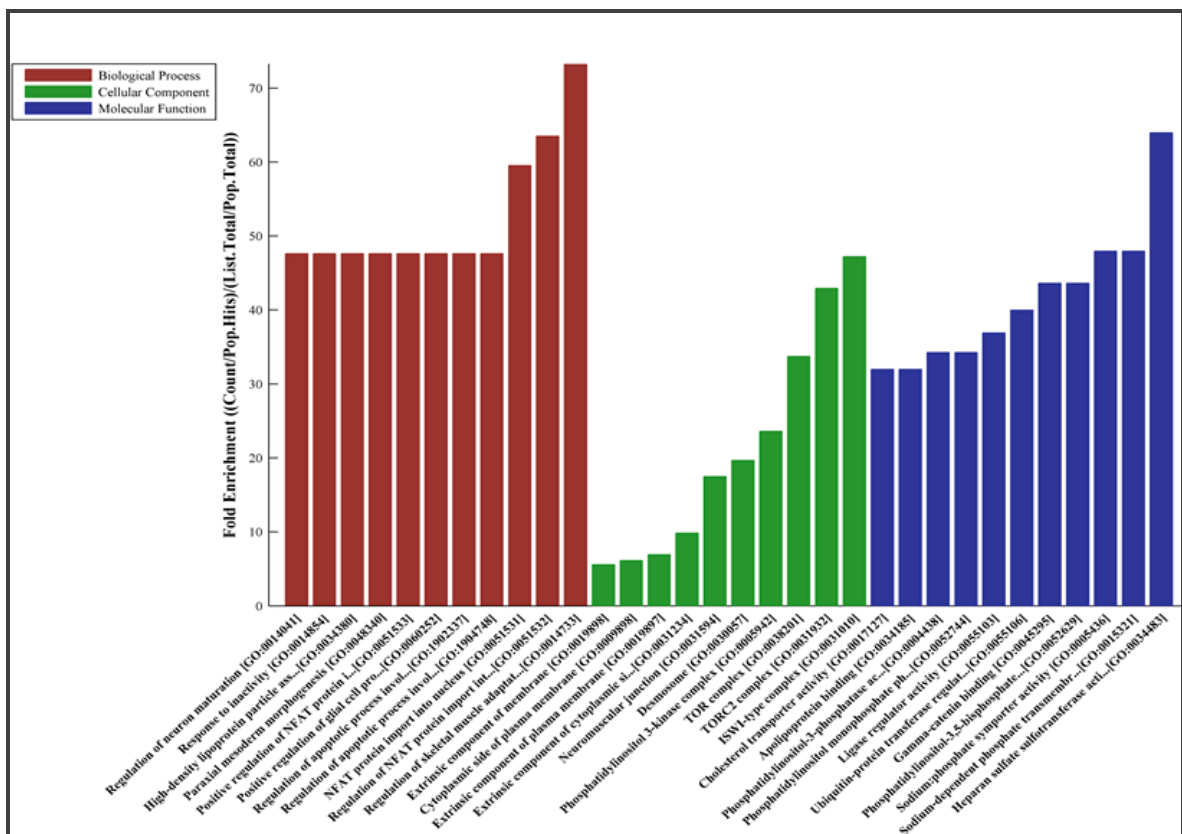
Τα υποεκφραζόμενα miRNAs διαπιστώθηκε ότι έχουν σημαντική συσχέτιση με 188 γονίδια στόχους. Συγκεκριμένα, τα γονίδια στόχοι του miR-23b-5p και miR-99b-5p είναι 161 και 27, αντιστοίχως, συμπεριλαμβανομένων των *IGF2* (*Insulin like growth factor 2*), *FGFR3* (*Fibroblast growth factor receptor 3*), *AGO2* (*Argonaute RISC catalytic component*), *TNFSF14* (*Tumor necrosis factor superfamily, member 14*), *TP53INP2* (*Tumor protein P53 inducible nuclear protein 2*), *CNTN1* (*Conectin 1*), *mTOR* (*mechanistic target of rapamycin*) όπως και πολλά γονίδια της οικογένειας *ADAM* (*ADAM10*, *ADAM19*, *ADAMTS15*) (Παράρτημα 1 & 2).

Ομοίως για τα υπερεκφραζόμενα miR-525-5p και miR-548e-3p διαπιστώθηκε η συσχέτιση με 133 και 6 γονίδια στόχους, αντιστοίχως, μεταξύ των οποίων γονίδια των οικογενειών

SMAD και *ADAM* (*ADAMTS13*, *ADAMTS 28*) καθώς και γονίδια ιντερλευκινών (*ILF2*, *ILF12*, *ILF24*).

5.2.3 Ταυτοποίηση ρυθμιστικού ρόλου των miRNAs

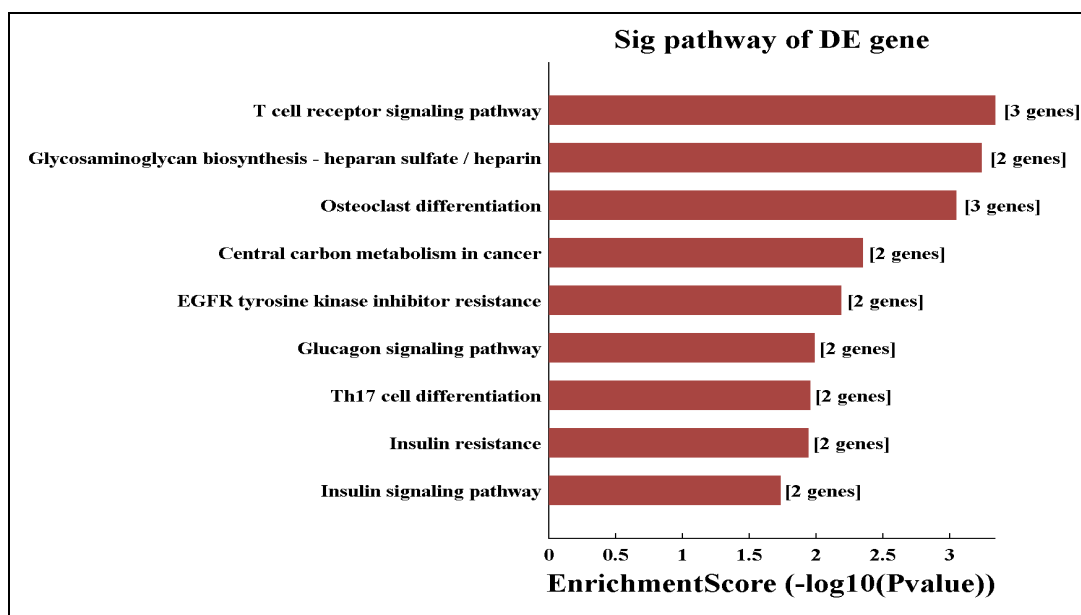
Τα ευρήματα της ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology) για τις τρεις οντολογίες της GO- βιολογική διαδικασία (κόκκινο), μοριακή λειτουργία (μπλε) και κυτταρική σύσταση (πράσινο) παρουσιάζονται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26: Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology) για την πρόγνωση της βιολογικής διαδικασίας, μοριακής λειτουργίας και κυτταρικής σύστασης των γονιδίων στόχων των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία όξινης έναρξης.

5.2.4 Ταυτοποίηση των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν τα miRNAs

Με τη χρήση της βάσης δεδομένων KEGG διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια - στόχοι των miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία σε σχέση με κυήσεις με ομαλή έκβαση έχουν σημαντική συσχέτιση με τις κατωτέρω 9 σηματοδοτικές οδούς ($p < 0.05$) (Εικόνα 28): **(1)** Σηματοδοτική οδός διαφοροποίησης των κυττάρων Th17 ($p = 0.01$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *MTOR* (*Mammalian target of rapamycin*)/ *PPP3CA* (*Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha*), **(2)** της διαφοροποίησης του υποδοχέα των Τ Λεμφοκυττάρων ($p = 0.00046$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *PDCD1* (*Programmed cell death protein 1*)/ *PPP3CA*/ *TEC*, **(3)** της διαφοροποίησης των οστεοκλαστεοκλαστών ($p = 0.00091$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *PPP3CA*/ *SIRPA* (*Signal-regulatory protein alpha*)/ *TEC*, **(4)** η σηματοδοτική οδός της ινσουλίνης ($p = 0.019$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *mTOR* (*Mammalian target of rapamycin*)/ *PYGM* (*Myophosphorylase*), **(5)** της αντίστασης στην ινσουλίνη ($p = 0.011$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *mTOR*/ *PYGM*, **(6)** της βιοσύνθεσης γλυκοσαμινογλυκάνης (Heparan sulfate / heparin) ($p = 0.0006$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *HS3ST2* (*Heparin sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2*)/ *HS3ST3B1* (*Heparin sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 3B1*), **(7)** του γλυκογόνου ($p = 0.011$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *PPP3CA*/ *PYGM*, **(8)** της EGFR (Epidermal Growth factor receptor) inhibitor resistance ($p = 0.0065$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *FGFR3*/ *MTOR* και **(9)** του Central carbon metabolism στον καρκίνο ($p = 0.0045$) με τη συμμετοχή των γονιδίων *FGFR3* (*Fibroblast Growth factor receptor*)/ *mTOR*.



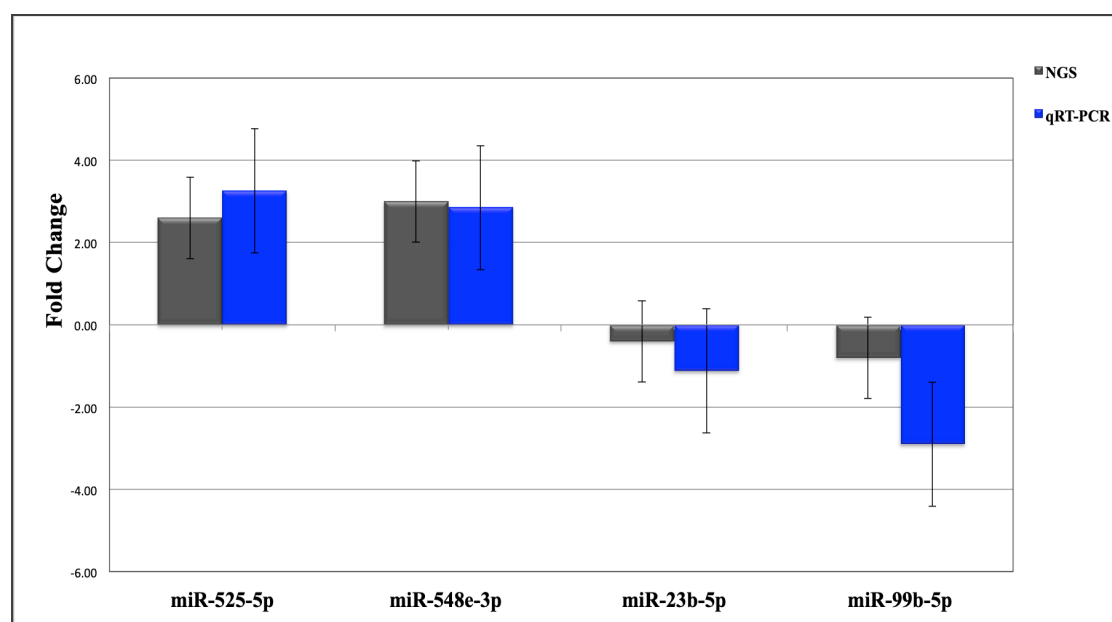
Εικόνα 27: Σηματοδοτικοί οδοί στις οποίες συμμετέχουν γονίδια-στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία και σχετίζονται με τα γονίδια-στόχους των miR-515-

5p, miR-548-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p. a) Th17 Cell Differentiation (ID: hsa04659, $p=0.01$), b) T cell receptor signaling pathway (ID: hsa04660, $p=0.00046$), c) Osteoclast differentiation (ID: hsa04380, $p=0.00091$), d) Insulin signaling pathway (ID: hsa04910, $p=0.019$), e) Insulin resistance (ID: hsa04931, $p=0.011$), f) Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin (ID: hsa00534, $p=0.0006$), g) Glucagon signaling pathway (ID: hsa04922, $p=0.011$), h) EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance (ID: hsa01521, $p=0.0065$), i) Central carbon metabolism in cancer (ID: hsa05230, $p=0.0045$).

5.2.5 Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με qRT-PCR

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα miRNAs miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p μελετήθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (qRT-PCR). Η υπερέκφραση των miR-525-5p, miR-548e-3p και η υποέκφραση των miR-23b-5p και miR-99b-5p μελετήθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων πλάσματος γυναικών πρώτου τριμήνου ($n=17$) που μετέπειτα ανέπτυξαν όψιμη Προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($n=17$).

Μετά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς RNU44 και τη χρήση της εξίσωσης $\Delta\Delta Ct$. Τα αποτελέσματα του NGS επιβεβαιώθηκαν πλήρως με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR (Εικόνα 28).

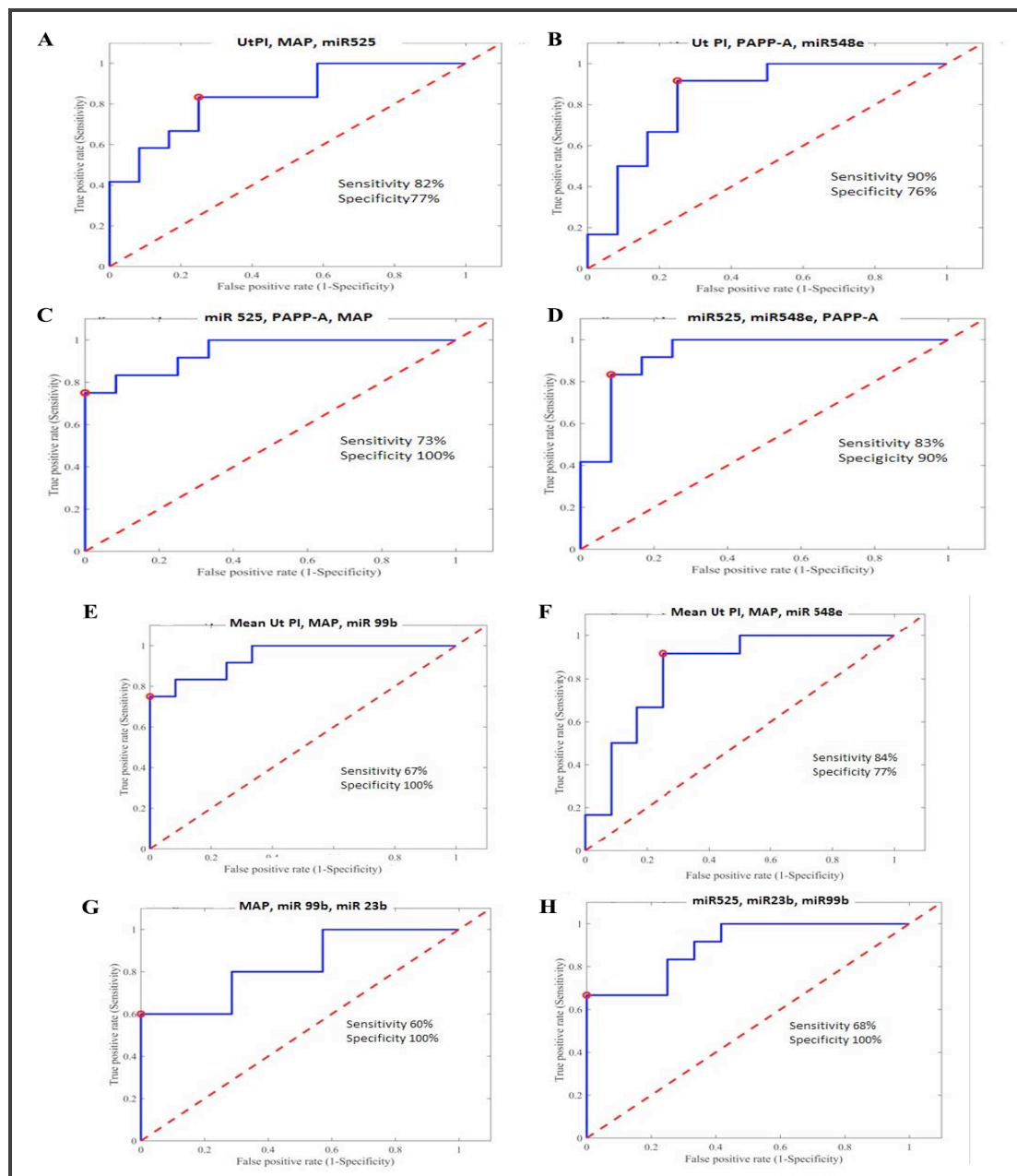


Εικόνα 28: Στο γράφημα καταγράφεται ο λόγος διαφοροποιημένης έκφρασης του miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p με το σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq (γκρι) και της qRT-PCR (μπλε). Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς RNU44 χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

5.2.6 Περιγραφική στατιστική ανάλυση: Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα εγκύων με τα κλινικά στοιχεία της Προεκλαμψίας

Η αξιολόγηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης του προτύπου έκφρασης των miRNA στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας όψιμης έναρξης έγινε με λογιστική παλινδρόμηση σε συνδυασμό με τα ατομικά στοιχεία της εγκύου (ηλικία και BMI), πρωτεϊνικούς δείκτες (β -hCG και PAPP-A), μέτρηση της μέσης αρτηριακής πίεσης και της αντίστασης ροής του αίματος στις μητριαίες αρτηρίες όπως υπολογίστηκε με Doppler υπερηχογραφία (UtPI).

Από την ανάλυση προκύπτουν 8 διαφορετικοί πιθανοί συνδυασμοί που έχουν τη δυνατότητα πρώιμης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου με ευαισθησία >60% και ειδικότητα >70% (Εικόνα 29). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός ανάλυσης miR-525-5p - PAPP-A - MAP που παρουσιάζει 100% ειδικότητα και 73% ευαισθησία καθώς επίσης και ο συνδυασμός ανάλυσης miR-548e-3p - PAPP-A - UtPI που παρουσιάζει 90% ευαισθησία και 76% ειδικότητα.



Εικόνα 29: Καμπύλη ανάλυσης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC) για τη διερεύνηση της διαγνωστικής αξίας των miRNAs (miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-23b-5p και miR-99b-5p) με διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης σε δείγματα πλάσματος πρώτου τριμήνου από εγκύους που ανέπτυξαν τον όψιμο τύπο Προεκλαμψίας μετέπειτα στην κύηση σε σύγκριση με δείγματα από την ομάδα ελέγχου. Συνδυασμός παραγόντων (A) miR-525-5p - UtPI - MAP (82% ευαισθησία, 77% ειδικότητα), (B) miR-548e-3p - UtPI- PAPP-A (82% ευαισθησία, 77% ειδικότητα), (C) miR-525-5p - PAPP-A - MAP (90% ευαισθησία, 76% ειδικότητα), (D) miR-525-5p - miR-548e-3p - PAPP-A (83% ευαισθησία, 90% ειδικότητα), (E) miR-99b-5p -UtPI - MAP (67% ευαισθησία, 100% ειδικότητα), (F) miR-548e-3p - UtPI- MAP (84% ευαισθησία 77% ειδικότητα), (G) miR-99b-5p - miR-23b-5p - MAP (60% ευαισθησία, 100% ειδικότητα) και (H) miR-525-5p - miR-23b-5p - miR-99b-5p (82% ευαισθησία, 77% ειδικότητα).

Στον κάθετο άξονα της καμπύλης παριστάνεται η ευαισθησία (%) και στον οριζόντιο άξονα η ειδικότητα (%). Σημειώνεται η θέση της διαγωνίου που αντιπροσωπεύει τη μηδενική διαγνωστική αξία. **UtPI**: Uterine Artery Mean Pulsatility Index, **MAP**: Mean Arterial Pressure, **PAPP-A**: Pregnancy associated plasma protein-A.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Προεκλαμψία αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες μητρικής και νεογνικής νοσηρότητας και θνησιμότητας [4,5]. Χαρακτηρίζεται από υπέρταση, συμπτώματα δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων και απώτερες επιπλοκές για τη μητέρα και το νεογνό που περιλαμβάνουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και μεταβολικού συνδρόμου [23].

Επειδή ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης της επιπλοκής είναι ο τοκετός, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη διερεύνηση του παθογενετικού μηχανισμού που εμπλέκεται στην εμφάνισή της, την πρόωμη ανίχνευση κήσεων υψηλού κινδύνου και την πρόληψη μέσω της χορήγηση κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής [101,102]. Ευρήματα από πρόσφατες ευρείας κλίμακας τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν ότι η καθημερινή χορήγηση μικρής δόσης ασπιρίνης σε εγκύους υψηλού κινδύνου, πριν από την 16^η εβδομάδα κύησης, δρα προστατευτικά και σχεδόν εκμηδενίζει τον κίνδυνο εκδήλωσης των συμπτωμάτων της επιπλοκής [97].

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αξιόπιστος βιοδείκτης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη Προεκλαμψίας, πριν την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Το υπερηχογράφημα Doppler χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση ήδη διαγνωσμένων κήσεων με Προεκλαμψία και δεν είναι επαρκές για να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία πρόωμης εκτίμησης του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής [107]. Επιπλέον διάφοροι γενετικοί και βιοχημικοί δείκτες έχουν μελετηθεί ως προς τη δυνατότητα πρόβλεψης της Προεκλαμψίας. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που σχετίζονται με τον παθογενετικό μηχανισμό της επιπλοκής (Placenta Growth Factor, Soluble Flt-1, Soluble Endoglin, Activin A, Placental Protein 13, Complement Factor Bb, Inflammatory Cytokines και VEGF), ή αποκαλύφθηκαν τυχαία κατά τον προγεννητικό πληθυσμιακό έλεγχο όπως η Glycoprotein Hormones Inhibin-A και η PAPP-A [245]. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα κλινικών μελετών προκύπτει ότι οι βιοδείκτες αυτοί έχουν χαμηλή ευαισθησία και υψηλά ποσοστά ψευδών αποτελεσμάτων (θετικών και αρνητικών) γεγονός που περιορίζει, προς το παρόν τουλάχιστον, τη χρησιμοποίησή τους στην κλινική πράξη [97]. Επιπλέον το ελεύθερο DNA (cell free DNA - cfDNA) έχει επίσης προταθεί ως δείκτης για την εκτίμηση κινδύνου για την ανάπτυξη της Προεκλαμψίας εφόσον διαπιστώθηκε ότι αυξάνεται το πρώτο τρίμηνο της κύησης, στο πλάσμα εγκύων, οι οποίες αργότερα ανέπτυξαν Προεκλαμψία [111].

Η ταυτοποίηση νέων βιολογικών δεικτών που θα μπορούν έγκαιρα και με ασφάλεια να ανιχνεύσουν κήσεις υψηλού κινδύνου για Προεκλαμψία αλλά και να διευκρινίσουν την παθογενετική βάση της επιπλοκής αποτελεί στόχο όλων όσων ασχολούνται με τον τομέα της εμβρυομητρικής ιατρικής. Οι βιοδείκτες που αναζητούνται πρέπει να έχουν δυνατότητα ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και σε πρόωμο

στάδιο της κύησης καθώς η έγκαιρη ανίχνευση αποτελεί σημαντικό παράγοντα αποτελεσματικής πρόληψης [245]. Επιπλέον, οι νέοι βιοδείκτες θα πρέπει να ανιχνεύονται σε βιολογικά υλικά που συλλέγονται με μη επεμβατικές μεθόδους, η ποσοτικοποίηση τους σε κλινικό επίπεδο να είναι εύκολη και οικονομική χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερος εξοπλισμός και τα αποτελέσματα των μετρήσεων να αντανακλούν με αξιοπιστία την παρουσία ή όχι της επιπλοκής καθώς και την εξέλιξη της.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών για την ανεύρεση νέων βιοδεικτών επικεντρώνεται στη μελέτη των miRNAs. Ως αρνητικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και της ιστοειδικότητας που τα χαρακτηρίζει, τα miRNAs έχουν αναδειχθεί ως νέοι υποψήφιοι βιοδείκτες για διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Συγκρινόμενα με τους κλασσικούς πρωτεϊνικούς δείκτες τα miRNAs έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς απομονώνονται εύκολα με υψηλής συγγένειας παράγοντες πρόσδεσης, παρουσιάζουν μικρότερη περιπλοκότητα γιατί δεν υπόκεινται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και ποσοτικοποιούνται με ακρίβεια με τη χρήση ευαίσθητων τεχνικών [245]. Συγκρινόμενα με γενετικούς βιοδείκτες, όπως τα mRNAs, τα miRNAs έχουν το πλεονέκτημα του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής *in vivo* και της σταθερότητας του μορίου *in vitro*.

Στον τομέα της παθολογίας της κύησης τα miRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς σε κύσεις με υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου, Προεκλαμψία και σακχαρώδη διαβήτη κύησης [117,177,178,196]. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν το σημαντικό ρόλο των μορίων αυτών στον παθογενετικό μηχανισμό της Προεκλαμψίας μέσω αρνητικής ρύθμισης και καταστολής σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, το οξειδωτικό stress, τη φλεγμονώδη, την ανοσολογική αντίδραση και την έκκριση ινσουλίνης [180,202-210]. Τα ευρήματα όμως των μελετών αυτών είναι συχνά αντικρουόμενα πιθανώς λόγω προ-αναλυτικών και αναλυτικών ιδιαιτεροτήτων κάθε μελέτης. Ατομικά χαρακτηριστικά των εγκύων, ο τύπος του δείγματος και ο τρόπος συλλογής, μεταφοράς και συντήρησης είναι ιδιαίτερα σημαντικοί παράγοντες για την αξιοπιστία και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων [246]. Σημαντικές διαφορές προκύπτουν επίσης λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που μελετώνται στις περισσότερες ερευνητικές μελέτες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στο σχεδιασμό της μελέτης καθώς και τη συλλογή και την επιλογή του υλικού για ανάλυση για να διασφαλιστεί κατά το δυνατόν η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Η συλλογή των δειγμάτων βιοψίας πλακούντα έγινε σε όλες τις περιπτώσεις από τη μητρική πλευρά του πλακούντα, από τμήματα χωρίς θρόμβωση ή αιμόλυση. Για τη συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος εγκύων χρησιμοποιήθηκε αντιπηκτικό K3EDTA το οποίο προστατεύει τη μεμβράνη των λευκοκυττάρων και εμποδίζει τη λύση τους [246]. Η απομόνωση του πλάσματος έγινε το αργότερο τέσσερις ώρες μετά την αιμοληψία. Το πλάσμα απομονώθηκε με δύο διαδοχικές

φυγοκεντρήσεις, σε μεγάλη ταχύτητα, για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Επειδή η συλλογή των δειγμάτων τόσο βιοψίας πλακούντα όσο και περιφερικού αίματος έγινε σε διάφορους χρόνους, τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C σε στείρες συνθήκες.

Για όλες τις εγκύους τηρήθηκε λεπτομερές ιστορικό με σύστημα καταγραφής σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μετά τον τοκετό και αφού είχε διαπιστωθεί κλινικά η έκβαση της κύησης και η εμφάνιση ή μη επιπλοκών, επιλέχθηκαν για ανάλυση μόνο δείγματα που δεν είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για άλλο σκοπό δεδομένου ότι επαναλαμβανόμενη επεξεργασία (ψύξη και απόψυξη) των δειγμάτων προκαλεί αποδόμηση των miRNAs και πιθανή επιμόλυνση [246]. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για ανάλυση ομαδοποιήθηκαν με βάση τον υπότυπο της επιπλοκής (πρώιμης ή όψιμης έναρξης) και τα ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου (ηλικία, BMI). Πριν την ανάλυση σε όλα τα δείγματα έγινε ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικού RNA και έλεγχος καθαρότητας. Ακολουθούσε εμπλουτισμός σε miRNAs με εμπορικά διαθέσιμο kit που επιλέχθηκε ανάλογα με τη φύση του υπό ανάλυση δείγματος (ιστός, βιολογικό υγρό).

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs αποτελούν σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία μεθόδους επιλογής για την ανίχνευση «βιοδεικτών». Έχουν τη δυνατότητα να ερευνούν ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό μορίων miRNA, να ανιχνεύουν ποιοτικές αλλά και ποσοτικές αλλαγές στην έκφραση και να ταυτοποιούν τελικά «πάνελ» βιολογικών δεικτών που παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Για να αυξηθεί περαιτέρω η αξιοπιστία και η ευαισθησία στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων τέθηκαν αυστηρά όρια κανονικοποίησης και στατιστικής σημαντικότητας κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση. Επιπλέον, σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, ποσοτικές διαφορές επιβεβαιώθηκαν σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων, με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (qRT-PCR) η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών.

Λόγω του κεντρικού ρόλου του πλακούντα στην εμφάνιση της Προεκλαμψίας, στη 1η φάση της μελέτης πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα από εγκύους με την επιπλοκή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για την εκτίμηση της παθογενετικής βάσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνολογίας των miRNA μικροσυστοιχιών η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση των μορίων αυτών.

Μελετήθηκαν συνολικά 16 δείγματα βιοψίας πλακούντα από εγκύους με Προεκλαμψία από τις οποίες 11 εμφάνισαν τον πρώιμης έναρξης υπότυπο και 5 τον όψιμης έναρξης. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 8 δείγματα από εγκύους με ανεπίπλεκτες κύσεις αντίστοιχης ηλικίας

κύησης. Δεδομένου ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι υψηλής απόδοσης (high throughput) και δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού miRNAs που εκφράζονται σε ένα βιολογικό υλικό τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, αυτός ο αριθμός δειγμάτων κρίνεται, σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα, ικανοποιητικός για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Ανιχνεύθηκαν 44 miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση σε πλακούντες εγκύων με Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$ και $FC > 2$). *In silico* ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής έδειξε ότι τα γονίδια - στόχοι των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία εμπλέκονται σε σηματοδοτικές οδούς που σχετίζονται με την εμφάνιση της επιπλοκής όπως είναι η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των τροφοβλαστικών και ενδοθηλιακών κυττάρων, η αγγειογένεση και η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος.

Τα ευρήματα της ανάλυσης της έκφρασης των miRNAs του πλακούντα με miRNA μικροσυστοιχίες επιβεβαιώνουν την υπερέκφραση των miR-155, miR-130b και miR-518a-5p/miR-527 και την μειωμένη έκφραση του miR-126* σε κύσεις με Προεκλαμψία [188,206,213,233,247-249]. Τα miR-155 και miR-130b εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό της επιπλοκής μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων στη σηματοδοτική οδό TGF- β (Transforming Growth Factor beta) των τροφοβλαστικών κυττάρων [188,206,213,233,247]. Επιπλέον, το miR-130b έχει συσχετιστεί με τη διαδικασία της λιπογένεσης και το BMI των εγκύων. Είναι γνωστό ότι έγκυες με BMI $> 35 \text{ Kg/m}^2$ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Προεκλαμψίας [250-252]. Το miR-518a-5p/miR-527 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *IL7RD* (Recombinant Human Interleukin 7) σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και η υπερέκφρασή του έχει συνδεθεί με έντονη φλεγμονώδη αντίδραση μέσω ενίσχυσης των Th17 (T helper) κυττάρων και αύξησης της παραγωγής IL17 από τα κύτταρα αυτά [248,249]. Υπερέκφραση του miR-518a-5p/miR-527 έχει αναφερθεί σε υλικό βιοψίας πλακούντα από κύσεις με Προεκλαμψία σε έδαφος προϋπάρχουσας υπέρτασης [219]. Το miR-518a-5p/miR-527 ανήκει στο C19MC του πλακούντα αλλά κατά τη διάρκεια της κύησης έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται και στο περιφερικό αίμα της εγκύου.

Υπερέκφραση του miR-126 και του ισόμορφου miR-126* έχει αναφερθεί στον πλακούντα και το περιφερικό αίμα εγκύων με Προεκλαμψία όπου, σύμφωνα με ευρήματα λειτουργικών μελετών, ρυθμίζει την έκφραση των αγγειογενετικών γονιδίων *VEGF* (Vascular endothelial growth factor A), *VCAM1* (Vascular cell adhesion 1) και του αντι-αγγειογενετικών γονιδίου *PIK3R2* (Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit) στη σηματοδοτική οδό PI3K-AKT [214,232,253]. Στην παρούσα μελέτη, με τη χρήση της βάσης δεδομένων KEGG, διαπιστώθηκε ότι το miR-126* έχει ως γονίδια στόχους τα *ADAM9* (A disintegrin and metalloproteinase 9), *MMP7* (Matrix Metalloproteinases 7), *MMP13*, *VEGFA* και *VCAM1*

που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά μελετώνται εκτενώς ως υποψήφιοι βιοδείκτες πρώιμης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας [214,216,253,254].

Σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των miR-423-3p, miR-124*, miR-431 και miR-1305 καθώς και η υπόεκφραση των miR-144 και miR-3942. Αυτά τα miRNAs δεν έχουν προς το παρόν τουλάχιστον συσχετιστεί άμεσα με τον παθογενετικό μηχανισμό της επιπλοκής. Το miR-423-3p έχει συνδεθεί με τον πολλαπλασιασμό των νεφρικών κυττάρων, τη νεφρική λειτουργία και την οξεία νεφρική ανεπάρκεια [255,256]. Μελέτες εμπλέκουν το miR-124 στην αγγειογένεση και τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω της σηματοδοτικής οδού ρενίνης - αγγειοτενσίνης [257]. Το miR-1305 μέσω των γονιδίων - στόχων *CDK6* (*Cyclin dependent kinase 6*), *CYCLIN D2* και *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 2*) συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση των πολυδύναμων (pluripotent) βλαστικών κυττάρων [258]. Το miR-431, το οποίο ανήκει στο C14MC σύμπλεγμα του πλακούντα, ρυθμίζει την έκφραση του *SMAD4* (*Small mothers against decapentaplegic 4*) γονιδίου [259]. Η αυξημένη έκφρασή του, ρυθμίζει αρνητικά το γονίδιο *IGF1R* (*Insulin Like Growth Factor Receptor 1*), αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της σηματοδοτικής οδού MAPK και έχει μελετηθεί για το ρόλο του στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων, η οποία αποτελεί κοινό εύρημα στο διαβήτη και την υπέρταση [260].

Κατά τη στατιστική ανάλυση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση σε υλικό βιοψίας πλακούντα από κήσεις με Προεκλαμψία διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των miR-500a, miR-383, miR-518a-5p /miR-527, miR-431, miR-423-3p, miR-124*, miR-1183 και miR-130b και η μειωμένη έκφραση των miR-3942 και miR-544b παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση ($AUC > 0.8$, $p \text{ value} < 0.05$) με τη διάγνωση της επιπλοκής, γεγονός που τα καθιστά σημαντικούς υποψήφιους διαγνωστικούς βιοδείκτες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση με τον υπότυπο της επιπλοκής και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των miR-423, miR-124* και miR-431 και η μειωμένη έκφραση των miR-544b και miR-3942 στον πλακούντα πιθανώς σχετίζεται με τη διάγνωση Προεκλαμψίας με πρώιμη έναρξη και βαριά συμπτωματολογία. Η υπερέκφραση του miRNA-518a-5p/miR-527 σε πλακούντες από κήσεις με Προεκλαμψία <34 εβδομάδες κύησης σε σχέση με τον όψιμης έναρξης υπότυπο, με παρουσία ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου και πρωτεϊνουρία καθιστά το μόριο αυτό πιθανό βιοδείκτη για τη διαφορική διάγνωση και την πρόβλεψη της βαρύτητας της επιπλοκής. Ωστόσο, πριν τη χρησιμοποίησή τους σε κλινικό επίπεδο θα απαιτηθεί περαιτέρω επιβεβαίωση και αξιολόγηση των ευρημάτων και σε ευρείας κλίμακας μελέτες.

Κατά την 2^η φάση της μελέτης έγινε προσπάθεια ανίχνευσης διαφορών στην έκφραση των ελεύθερων miRNAs στο περιφερικό αίμα εγκύων το 1^ο τρίμηνο της κύησης που αργότερα, το 3^ο τρίμηνο της κύησης, εμφάνισαν Προεκλαμψία σε σχέση με εγκύους με φυσιολογική πορεία και έκβαση της κύησης, με σκοπό την ταυτοποίηση υποψήφιων βιοδεικτών πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου και τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της επιπλοκής ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με σύστημα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq που βασίζεται στην «παραλληλοποίηση» της διαδικασίας αλληλούχισης, γεγονός που διευκολύνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της πρωτοταγούς διαδοχής των βάσεων σε εκατομμύρια αλληλουχίες. Η επεκτασιμότητα, η ταχύτητα αλλά κυρίως η σχέση κόστους - απόδοσης των συστημάτων miSeq επιτρέπουν τη μελέτη του συνόλου των μορίων σε ένα βιολογικό σύστημα, σε επίπεδο που δεν ήταν δυνατό μέχρι σήμερα και την ταυτοποίηση νέων μορίων (novel miRNAs) τα οποία δεν έχουν έως τώρα καταγραφεί στη βιβλιογραφία, με μεγάλη ευαισθησία. Σε αντίθεση με άλλες τεχνολογίες μαζικής ανάλυσης του γονιδιώματος, όπως οι μικροσυστοιχίες, οι μέθοδοι miSeq εξακολουθούν να έχουν μεγάλο κόστος παρά το ότι ελαττώνεται συνεχώς με την εισαγωγή νέων οργάνων. Επιπλέον μειονεκτήματα αποτελούν η ποσότητα και καθαρότητα του RNA που απαιτείται για την αλληλούχιση καθώς και η υπολογιστική υποδομή για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση δειγμάτων από εγκύους που εμφάνισαν Προεκλαμψία όψιμης έναρξης η οποία παρά το ότι χαρακτηρίζεται από πιο ήπιο κλινικό φαινότυπο σε σχέση με την πρώιμης έναρξης Προεκλαμψία, αποτελεί ποσοστό περίπου 80% των περιστατικών με την επιπλοκή [261].

Επιλέχθηκε η ανάλυση πλάσματος εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι ανακτώνται μεγαλύτερες ποσότητες miRNAs σε σχέση με την ανάλυση του ορού.

Αναλύθηκαν 17 δείγματα πλάσματος από ισάριθμες εγκύους στο πρώτο τρίμηνο της κύησης που αργότερα, μετά την 20^η εβδομάδα, εμφάνισαν όψιμου τύπου Προεκλαμψία και 17 από εγκύους χωρίς την επιπλοκή. Απ' όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, η μελέτη είναι η πρώτη διεθνώς που εξετάζει την έκφραση των ελεύθερων miRNAs στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση όψιμης έναρξης Προεκλαμψίας το 1ο τρίμηνο της κύησης και μια από τις πρώτες στις οποίες εφαρμόζεται η τεχνολογία μαζικής αλληλούχισης miSeq για την ταυτοποίηση υποψήφιων βιοδεικτών για πρώιμη πρόβλεψη της επιπλοκής. Οι περισσότερες μελέτες έχουν υλοποιηθεί με δείγματα που συλλέχθηκαν το 2^ο ή και το 3^ο τρίμηνο της κύησης με ήδη διαγνωσμένη Προεκλαμψία [174,262-265] ή από το πρώτο τρίμηνο με τη χρήση μικροσυστοιχιών [266] ή qRT-PCR [267].

Με την τεχνική μαζικής παράλληλης αλληλούχισης miSeq ταυτοποιήθηκαν 4 miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία, 2 με σημαντική υπερέκφραση [miR-525-5p ($p < 0.04$), miR-548e-3p ($p < 0.038$)] και 2 με μειωμένη έκφραση [miR-99b-5p, ($p < 0.025$), miR-23b-5p ($p < 0.046$)]. *In silico* ανάλυση έδειξε ότι τα γονίδια - στόχοι αυτών των miRNAs εμπλέκονται σε σηματοδοτικές οδούς που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τη φλεγμονώδη αντίδραση και το μεταβολισμό μέσω αρνητικής ρύθμισης του *AKT (Protein Kinase B)* στη σηματοδοτική οδό της ινσουλίνης.

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης σε κλινικό επίπεδο των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων που αργότερα εμφάνισαν όψιμης έναρξης Προεκλαμψία. Με πολυπαραγοντική ανάλυση σε συνδυασμό με ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου και κλινικά/εργαστηριακά στοιχεία διαπιστώθηκαν οκτώ συνδυασμοί δεικτών με δυνατότητα πρώιμης ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου με ευαισθησία $> 60\%$ και ειδικότητα $> 70\%$. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός miR-525-5p - PAPP-A - MAP που παρουσιάζει 100% ειδικότητα και 73% ευαισθησία και ο συνδυασμός miR-525-5p - PAPP-A - UtPI με 90% ευαισθησία και 76% ειδικότητα. Τα ευρήματα αυτά παρά το ότι απαιτούν περαιτέρω αξιολόγηση σε ευρείας κλίμακας μελέτες, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τον εντοπισμό υποψήφιων μη επεμβατικών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης κήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας, να βελτιώσουν τις δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης και να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο του προγεννητικού screening 1ου τριμήνου προσφέροντας εφησυχασμό στους υποψήφιους γονείς για την πορεία και την έκβαση της κύησης.

Τα αποτελέσματα της μελέτη δείχνουν υπερέκφραση του miR-525-5p στο πλάσμα εγκύων το 1^ο τρίμηνο της κύησης που αργότερα εμφάνισαν όψιμης έναρξης Προεκλαμψία. Υπερέκφραση του miR-525-5p έχει επίσης αναφερθεί στο πλάσμα εγκύων με Προεκλαμψία βαριάς συμπτωματολογίας το 3^ο τρίμηνο της κύησης (29 - 33 εβδομάδες κύησης) [176]. Αντιθέτως, πρόσφατα ευρήματα των Hromadnikova και συν. αναφέρουν, με qRT-PCR, μειωμένη έκφραση του μορίου στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας, υπέρτασης της κύησης ή/και υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου το 1^ο τρίμηνο της κύησης [267]. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα αποδίδονται πιθανώς στο μικρό αριθμό δειγμάτων που περιλαμβάνονται σε κάθε μελέτη, την ετερογένεια των κλινικών χαρακτηριστικών των εγκύων και τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση.

Απορρύθμιση της έκφρασης του miR-23b-5p στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας αναφέρεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Το miR-23b-5p ανήκει στο σύμπλοκο miR-23b/27b/24-1 το οποίο έχει χαρτογραφηθεί στο 4^ο ιντρόνιο γονιδίου που κωδικοποιεί μια αμινοπεπτιδάση αλανίνης στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί ένα μακρύ μετάγραφο στον άνθρωπο γνωστό ως Chromosome 9 open reading frame 3

(C9orf3) [268]. Πρόκειται για ένα miRNA που συμμετέχει στη ρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών λειτουργιών και σηματοδοτικών οδών που σχετίζονται με καρκινογένεση, καρδιαγγειακά νοσήματα και θυρεοειδοπάθειες καθώς και τη φλεγμονώδη αντίδραση σε αυτοάνοσες ασθένειες όπου δρα προστατευτικά [268,269].

Αποτελέσματα *ερευνητικών μελετών* με χρήση νεοπλασματικών κυττάρων έχουν δείξει ότι το miR-23b-3p δρα είτε ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο μέσω mRNA των γονιδίων - στόχων *Trp53 (Tumor protein p53)*, *NFkB (Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells)* και *STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)* και εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, τη διείσδυση, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό [270]. Ελαττωμένη έκφραση του miR-23b-3p έχει παρατηρηθεί σε υλικό βιοψίας καρκίνου παχέος εντέρου χαμηλής διεισδυτικότητας. Αντιθέτως, στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο στομάχου αναφέρεται υπερέκφραση του miR-23b πιθανώς λόγω αποσιώπησης του προ-αποπτωτικού παράγοντα PDCD4 και καταστολής των αποπτωτικών μηχανισμών των καρκινικών κυττάρων [271].

Μελέτη αποσιώπησης του miR-23b σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου (Human umbilical vein EC line - HUVECs) έδειξε ότι η έκφραση του μορίου αυτού ενεργοποιεί την αγγειογένεση μέσω της μετα-μεταγραφικής αποσιώπησης των αντι-αγγειογενετικών γονιδίων *Sprouty2* και *Sema6A* που ασκούν αρνητική ρύθμιση των σηματοδοτικών οδών VEGFR2, VEGFR και MAPK [272]. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με λειτουργικές μελέτες σε κύτταρα αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMCs). Στη μελέτη αυτή προσθήκη ανασταλτικών παραγόντων οδήγησε σε πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των VSMC, μέσω των γονιδίων - στόχων *SMAD3* και *FOXO4 (Forkhead Box 4)*, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των λείων μυϊκών ινών των αγγείων [269]. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μετά από προσθήκη miRNA - μιμητών.

Το miR-23b-5p, μέσω ελέγχου της παραγωγής των κυτοκινών όπως των IL17, IL-1B, TNF, το miR-23b-5p συμβάλλει στην ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Οι Leone και συν., έδειξαν ότι στα θυρεοειδικά θυλακικά κύτταρα μετά τη θεραπεία με την ορμόνη TSH (Thyroid Follicular Hormone) υπάρχει αύξηση του miR-23b-5p η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση της φάσης S του κυτταρικού κύκλου [273]. Το miR-23b-5p αναστέλλει τη σηματοδοτική οδό TGFβ/Smad3 με αποτέλεσμα την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και την αύξηση των θυρεοειδικών θυλακικών κυττάρων. Επιπλέον, ελάττωση της έκφρασης του miR-23b-5p ενεργοποιεί την έκφραση της IL17 και την ανοσολογική αντίδραση [273]. Πρόσφατα, οι Kilic και συν. διαπίστωσαν το σημαντικό του ρόλο στη διατήρηση του φαινοτύπου των T helper (Th2) κυττάρων μέσω της σηματοδοτικής οδού EGFR1 (Epidermal Growth Factor Receptor 1) [274]. Στην παρούσα μελέτη, η μείωση της

έκφρασης του miR-23b-5p στο περιφερικό αίμα εγκύων, θα μπορούσε να συνδεθεί με την ελάττωση των Th2 κυττάρων και την υπερέκφραση Th17 κυττάρων με περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και της έκφρασης κυτοκινών (IL17), δύο μηχανισμούς με σημαντικό ρόλο στη γενικευμένη φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στην Προεκλαμψία.

Η ελαττωμένη έκφραση του miR-99b στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση όψιμης έναρξης Προεκλαμψίας το 1^ο τρίμηνο της κύησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, που διαπιστώθηκε στη μελέτη επιβεβαιώνει τα ευρήματα πρόσφατης δημοσίευσης των Yoffe και συν. που συμπεριλαμβάνει το miR-99b σε ομάδα μη κωδικοποιών RNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία (πρώιμης και όψιμης έναρξης) σε σχέση με εγκύους με νορμοτασική κύηση [234]. Το miR-99b-5p έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19, στην περιοχή q13.41 και ανήκει σε συνεργειακό σύμπλοκο (cluster) με το miR-125a και το Let-7e. Η αλληλουχία του είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία του 3'-UTR στη θέση 289-295 του mTOR [275]. Διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-99b έχει περιγραφεί σε ασθενείς με καρκίνο ήπατος, νεφρών, πνευμόνων και ενδομητρίου όπου δρα ογκοκατασταλτικά [276,277].

Το miR-99b-5p συμμετέχει ενεργά στην αναγέννηση των νευρώνων μετά από τραυματισμό, την αναπαραγωγή ανοσοκατασταλτικών παραγόντων υπεύθυνων για την καταστολή των T λεμφοκυττάρων και την απόπτωση των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος [278-281]. Πειραματικά δεδομένα από μελέτες με τη χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων έδειξαν ότι το miR-99b συμβάλλει στη διαφοροποίηση τους σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω αύξησης της μεταγραφής των γονιδίων *Pecam 1* και *Cadherin* [278]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μέλη του συμπλόκου miR-99b/ miR-125a /Let-7e συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη και την απόπτωση των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος καθώς επίσης και την αναπαραγωγή ανοσοκατασταλτικών παραγόντων που εμπλέκονται στην καταστολή των T λεμφοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης του γονιδίου *STAT3* [281,282].

In silico ανάλυση έδειξε ότι το miR-99b εμπλέκεται στη σηματοδοτική οδό του μεμβρανικού υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων mTORC2 που ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό AKT (Protein Kinase B). Η AKT, μέσω της σηματοδοτικής οδού της ινσουλίνης ενισχύει είτε άμεσα είτε έμμεσα την έκφραση του VEGF (Vascular endothelial growth factor) κατά το αρχικό στάδιο της αγγειογένεσης στον πλακούντα και ρυθμίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη διατήρηση του μεταβολισμού σε συνθήκες υποξίας [283,284]. Η αυξημένη παραγωγή νιτρικών (NO) ενεργοποιεί, μέσω της mTOR, τη σηματοδοτική οδό AKT με αποτέλεσμα ενίσχυση των μεταγραφικών παραγόντων HIF1α (Hypoxia Inducible Factor 1α) and HIF2α και αύξηση της έκφρασης του VEGF και των γλυκολυτικών ενζύμων για τη διατήρηση του μεταβολισμού. Αντιθέτως, απενεργοποίηση της

AKT αυξάνει την έκφραση του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα sEng (soluble Endoglin), καταστέλλει την αγγειογένεση και το μεταβολισμό γεγονός του έχει συνδεθεί με την εμφάνιση Προεκλαμψίας [285]. Παρόμοιος ρόλος έχει αναφερθεί και για το miR-155 το οποίο υπερεκφράζεται σε υλικό βιοψίας πλακούντα σε εγκύους με Προεκλαμψία και σχετίζεται με τη ρύθμιση του *FOXO3a* (*Forkhead Box*) ρυθμίζοντας τη σηματοδοτική οδό insulin/PI3K/AKT [286].

Πρόσφατα σε πειραματόζωα με ετερόπλευρη νεφρεκτομή μετά από χορήγηση DOCA (deoxycorticosterone acetate) σε συνδυασμό με αλατούχο διάλυμα (1% NaCl) παρατηρήθηκε υπέρταση, καρδιακή και νεφρική βλάβη [287]. Στους υπερτροφικούς καρδιακούς ιστούς διαπιστώθηκε η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της pAMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase), αύξηση της έκφρασης του miR-155 και μείωση της έκφρασης του miR-99b. Χορήγηση μετοφορμίνης οδήγησε σε αποκατάσταση της καρδιακής και νεφρικής λειτουργίας και επαναφορά των επιπέδων έκφρασης των δυο miRNAs στο φυσιολογικό επίπεδο [288]. Η διαπίστωση ότι η μετοφορμίνη, η οποία ενεργοποιεί τη ρυθμιστική οδό AMPK και χορηγείται σε ασθενείς με διαβήτη, αποκαθιστά τα επίπεδα των miRNAs και την καρδιακή λειτουργία σε φυσιολογικά επίπεδα θα μπορούσε να οδηγήσει στην περαιτέρω μελέτη της χρήσης των miR-99b και miR-155 ως πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την Προεκλαμψία.

6.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της μελέτης επιβεβαιώνουν τη διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs στον πλακούντα και το περιφερικό αίμα εγκύων με Προεκλαμψία και δείχνουν δυνατότητα χρησιμοποίησης των μορίων αυτών ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόβλεψη, πρόληψη και θεραπευτική αντιμετώπιση της επιπλοκής.

Μελέτη του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε υλικό βιοψίας πλακούντα εγκύων με Προεκλαμψία σε σχέση με εγκύους χωρίς την επιπλοκή οδήγησε στη ταυτοποίηση 10 miRNAs (miR-500a, miR-383, miR-518a-5p/miR-527, miR-431, miR-423-3p, miR-124*, miR-1183, miR-130b, miR-3942 και miR-544b) με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στην Προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στατιστική ανάλυση με κατασκευή καμπυλών ROC και μονομεταβλητή λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε σημαντική συσχέτιση των miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση με τον υπότυπο της επιπλοκής και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των miR-423, miR-124* και miR-431 και η μειωμένη έκφραση των miR-544b και miR-3942 στον πλακούντα σχετίζεται με τη διάγνωση Προεκλαμψίας με πρόωμη έναρξη και βαριά συμπτωματολογία. Η υπερέκφραση του miRNA-518a-5p/miR-527 σε πλακούντες από

κνήσεις με Προεκλαμψία πρώιμης έναρξης κύησης σε σχέση με τον όψιμης έναρξης υπότυπο συνδέεται με παρουσία ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου και πρωτεϊνουρία γεγονός που καθιστά το μόριο αυτό πιθανό βιοδείκτη για διάγνωση, διαφορική διάγνωση και πρόβλεψη της βαρύτητας της επιπλοκής.

Συγκριτική ανάλυση του προτύπου έκφρασης των miRNAs πλάσματος εγκύων από κνήσεις με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία και κνήσεις χωρίς την επιπλοκή οδήγησε στον εντοπισμό 4 miRNAs με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με όψιμης έναρξης Προεκλαμψία, 2 με σημαντική υπερέκφραση [miR-525-5p, miR-548e-3p] και 2 με μειωμένη έκφραση [miR-99b-5p, miR-23b-5p]. *In silico* ανάλυση με μεθόδους βιοπληροφορικής αποκάλυψε ότι τα γονίδια - στόχοι των miRNAs εμπλέκονται σε ρυθμιστικές οδούς που σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση και τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων, τη φλεγμονώδη αντίδραση, την αγγειογένεση και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων επιλεγμένων miRNA (miR-525-5p, miR-548e-3p, miR-99b-5p και miR-23b-5p) στο περιφερικό αίμα εγκύων, το 1^ο τρίμηνο της κύησης σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με συγκεκριμένα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά για πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής με ευαισθησία >60% και ειδικότητα >70%. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός miR-525-5p - PAPP-A - MAP που έχει 100% ειδικότητα και 73% ευαισθησία και ο συνδυασμός miR-548e-3p - PAPP-A - UtPI με 90% ευαισθησία και 76% ειδικότητα.

Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, παρά το ότι απαιτούν περαιτέρω αξιολόγηση σε ευρείας κλίμακας μελέτες ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τον εντοπισμό υποψήφιων βιοδεικτών που θα μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης κνήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας, να βελτιώσουν τις δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης και να προσφέρουν εφησυχασμό στους υποψήφιους γονείς για την πορεία και την έκβαση της κύησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc, "Pre-eclampsia," *Lancet*, vol. 365, no. 9461, pp. 785-799, 2005.
2. E. A. Steegers, P. von Dadelszen, J. J. Duvekot, R. Pijnenborg, "Pre-eclampsia," *Lancet*, vol. 376, no. 9741, pp. 631-644, 2010.
3. C. Ronsmans, W. J. Graham, g. Lancet Maternal Survival Series steering, "Maternal mortality: who, when, where, and why," *Lancet*, vol. 368, no. 9542, pp. 1189-1200, 2006.
4. P. von Dadelszen, L. A. Magee, "Pre-eclampsia: an update," *Current hypertension reports*, vol. 16, no. 8, pp. 454, 2014.
5. E. V. Kuklina, C. Ayala, W. M. Callaghan, "Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States," *Obstetrics and gynecology*, vol. 113, no. 6, pp. 1299-1306, 2009.
6. J. Poeran, S. Denktas, E. Birnie, G. J. Bonzel, E. A. Steegers, "Urban perinatal health inequalities," *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*, vol. 24, no. 4, pp. 643-646, 2011.
7. J. P. de Graaf, A. C. Ravelli, M. A. de Haan, E. A. Steegers, G. J. Bonzel, "Living in deprived urban districts increases perinatal health inequalities," *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*, vol. 26, no. 5, pp. 473-481, 2013.
8. X. Li, W. Zhang, J. Lin *et al.*, "Risk factors for adverse maternal and perinatal outcomes in women with preeclampsia: analysis of 1396 cases," *Journal of clinical hypertension*, vol. 20, no. 6, pp. 1049-1057, 2018.
9. R. L. Goldenberg, E. M. McClure, E. R. Macguire, B. D. Kamath, A. H. Jobe, "Lessons for low-income regions following the reduction in hypertension-related maternal mortality in high-income countries," *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, vol. 113, no. 2, pp. 91-95, 2011.
10. B. M. Sibai, M. Lindheimer, J. Hauth *et al.*, "Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units," *The New England journal of medicine*, vol. 339, no. 10, pp. 667-671, 1998.
11. L. C. Chappell, S. Enye, P. Seed *et al.*, "Adverse perinatal outcomes and risk factors for preeclampsia in women with chronic hypertension: a prospective study," *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 1002-1009, 2008.
12. K. Duckitt, D. Harrington, "Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies," *Bmj*, vol. 330, no. 7491, pp. 565, 2005.
13. D. B. Carr, M. Epplein, C. O. Johnson, T. R. Easterling, C. W. Critchlow, "A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 193, no. 3 Pt 2, pp. 965-972, 2005.
14. F. M. Fong, M. K. Sahemey, G. Hamedi *et al.*, "Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review," *Am J Epidemiol*, vol. 180, no. 4, pp. 335-345, 2014.
15. A. L. Tranquilli, G. Dekker, L. Magee *et al.*, "The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP," *Pregnancy Hypertens*, vol. 4, no. 2, pp. 97-104, 2014.
16. O. American College of, Gynecologists, P. Task Force on Hypertension in, "Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy," *Obstetrics and gynecology*, vol. 122, no. 5, pp. 1122-1131, 2013.
17. T. L. Wheeler, 2nd, D. W. Blackhurst, E. H. Dellinger, P. S. Ramsey, "Usage of spot urine protein to creatinine ratios in the evaluation of preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 196, no. 5, pp. 465 e461-464, 2007.
18. N. S. Fox, M. Huang, S. T. Chasen, "Second-trimester fetal growth and the risk of poor obstetric and neonatal outcomes," *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 32, no. 1, pp. 61-65, 2008.

19. M. Morikawa, T. Yamada, T. Yamada *et al.*, "Pregnancy outcome of women who developed proteinuria in the absence of hypertension after mid-gestation," *Journal of perinatal medicine*, vol. 36, no. 5, pp. 419-424, 2008.
20. M. A. Brown, M. D. Lindheimer, M. de Swiet, A. Van Assche, J. M. Moutquin, "The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)," *Hypertension in pregnancy*, vol. 20, no. 1, pp. IX-XIV, 2001.
21. A. M. Thomson, F. E. Hytten, W. Z. Billewicz, "The epidemiology of oedema during pregnancy," *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*, vol. 74, no. 1, pp. 1-10, 1967.
22. M. L. Mongraw-Chaffin, P. M. Cirillo, B. A. Cohn, "Preeclampsia and cardiovascular disease death: prospective evidence from the child health and development studies cohort," *Hypertension*, vol. 56, no. 1, pp. 166-171, 2010.
23. L. Mosca, E. J. Benjamin, K. Berra *et al.*, "Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association," *Circulation*, vol. 123, no. 11, pp. 1243-1262, 2011.
24. H. U. Irgens, L. Reisaeter, L. M. Irgens, R. T. Lie, "Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study," *Bmj*, vol. 323, no. 7323, pp. 1213-1217, 2001.
25. B. W. J. Mol, C. T. Roberts, S. Thangaratinam *et al.*, "Pre-eclampsia," *Lancet*, vol. 387, no. 10022, pp. 999-1011, 2016.
26. E. F. Funai, O. B. Paltiel, D. Malaspina *et al.*, "Risk factors for pre-eclampsia in nulliparous and parous women: the Jerusalem perinatal study," *Paediatric and perinatal epidemiology*, vol. 19, no. 1, pp. 59-68, 2005.
27. P. R. Romundstad, E. B. Magnussen, G. D. Smith, L. J. Vatten, "Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: common antecedents?," *Circulation*, vol. 122, no. 6, pp. 579-584, 2010.
28. L. Myatt, J. M. Roberts, "Preeclampsia: Syndrome or Disease?," *Current hypertension reports*, vol. 17, no. 11, pp. 83, 2015.
29. P. Gathiram, J. Moodley, "Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology," *Cardiovascular journal of Africa*, vol. 27, no. 2, pp. 71-78, 2016.
30. V. S. Kuo, G. Koumantakis, E. D. Gallery, "Proteinuria and its assessment in normal and hypertensive pregnancy," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 167, no. 3, pp. 723-728, 1992.
31. C. S. Homer, M. A. Brown, G. Mangos, G. K. Davis, "Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension," *Journal of hypertension*, vol. 26, no. 2, pp. 295-302, 2008.
32. T. J. Cade, S. A. Gilbert, A. Polyakov, A. Hotchin, "The accuracy of spot urinary protein-to-creatinine ratio in confirming proteinuria in pre-eclampsia," *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, vol. 52, no. 2, pp. 179-182, 2012.
33. R. K. Morris, R. D. Riley, M. Doug, J. J. Deeks, M. D. Kilby, "Diagnostic accuracy of spot urinary protein and albumin to creatinine ratios for detection of significant proteinuria or adverse pregnancy outcome in patients with suspected pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis," *Bmj*, vol. 345, no. pp. e4342, 2012.
34. M. A. Brown, "Pre-eclampsia: proteinuria in pre-eclampsia-does it matter any more?," *Nature reviews. Nephrology*, vol. 8, no. 10, pp. 563-565, 2012.
35. C. Lane, M. Brown, W. Dunsmuir, J. Kelly, G. Mangos, "Can spot urine protein/creatinine ratio replace 24 h urine protein in usual clinical nephrology?," *Nephrology*, vol. 11, no. 3, pp. 245-249, 2006.
36. C. M. Salafia, J. C. Pezzullo, A. Ghidini, J. A. Lopez-Zeno, S. S. Whittington, "Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre-eclampsia," *Placenta*, vol. 19, no. 1, pp. 67-72, 1998.
37. R. A. North, C. Ferrier, D. Long, K. Townend, P. Kincaid-Smith, "Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation," *Obstetrics and gynecology*, vol. 83, no. 3, pp. 378-386, 1994.
38. Y. Zhong, M. Tuuli, A. O. Odibo, "First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction," *Prenatal diagnosis*, vol. 30, no. 4, pp. 293-308, 2010.

39. A. C. o. P. Bulletins, "ACOG Practice Bulletin. Chronic hypertension in pregnancy. ACOG Committee on Practice Bulletins," *Obstetrics and gynecology*, vol. 98, no. 1, pp. suppl 177-185, 2001.
40. A. C. o. P. Bulletins--Obstetrics, "ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002," *Obstetrics and gynecology*, vol. 99, no. 1, pp. 159-167, 2002.
41. M. C. Chames, J. C. Livingston, T. S. Ivester, J. R. Barton, B. M. Sibai, "Late postpartum eclampsia: a preventable disease?," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 186, no. 6, pp. 1174-1177, 2002.
42. J. M. Alexander, D. D. McIntire, K. J. Leveno, F. G. Cunningham, "Selective magnesium sulfate prophylaxis for the prevention of eclampsia in women with gestational hypertension," *Obstetrics and gynecology*, vol. 108, no. 4, pp. 826-832, 2006.
43. B. M. Sibai, "Diagnosis, prevention, and management of eclampsia," *Obstetrics and gynecology*, vol. 105, no. 2, pp. 402-410, 2005.
44. M. Habli, N. Eftekhari, E. Wiebracht *et al.*, "Long-term maternal and subsequent pregnancy outcomes 5 years after hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 201, no. 4, pp. 385 e381-385, 2009.
45. P. Committee on Obstetric, "Committee Opinion No. 623: Emergent therapy for acute-onset, severe hypertension during pregnancy and the postpartum period," *Obstetrics and gynecology*, vol. 125, no. 2, pp. 521-525, 2015.
46. S. D. Keiser, K. W. Boyd, J. F. Rehberg *et al.*, "A high LDH to AST ratio helps to differentiate pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) from HELLP syndrome," *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*, vol. 25, no. 7, pp. 1059-1063, 2012.
47. S. Caritis, B. Sibai, J. Hauth *et al.*, "Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units," *The New England journal of medicine*, vol. 338, no. 11, pp. 701-705, 1998.
48. A. Buchbinder, B. M. Sibai, S. Caritis *et al.*, "Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 186, no. 1, pp. 66-71, 2002.
49. D. Williams, "Long-term complications of preeclampsia," *Seminars in nephrology*, vol. 31, no. 1, pp. 111-122, 2011.
50. C. W. Redman, I. L. Sargent, "Immunology of pre-eclampsia," *American journal of reproductive immunology*, vol. 63, no. 6, pp. 534-543, 2010.
51. P. Fan, X. H. Liu, G. L. He *et al.*, "Maternal and fetal plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity and distribution in pre-eclampsia," *Pediatric research*, vol. 72, no. 4, pp. 426-431, 2012.
52. R. A. Lafayette, M. Druzin, R. Sibley *et al.*, "Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia," *Kidney Int*, vol. 54, no. 4, pp. 1240-1249, 1998.
53. N. Al-Jameil, F. Aziz Khan, M. Fareed Khan, H. Tabassum, "A brief overview of preeclampsia," *J Clin Med Res*, vol. 6, no. 1, pp. 1-7, 2014.
54. P. von Dadelszen, L. A. Magee, J. M. Roberts, "Subclassification of preeclampsia," *Hypertension in pregnancy*, vol. 22, no. 2, pp. 143-148, 2003.
55. D. Raymond, E. Peterson, "A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia," *Obstetrical & gynecological survey*, vol. 66, no. 8, pp. 497-506, 2011.
56. Y. Zhou, M. McMaster, K. Woo *et al.*, "Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome," *The American journal of pathology*, vol. 160, no. 4, pp. 1405-1423, 2002.
57. G. S. Whitley, J. E. Cartwright, "Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field," *Placenta*, vol. 31, no. 6, pp. 465-474, 2010.
58. Y. Zhou, S. J. Fisher, M. Janatpour *et al.*, "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?," *J Clin Invest*, vol. 99, no. 9, pp. 2139-2151, 1997.
59. F. J. Valenzuela, A. Perez-Sepulveda, M. J. Torres *et al.*, "Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component," *Journal of pregnancy*, vol. 2012, no. pp. 632732, 2012.

60. C. W. Redman, G. P. Sacks, I. L. Sargent, "Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 180, no. 2 Pt 1, pp. 499-506, 1999.
61. S. J. Germain, G. P. Sacks, S. R. Sooranna, I. L. Sargent, C. W. Redman, "Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles," *J Immunol*, vol. 178, no. 9, pp. 5949-5956, 2007.
62. C. W. Redman, I. L. Sargent, A. C. Staff, "IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia?," *Placenta*, vol. 35 Suppl, no. pp. S20-25, 2014.
63. B. D. LaMarca, J. Gilbert, J. P. Granger, "Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia," *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 982-988, 2008.
64. R. N. Taylor, J. Grimwood, R. S. Taylor *et al.*, "Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 188, no. 1, pp. 177-182, 2003.
65. A. M. Mercurio, E. A. Lipscomb, R. E. Bachelder, "Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer," *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, vol. 10, no. 4, pp. 283-290, 2005.
66. G. Fu, G. Ye, L. Nadeem *et al.*, "MicroRNA-376c impairs transforming growth factor-beta and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion," *Hypertension*, vol. 61, no. 4, pp. 864-872, 2013.
67. N. M. Hunkapiller, M. Gasperowicz, M. Kapidzic *et al.*, "A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia," *Development*, vol. 138, no. 14, pp. 2987-2998, 2011.
68. G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J*, vol. 13, no. 1, pp. 9-22, 1999.
69. N. Ferrara, H. P. Gerber, "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis," *Acta Haematol*, vol. 106, no. 4, pp. 148-156, 2001.
70. S. E. Maynard, J. Y. Min, J. Merchan *et al.*, "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia," *J Clin Invest*, vol. 111, no. 5, pp. 649-658, 2003.
71. L. Govender, I. Mackraj, P. Gathiram, J. Moodley, "The role of angiogenic, anti-angiogenic and vasoactive factors in pre-eclamptic African women: early- versus late-onset pre-eclampsia," *Cardiovascular journal of Africa*, vol. 23, no. 3, pp. 153-159, 2012.
72. E. A. Phipps, R. Thadhani, T. Benzinger, S. A. Karumanchi, "Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies," *Nature reviews. Nephrology*, vol. 15, no. 5, pp. 275-289, 2019.
73. S. Venkatesha, M. Toporsian, C. Lam *et al.*, "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia," *Nat Med*, vol. 12, no. 6, pp. 642-649, 2006.
74. D. S. Tannetta, R. A. Dragovic, C. Gardiner, C. W. Redman, I. L. Sargent, "Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, pp. e56754, 2013.
75. A. Wang, S. Rana, S. A. Karumanchi, "Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis," *Physiology (Bethesda)*, vol. 24, no. pp. 147-158, 2009.
76. F. Colucci, S. Boulenouar, J. Kieckbusch, A. Moffett, "How does variability of immune system genes affect placentation?," *Placenta*, vol. 32, no. 8, pp. 539-545, 2011.
77. K. Verdonk, W. Visser, A. H. Van Den Meiracker, A. H. Danser, "The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad," *Clin Sci (Lond)*, vol. 126, no. 8, pp. 537-544, 2014.
78. S. M. Bobst, M. C. Day, L. C. Gilstrap, 3rd, Y. Xia, R. E. Kellems, "Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion," *Am J Hypertens*, vol. 18, no. 3, pp. 330-336, 2005.
79. Y. Xia, R. E. Kellems, "Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond," *Circ Res*, vol. 113, no. 1, pp. 78-87, 2013.
80. C. Lam, K. H. Lim, S. A. Karumanchi, "Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia," *Hypertension*, vol. 46, no. 5, pp. 1077-1085, 2005.
81. E. Laresgoiti-Servitje, "A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia," *J Leukoc Biol*, vol. 94, no. 2, pp. 247-257, 2013.

82. S. Eghbal-Fard, M. Yousefi, H. Heydarlou *et al.*, "The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia," *J Cell Physiol*, vol. 234, no. 4, pp. 5106-5116, 2019.
83. A. Perez-Sepulveda, M. J. Torres, M. Khoury, S. E. Illanes, "Innate immune system and preeclampsia," *Front Immunol*, vol. 5, no. pp. 244, 2014.
84. W. Cao, X. Wang, T. Chen *et al.*, "The Expression of Notch/Notch Ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in Preeclampsia," *Dis Markers*, vol. 2015, no. pp. 316182, 2015.
85. S. Saito, M. Sakai, "Th1/Th2 balance in preeclampsia," *J Reprod Immunol*, vol. 59, no. 2, pp. 161-173, 2003.
86. H. Wang, M. Guo, F. Liu *et al.*, "Role of IL-17 Variants in Preeclampsia in Chinese Han Women," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, pp. e0140118, 2015.
87. M. D. Salazar Garcia, Y. Mobley, J. Henson *et al.*, "Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia," *J Reprod Immunol*, vol. 125, no. pp. 25-31, 2018.
88. R. B. Cincotta, S. P. Brennecke, "Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas," *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, vol. 60, no. 1, pp. 23-27, 1998.
89. K. Naruse, T. Tsunemi, N. Kawahara, H. Kobayashi, "Preliminary evidence of a paternal-maternal genetic conflict on the placenta: Link between imprinting disorder and multi-generational hypertensive disorders," *Placenta*, vol. no. pp., 2019.
90. P. J. Williams, F. Broughton Pipkin, "The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy," *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, vol. 25, no. 4, pp. 405-417, 2011.
91. E. Berzan, R. Doyle, C. M. Brown, "Treatment of preeclampsia: current approach and future perspectives," *Current hypertension reports*, vol. 16, no. 9, pp. 473, 2014.
92. "ACOG Practice Bulletin No. 202 Summary: Gestational Hypertension and Preeclampsia," *Obstetrics and gynecology*, vol. 133, no. 1, pp. 211-214, 2019.
93. K. Broekhuijsen, A. C. Ravelli, J. Langenveld *et al.*, "Maternal and neonatal outcomes of pregnancy in women with chronic hypertension: a retrospective analysis of a national register," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 94, no. 12, pp. 1337-1345, 2015.
94. L. M. De-Regil, K. B. Harding, M. L. Roche, "Preconceptional Nutrition Interventions for Adolescent Girls and Adult Women: Global Guidelines and Gaps in Evidence and Policy with Emphasis on Micronutrients," *J Nutr*, vol. 146, no. 7, pp. 1461S-1470S, 2016.
95. G. J. Hofmeyr, T. A. Lawrie, A. N. Atallah, L. Duley, "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. no. 8, pp. CD001059, 2010.
96. R. E. Allen, E. Rogozinska, K. Cleverly, J. Aquilina, S. Thangaratinam, "Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with preeclampsia: a meta-analysis," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 182, no. pp. 194-201, 2014.
97. O. American College of, B.-O. Gynecologists' Committee on Practice, "Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222," *Obstetrics and gynecology*, vol. 135, no. 6, pp. e237-e260, 2020.
98. G. J. Hofmeyr, T. A. Lawrie, A. N. Atallah, L. Duley, M. R. Torloni, "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. no. 6, pp. CD001059, 2014.
99. A. Benigni, G. Gregorini, T. Frusca *et al.*, "Effect of low-dose aspirin on fetal and maternal generation of thromboxane by platelets in women at risk for pregnancy-induced hypertension," *The New England journal of medicine*, vol. 321, no. 6, pp. 357-362, 1989.
100. D. L. Rolnik, D. Wright, L. C. Poon *et al.*, "Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia," *The New England journal of medicine*, vol. 377, no. 7, pp. 613-622, 2017.
101. S. Roberge, K. Nicolaidis, S. Demers *et al.*, "The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 216, no. 2, pp. 110-120 e116, 2017.
102. N. O'Gorman, D. Wright, L. C. Poon *et al.*, "Multicenter screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks' gestation: comparison with NICE guidelines and ACOG recommendations," *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 49, no. 6, pp. 756-760, 2017.

103. J. M. Dodd, A. McLeod, R. C. Windrim, J. Kingdom, "Antithrombotic therapy for improving maternal or infant health outcomes in women considered at risk of placental dysfunction," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. no. 7, pp. CD006780, 2013.
104. L. Duley, D. J. Henderson-Smart, S. Meher, J. F. King, "Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. no. 2, pp. CD004659, 2007.
105. "Committee Opinion No. 638: First-Trimester Risk Assessment for Early-Onset Preeclampsia," *Obstetrics and gynecology*, vol. 126, no. 3, pp. e25-27, 2015.
106. L. C. Poon, N. A. Kametas, T. Chelemen, A. Leal, K. H. Nicolaides, "Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach," *J Hum Hypertens*, vol. 24, no. 2, pp. 104-110, 2010.
107. N. O'Gorman, D. Wright, A. Syngelaki *et al.*, "Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks gestation," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 214, no. 1, pp. 103 e101-103 e112, 2016.
108. L. C. Poon, N. A. Zymeri, A. Zamprakou, A. Syngelaki, K. H. Nicolaides, "Protocol for measurement of mean arterial pressure at 11-13 weeks' gestation," *Fetal Diagn Ther*, vol. 31, no. 1, pp. 42-48, 2012.
109. L. C. Poon, N. A. Kametas, I. Pandeva, C. Valencia, K. H. Nicolaides, "Mean arterial pressure at 11(+0) to 13(+6) weeks in the prediction of preeclampsia," *Hypertension*, vol. 51, no. 4, pp. 1027-1033, 2008.
110. C. Angelucci, G. Lama, F. Iacopino, D. Maglione, G. Sica, "Effect of placenta growth factor-1 on proliferation and release of nitric oxide, cyclic AMP and cyclic GMP in human epithelial cells expressing the FLT-1 receptor," *Growth Factors*, vol. 19, no. 3, pp. 193-206, 2001.
111. N. Papantoniou, V. Bagiokos, K. Agiannitopoulos *et al.*, "RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia," *Prenatal diagnosis*, vol. 33, no. 7, pp. 682-687, 2013.
112. R. M. AbdelHalim, D. I. Ramadan, R. Zeyada, A. S. Nasr, I. A. Mandour, "Circulating Maternal Total Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study," *Mol Diagn Ther*, vol. 20, no. 2, pp. 135-149, 2016.
113. F. Crovetto, F. Figueras, S. Triunfo *et al.*, "First trimester screening for early and late preeclampsia based on maternal characteristics, biophysical parameters, and angiogenic factors," *Prenatal diagnosis*, vol. 35, no. 2, pp. 183-191, 2015.
114. L. C. Poon, N. A. Kametas, N. Maiz, R. Akolekar, K. H. Nicolaides, "First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy," *Hypertension*, vol. 53, no. 5, pp. 812-818, 2009.
115. R. S. Pillai, S. N. Bhattacharyya, W. Filipowicz, "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?," *Trends in cell biology*, vol. 17, no. 3, pp. 118-126, 2007.
116. M. Ha, V. N. Kim, "Regulation of microRNA biogenesis," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 15, no. 8, pp. 509-524, 2014.
117. A. Lycoudi, D. Mavreli, A. Mavrou, N. Papantoniou, A. Kolialexi, "miRNAs in pregnancy-related complications," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 15, no. 8, pp. 999-1010, 2015.
118. R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843-854, 1993.
119. J. Beermann, M. T. Piccoli, J. Viereck, T. Thum, "Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches," *Physiological reviews*, vol. 96, no. 4, pp. 1297-1325, 2016.
120. C. T. Lee, T. Risom, W. M. Strauss, "Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny," *DNA and cell biology*, vol. 26, no. 4, pp. 209-218, 2007.
121. M. P. Gantier, C. E. McCoy, I. Rusinova *et al.*, "Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation," *Nucleic acids research*, vol. 39, no. 13, pp. 5692-5703, 2011.
122. J. F. Mouillet, Y. Ouyang, C. B. Coyne, Y. Sadovsky, "MicroRNAs in placental health and disease," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 213, no. 4 Suppl, pp. S163-172, 2015.
123. A. S. Sayed, K. Xia, U. Salma, T. Yang, J. Peng, "Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases," *Heart, lung & circulation*, vol. 23, no. 6, pp. 503-510, 2014.

124. B. Deb, A. Uddin, S. Chakraborty, "miRNAs and ovarian cancer: An overview," *J Cell Physiol*, vol. 233, no. 5, pp. 3846-3854, 2018.
125. A. McGuire, J. A. Brown, M. J. Kerin, "Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 34, no. 1, pp. 145-155, 2015.
126. M. Braoudaki, D. D. Koutsouris, I. Kouris *et al.*, "Bioinformatics and Regression Analyses Manifest Tumor-Specific miRNA Expression Dynamics in Pediatric Embryonal Malignancies," *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2018, no. pp. 5834-5837, 2018.
127. E. Papadavid, M. Braoudaki, M. Bourdakou *et al.*, "Aberrant microRNA expression in tumor mycosis fungoides," *Tumour Biol*, vol. 37, no. 11, pp. 14667-14675, 2016.
128. Y. Feng, M. Zhong, S. Zeng *et al.*, "Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance," *Epigenomics*, vol. 11, no. 1, pp. 35-51, 2019.
129. S. S. Zhou, J. P. Jin, J. Q. Wang *et al.*, "miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges," *Acta Pharmacol Sin*, vol. 39, no. 7, pp. 1073-1084, 2018.
130. J. Makkoch, W. Poomipak, S. Saengchoowong *et al.*, "Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1, H3N2, and H5N1)," *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 241, no. 4, pp. 409-420, 2016.
131. H. Giral, A. Kratzer, U. Landmesser, "MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis," *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, vol. 30, no. 5, pp. 665-676, 2016.
132. S. Zhu, W. Pan, Y. Qian, "MicroRNA in immunity and autoimmunity," *J Mol Med (Berl)*, vol. 91, no. 9, pp. 1039-1050, 2013.
133. D. Mavreli, N. Papantoniou, A. Kolialexi, "miRNAs in pregnancy-related complications: an update," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 18, no. 7, pp. 587-589, 2018.
134. I. Eisenberg, N. Kotaja, D. Goldman-Wohl, T. Imbar, "microRNA in Human Reproduction," *Adv Exp Med Biol*, vol. 888, no. pp. 353-387, 2015.
135. X. Gao, Y. Qiao, D. Han, Y. Zhang, N. Ma, "Enemy or partner: relationship between intronic micrnas and their host genes," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 10, pp. 835-840, 2012.
136. Y. Zhao, D. Srivastava, "A developmental view of microRNA function," *Trends Biochem Sci*, vol. 32, no. 4, pp. 189-197, 2007.
137. V. C. Auyeung, I. Ulitsky, S. E. McGeary, D. P. Bartel, "Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing," *Cell*, vol. 152, no. 4, pp. 844-858, 2013.
138. J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom *et al.*, "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing," *Genes & development*, vol. 18, no. 24, pp. 3016-3027, 2004.
139. K. H. Yeom, Y. Lee, J. Han, M. R. Suh, V. N. Kim, "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing," *Nucleic acids research*, vol. 34, no. 16, pp. 4622-4629, 2006.
140. Y. Lee, C. Ahn, J. Han *et al.*, "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing," *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 415-419, 2003.
141. E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay, "Nuclear export of microRNA precursors," *Science*, vol. 303, no. 5654, pp. 95-98, 2004.
142. M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Gorlich, "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs," *Rna*, vol. 10, no. 2, pp. 185-191, 2004.
143. R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs," *Genes & development*, vol. 17, no. 24, pp. 3011-3016, 2003.
144. I. J. Macrae, K. Zhou, F. Li *et al.*, "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer," *Science*, vol. 311, no. 5758, pp. 195-198, 2006.
145. H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III," *Cell*, vol. 118, no. 1, pp. 57-68, 2004.
146. Z. Liu, J. Wang, H. Cheng *et al.*, "Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate," *Cell*, vol. 173, no. 6, pp. 1549-1550, 2018.
147. G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli *et al.*, "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 834-838, 2001.

148. R. F. Ketting, S. E. Fischer, E. Bernstein *et al.*, "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*," *Genes & development*, vol. 15, no. 20, pp. 2654-2659, 2001.
149. A. Nykanen, B. Haley, P. D. Zamore, "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway," *Cell*, vol. 107, no. 3, pp. 309-321, 2001.
150. A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias," *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 209-216, 2003.
151. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin *et al.*, "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse," *Current biology : CB*, vol. 12, no. 9, pp. 735-739, 2002.
152. R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, N. Cooch, R. Shiekhattar, "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing," *Cell*, vol. 123, no. 4, pp. 631-640, 2005.
153. I. J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson, J. A. Doudna, "In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 2, pp. 512-517, 2008.
154. H. Kobayashi, Y. Tomari, "RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1859, no. 1, pp. 71-81, 2016.
155. S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells," *Nature*, vol. 404, no. 6775, pp. 293-296, 2000.
156. R. J. Jackson, N. Standart, "How do microRNAs regulate gene expression?," *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2007, no. 367, pp. re1, 2007.
157. T. W. Nilsen, "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells," *Trends in genetics : TIG*, vol. 23, no. 5, pp. 243-249, 2007.
158. S. Yekta, I. H. Shih, D. P. Bartel, "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA," *Science*, vol. 304, no. 5670, pp. 594-596, 2004.
159. P. G. Hawkins, K. V. Morris, "RNA and transcriptional modulation of gene expression," *Cell cycle*, vol. 7, no. 5, pp. 602-607, 2008.
160. Y. Tan, B. Zhang, T. Wu *et al.*, "Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells," *BMC molecular biology*, vol. 10, no. pp. 12, 2009.
161. J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs, "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 228-234, 2009.
162. S. Griffiths-Jones, "The microRNA Registry," *Nucleic acids research*, vol. 32, no. Database issue, pp. D109-111, 2004.
163. A. Kozomara, M. Birgaoanu, S. Griffiths-Jones, "miRBase: from microRNA sequences to function," *Nucleic acids research*, vol. 47, no. D1, pp. D155-D162, 2019.
164. C. J. Creighton, J. G. Reid, P. H. Gunaratne, "Expression profiling of microRNAs by deep sequencing," *Briefings in bioinformatics*, vol. 10, no. 5, pp. 490-497, 2009.
165. V. Agarwal, G. W. Bell, J. W. Nam, D. P. Bartel, "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs," *eLife*, vol. 4, no. pp., 2015.
166. W. Wang, L. Feng, H. Zhang *et al.*, "Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 97, no. 6, pp. E1051-1059, 2012.
167. D. M. Morales-Prieto, S. Ospina-Prieto, W. Chaiwangyen, M. Schoenleben, U. R. Markert, "Pregnancy-associated miRNA-clusters," *J Reprod Immunol*, vol. 97, no. 1, pp. 51-61, 2013.
168. M. Noguer-Dance, S. Abu-Amero, M. Al-Khtib *et al.*, "The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta," *Human molecular genetics*, vol. 19, no. 18, pp. 3566-3582, 2010.
169. Y. Liang, D. Ridzon, L. Wong, C. Chen, "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues," *BMC Genomics*, vol. 8, no. pp. 166, 2007.
170. H. Seitz, N. Youngson, S. P. Lin *et al.*, "Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene," *Nat Genet*, vol. 34, no. 3, pp. 261-262, 2003.
171. D. M. Morales-Prieto, S. Ospina-Prieto, A. Schmidt, W. Chaiwangyen, U. R. Markert, "Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs," *Placenta*, vol. 35 Suppl, no. pp. S39-45, 2014.
172. K. Miura, S. Miura, K. Yamasaki *et al.*, "Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma," *Clin Chem*, vol. 56, no. 11, pp. 1767-1771, 2010.

173. K. Kotlabova, J. Doucha, I. Hromadnikova, "Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential," *J Reprod Immunol*, vol. 89, no. 2, pp. 185-191, 2011.
174. A. V. Timofeeva, V. A. Gusar, N. E. Kan *et al.*, "Identification of potential early biomarkers of preeclampsia," *Placenta*, vol. 61, no. pp. 61-71, 2018.
175. O. Biro, A. Fothi, B. Alasztics *et al.*, "Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia," *Gene*, vol. 692, no. pp. 138-144, 2019.
176. K. Miura, A. Higashijima, Y. Murakami *et al.*, "Circulating chromosome 19 miRNA cluster microRNAs in pregnant women with severe pre-eclampsia," *The journal of obstetrics and gynaecology research*, vol. 41, no. 10, pp. 1526-1532, 2015.
177. D. Mavreli, A. Lykoudi, G. Lambrou *et al.*, "Deep Sequencing Identified Dysregulated Circulating MicroRNAs in Late Onset Preeclampsia," *In Vivo*, vol. 34, no. 5, pp. 2317-2324, 2020.
178. S. V. Lip, M. V. Boekschoten, G. J. Hooiveld *et al.*, "Early-onset preeclampsia, plasma microRNAs, and endothelial cell function," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 222, no. 5, pp. 497 e491-497 e412, 2020.
179. Y. Wang, H. Fan, G. Zhao *et al.*, "miR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe pre-eclampsia," *The FEBS journal*, vol. 279, no. 24, pp. 4510-4524, 2012.
180. P. Xu, Y. Zhao, M. Liu *et al.*, "Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy," *Hypertension*, vol. 63, no. 6, pp. 1276-1284, 2014.
181. Y. Wang, Y. Zhang, H. Wang *et al.*, "Aberrantly up-regulated miR-20a in pre-eclamptic placenta compromised the proliferative and invasive behaviors of trophoblast cells by targeting forkhead box protein A1," *International journal of biological sciences*, vol. 10, no. 9, pp. 973-982, 2014.
182. M. A. Maccani, J. F. Padbury, C. J. Marsit, "miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, pp. e21210, 2011.
183. P. Li, W. Guo, L. Du *et al.*, "microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells," *Clin Sci (Lond)*, vol. 124, no. 1, pp. 27-40, 2013.
184. L. Nadeem, S. Munir, G. Fu *et al.*, "Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia," *The American journal of pathology*, vol. 178, no. 3, pp. 1177-1189, 2011.
185. L. Doridot, D. Houry, H. Gaillard *et al.*, "miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases," *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, vol. 9, no. 1, pp. 142-151, 2014.
186. Q. Li, Z. Pan, X. Wang *et al.*, "miR-125b-1-3p inhibits trophoblast cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 in preeclampsia," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 453, no. 1, pp. 57-63, 2014.
187. X. M. Zhu, T. Han, X. H. Wang *et al.*, "Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytolysis in JEG-3 cells," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 202, no. 6, pp. 592 e591-597, 2010.
188. Y. Dai, Z. Qiu, Z. Diao *et al.*, "MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1," *Placenta*, vol. 33, no. 10, pp. 824-829, 2012.
189. Y. Bai, W. Yang, H. X. Yang *et al.*, "Downregulated miR-195 detected in preeclamptic placenta affects trophoblast cell invasion via modulating ActRIIA expression," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. e38875, 2012.
190. J. F. Mouillet, T. Chu, D. M. Nelson, T. Mishima, Y. Sadovsky, "MiR-205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts," *FASEB J*, vol. 24, no. 6, pp. 2030-2039, 2010.
191. Y. Zhang, M. Fei, G. Xue *et al.*, "Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 16, no. 2, pp. 249-259, 2012.
192. S. Muralimanoharan, A. Maloyan, J. Mele *et al.*, "MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia," *Placenta*, vol. 33, no. 10, pp. 816-823, 2012.
193. L. Luo, G. Ye, L. Nadeem *et al.*, "MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal," *Journal of cell science*, vol. 125, no. Pt 13, pp. 3124-3132, 2012.

194. R. Kurashina, K. Kikuchi, J. Iwaki *et al.*, "Placenta-specific miRNA (miR-512-3p) targets PPP3R1 encoding the calcineurin B regulatory subunit in BeWo cells," *The journal of obstetrics and gynaecology research*, vol. 40, no. 3, pp. 650-660, 2014.
195. W. L. Gao, M. Liu, Y. Yang *et al.*, "The imprinted H19 gene regulates human placental trophoblast cell proliferation via encoding miR-675 that targets Nodal Modulator 1 (NOMO1)," *RNA biology*, vol. 9, no. 7, pp. 1002-1010, 2012.
196. A. Lykoudi, A. Kolialexi, G. I. Lambrou *et al.*, "Dysregulated placental microRNAs in Early and Late onset Preeclampsia," *Placenta*, vol. 61, no. pp. 24-32, 2018.
197. S. E. Kopriva, V. L. Chiasson, B. M. Mitchell, P. Chatterjee, "TLR3-induced placental miR-210 down-regulates the STAT6/interleukin-4 pathway," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, pp. e67760, 2013.
198. L. Xie, J. F. Mouillet, T. Chu *et al.*, "C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts," *Endocrinology*, vol. 155, no. 12, pp. 4975-4985, 2014.
199. C. van Solingen, H. C. de Boer, R. Bijkerk *et al.*, "MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+)/Lin(-) progenitor cells in ischaemia," *Cardiovasc Res*, vol. 92, no. 3, pp. 449-455, 2011.
200. J. Ding, F. Huang, G. Wu *et al.*, "MiR-519d-3p suppresses invasion and migration of trophoblast cells via targeting MMP-2," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. e0120321, 2015.
201. Y. Gu, Y. Bian, X. Xu *et al.*, "Downregulation of miR-29a/b/c in placenta accreta inhibits apoptosis of implantation site intermediate trophoblast cells by targeting MCL1," *Placenta*, vol. 48, no. pp. 13-19, 2016.
202. D. A. Enquobahrie, D. F. Abetew, T. K. Sorensen *et al.*, "Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 204, no. 2, pp. 178 e112-121, 2011.
203. T. Gunel, M. K. Hosseini, E. Gumusoglu *et al.*, "Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology," *Placenta*, vol. 52, no. pp. 77-85, 2017.
204. I. Hromadnikova, L. Dvorakova, K. Kotlabova *et al.*, "Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction," *The Indian journal of medical research*, vol. 144, no. 2, pp. 229-237, 2016.
205. Y. Hu, P. Li, S. Hao *et al.*, "Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia," *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 47, no. 8, pp. 923-929, 2009.
206. X. Li, C. Li, X. Dong, W. Gou, "MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase," *Molecular medicine reports*, vol. 10, no. 1, pp. 550-554, 2014.
207. B. L. Pineles, R. Romero, D. Montenegro *et al.*, "Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 196, no. 3, pp. 261 e261-266, 2007.
208. A. M. Sheikh, H. Y. Small, G. Currie, C. Delles, "Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, pp. e0160808, 2016.
209. L. Xie, Y. Sadosky, "The function of miR-519d in cell migration, invasion, and proliferation suggests a role in early placentation," *Placenta*, vol. 48, no. pp. 34-37, 2016.
210. M. Zhang, S. Muralimanoharan, A. C. Wortman, C. R. Mendelson, "Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 45, pp. E7069-E7076, 2016.
211. V. C. Sandrim, M. C. Dias, A. L. Bovolato *et al.*, "Plasma from pre-eclamptic patients induces the expression of the anti-angiogenic miR-195-5p in endothelial cells," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 20, no. 6, pp. 1198-1200, 2016.
212. B. Wang, J. Yang, B. Xiao, "MicroRNA-20b (miR-20b) Promotes the Proliferation, Migration, Invasion, and Tumorigenicity in Esophageal Cancer Cells via the Regulation of Phosphatase and Tensin Homologue Expression," *PLoS One*, vol. 11, no. 10, pp. e0164105, 2016.
213. Y. Zhang, Z. Diao, L. Su *et al.*, "MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 202, no. 5, pp. 466 e461-467, 2010.

214. S. Wang, A. B. Aurora, B. A. Johnson *et al.*, "The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis," *Developmental cell*, vol. 15, no. 2, pp. 261-271, 2008.
215. X. M. Zhu, T. Han, I. L. Sargent, G. W. Yin, Y. Q. Yao, "Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 200, no. 6, pp. 661 e661-667, 2009.
216. O. Ishibashi, A. Ohkuchi, M. M. Ali *et al.*, "Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia," *Hypertension*, vol. 59, no. 2, pp. 265-273, 2012.
217. J. S. Betoni, K. Derr, M. C. Pahl *et al.*, "MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: comparison of new and published results," *Hypertension in pregnancy*, vol. 32, no. 4, pp. 321-339, 2013.
218. M. S. Weedon-Fekjaer, Y. Sheng, M. Sugulle *et al.*, "Placental miR-1301 is dysregulated in early-onset preeclampsia and inversely correlated with maternal circulating leptin," *Placenta*, vol. 35, no. 9, pp. 709-717, 2014.
219. E. S. Vashukova, A. S. Glotov, P. V. Fedotov *et al.*, "Placental microRNA expression in pregnancies complicated by superimposed preeclampsia on chronic hypertension," *Molecular medicine reports*, vol. 14, no. 1, pp. 22-32, 2016.
220. F. Jiang, J. Li, G. Wu *et al.*, "Upregulation of microRNA335 and microRNA584 contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia through downregulation of endothelial nitric oxide synthase," *Molecular medicine reports*, vol. 12, no. 4, pp. 5383-5390, 2015.
221. B. Ura, G. Feriotto, L. Monasta *et al.*, "Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia," *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol. 53, no. 2, pp. 232-234, 2014.
222. D. S. Jairajpuri, Z. H. Malalla, N. Mahmood, W. Y. Almawi, "Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity," *Gene*, vol. 627, no. pp. 543-548, 2017.
223. Q. Li, A. Long, L. Jiang *et al.*, "Quantification of preeclampsia-related microRNAs in maternal serum," *Biomedical reports*, vol. 3, no. 6, pp. 792-796, 2015.
224. M. S. Murphy, R. C. Casselman, C. Tayade, G. N. Smith, "Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum," *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 213, no. 3, pp. 367 e361-369, 2015.
225. C. Munaut, L. Tebache, S. Blacher *et al.*, "Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia," *Biomedical reports*, vol. 5, no. 6, pp. 686-692, 2016.
226. L. Guo, Q. Yang, J. Lu *et al.*, "A comprehensive survey of miRNA repertoire and 3' addition events in the placentas of patients with pre-eclampsia from high-throughput sequencing," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, pp. e21072, 2011.
227. K. Mayor-Lynn, T. Toloubeydokhti, A. C. Cruz, N. Chegini, "Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor," *Reproductive sciences*, vol. 18, no. 1, pp. 46-56, 2011.
228. C. Zhang, Q. Li, N. Ren *et al.*, "Placental miR-106a approximately 363 cluster is dysregulated in preeclamptic placenta," *Placenta*, vol. 36, no. 2, pp. 250-252, 2015.
229. S. Y. Choi, J. Yun, O. J. Lee *et al.*, "MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray," *Placenta*, vol. 34, no. 9, pp. 799-804, 2013.
230. H. Li, Q. Ge, L. Guo, Z. Lu, "Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies," *Biomed Res Int*, vol. 2013, no. pp. 970265, 2013.
231. Q. Yang, J. Lu, S. Wang *et al.*, "Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women," *Clin Chim Acta*, vol. 412, no. 23-24, pp. 2167-2173, 2011.
232. S. Yang, H. Li, Q. Ge, L. Guo, F. Chen, "Deregulated microRNA species in the plasma and placenta of patients with preeclampsia," *Molecular medicine reports*, vol. 12, no. 1, pp. 527-534, 2015.
233. L. Wu, H. Zhou, H. Lin *et al.*, "Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies," *Reproduction*, vol. 143, no. 3, pp. 389-397, 2012.
234. L. Yoffe, A. Gilam, O. Yaron *et al.*, "Early Detection of Preeclampsia Using Circulating Small non-coding RNA," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, pp. 3401, 2018.
235. C. M. Brown, V. D. Garovic, "Mechanisms and management of hypertension in pregnant women," *Current hypertension reports*, vol. 13, no. 5, pp. 338-346, 2011.
236. O. American College of, Gynecologists, "ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction," *Obstetrics and gynecology*, vol. 121, no. 5, pp. 1122-1133, 2013.

237. M. R. Friedlander, W. Chen, C. Adamidi *et al.*, "Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep," *Nat Biotechnol*, vol. 26, no. 4, pp. 407-415, 2008.
238. J. H. Bullard, E. Purdom, K. D. Hansen, S. Dudoit, "Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, no. pp. 94, 2010.
239. M. Braoudaki, G. I. Lambrou, K. Giannikou *et al.*, "MicroRNA expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms," *Journal of hematology & oncology*, vol. 7, no. pp. 96, 2014.
240. M. D. Paraskevopoulou, G. Georgakilas, N. Kostoulas *et al.*, "DIANA-LncBase: experimentally verified and computationally predicted microRNA targets on long non-coding RNAs," *Nucleic acids research*, vol. 41, no. Database issue, pp. D239-245, 2013.
241. M. D. Paraskevopoulou, G. Georgakilas, N. Kostoulas *et al.*, "DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows," *Nucleic acids research*, vol. 41, no. Web Server issue, pp. W169-173, 2013.
242. I. S. Vlachos, N. Kostoulas, T. Vergoulis *et al.*, "DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways," *Nucleic acids research*, vol. 40, no. Web Server issue, pp. W498-504, 2012.
243. B. Zhang, S. Kirov, J. Snoddy, "WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts," *Nucleic acids research*, vol. 33, no. Web Server issue, pp. W741-748, 2005.
244. M. G. Roubelakis, P. Zotos, G. Papachristoudis *et al.*, "Human microRNA target analysis and gene ontology clustering by GOMir, a novel stand-alone application," *BMC Bioinformatics*, vol. 10 Suppl 6, no. pp. S20, 2009.
245. A. He, Y. Zhou, Y. Wei, R. Li, "Potential Protein Biomarkers for Preeclampsia," *Cureus*, vol. 12, no. 6, pp. e8925, 2020.
246. C. Glinge, S. Clauss, K. Boddum *et al.*, "Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations," *PLoS One*, vol. 12, no. 2, pp. e0167969, 2017.
247. W. Cheng, T. Liu, F. Jiang *et al.*, "microRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression in umbilical vein endothelial cells from severely pre-eclamptic pregnant women," *International journal of molecular medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 393-399, 2011.
248. L. Qian, J. Guan, Y. Wu, Q. Wang, "Upregulated circular RNA circ_0074027 promotes glioblastoma cell growth and invasion by regulating miR-518a-5p/IL17RD signaling pathway," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 510, no. 4, pp. 515-519, 2019.
249. Z. Rong, A. Wang, Z. Li *et al.*, "IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling," *Cell Res*, vol. 19, no. 2, pp. 208-215, 2009.
250. D. A. Enquobahrie, M. Hensley, C. Qiu *et al.*, "Candidate Gene and MicroRNA Expression in Fetal Membranes and Preterm Delivery Risk," *Reproductive sciences*, vol. 23, no. 6, pp. 731-737, 2016.
251. Z. Chen, J. Luo, L. Ma *et al.*, "MiR130b-Regulation of PPARgamma Coactivator- 1alpha Suppresses Fat Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, pp. e0142809, 2015.
252. D. A. Enquobahrie, P. L. Wander, M. G. Tadesse *et al.*, "Maternal pre-pregnancy body mass index and circulating microRNAs in pregnancy," *Obesity research & clinical practice*, vol. 11, no. 4, pp. 464-474, 2017.
253. F. Hong, Y. Li, Y. Xu, "Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia," *The Journal of international medical research*, vol. 42, no. 6, pp. 1243-1251, 2014.
254. J. E. Fish, M. M. Santoro, S. U. Morton *et al.*, "miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity," *Developmental cell*, vol. 15, no. 2, pp. 272-284, 2008.
255. H. T. Li, H. Zhang, Y. Chen, X. F. Liu, J. Qian, "MiR-423-3p enhances cell growth through inhibition of p21Cip1/Waf1 in colorectal cancer," *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 37, no. 3, pp. 1044-1054, 2015.
256. N. Bruno, J. M. ter Maaten, E. S. Ovchinnikova *et al.*, "MicroRNAs relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure," *International journal of cardiology*, vol. 203, no. pp. 564-569, 2016.
257. S. Sober, M. Laan, T. Annilo, "MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 391, no. 1, pp. 727-732, 2010.

258. S. Jin, J. Collin, L. Zhu *et al.*, "A Novel Role for miR-1305 in Regulation of Pluripotency-Differentiation Balance, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells," *Stem cells*, vol. 34, no. 9, pp. 2306-2317, 2016.
259. K. P. Lee, Y. J. Shin, A. C. Panda *et al.*, "miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4," *Genes & development*, vol. 29, no. 15, pp. 1605-1617, 2015.
260. T. Tanaka, S. Sugaya, K. Kita *et al.*, "Inhibition of cell viability by human IFN-beta is mediated by microRNA-431," *International journal of oncology*, vol. 40, no. 5, pp. 1470-1476, 2012.
261. A. C. Staff, S. J. Benton, P. von Dadelszen *et al.*, "Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers," *Hypertension*, vol. 61, no. 5, pp. 932-942, 2013.
262. T. M. K. Motawi, D. Sabry, N. W. Maurice, S. M. Rizk, "Role of mesenchymal stem cells exosomes derived microRNAs; miR-136, miR-494 and miR-495 in pre-eclampsia diagnosis and evaluation," *Arch Biochem Biophys*, vol. 659, no. pp. 13-21, 2018.
263. K. Dong, X. Zhang, L. Ma *et al.*, "Downregulations of circulating miR-31 and miR-21 are associated with preeclampsia," *Pregnancy Hypertens*, vol. 17, no. pp. 59-63, 2019.
264. M. Hocaoglu, S. Demirer, H. Senturk, A. Turgut, E. Komurcu-Bayrak, "Differential expression of candidate circulating microRNAs in maternal blood leukocytes of the patients with preeclampsia and gestational diabetes mellitus," *Pregnancy Hypertens*, vol. 17, no. pp. 5-11, 2019.
265. Y. Murakami, K. Miura, S. Sato *et al.*, "Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy," *The journal of obstetrics and gynaecology research*, vol. 44, no. 5, pp. 840-851, 2018.
266. E. Devor, D. Santillan, S. Scroggins, A. Warriar, M. Santillan, "Trimester-specific plasma exosome microRNA expression profiles in preeclampsia," *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*, vol. no. pp. 1-9, 2019.
267. I. Hromadnikova, L. Dvorakova, K. Kotlabova, L. Krofta, "The Prediction of Gestational Hypertension, Preeclampsia and Fetal Growth Restriction via the First Trimester Screening of Plasma Exosomal C19MC microRNAs," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 12, pp., 2019.
268. W. Wang, Y. Wang, W. Liu, A. J. van Wijnen, "Regulation and biological roles of the multifaceted miRNA-23b (MIR23B)," *Gene*, vol. 642, no. pp. 103-109, 2018.
269. C. Iaconetti, S. De Rosa, A. Polimeni *et al.*, "Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo," *Cardiovasc Res*, vol. 107, no. 4, pp. 522-533, 2015.
270. W. Liu, Y. Yang, J. Yan, L. Wang, "MicroRNA-23b-3p promotes the proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells by targeting Sprouty2," *Acta Histochem*, vol. 121, no. 6, pp. 704-711, 2019.
271. X. Hu, Y. Wang, H. Liang *et al.*, "miR-23a/b promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer," *Cell Death Dis*, vol. 8, no. 10, pp. e3059, 2017.
272. Q. Zhou, R. Gallagher, R. Ufret-Vincenty *et al.*, "Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 20, pp. 8287-8292, 2011.
273. V. Leone, D. D'Angelo, P. Pallante, C. M. Croce, A. Fusco, "Thyrotropin regulates thyroid cell proliferation by up-regulating miR-23b and miR-29b that target SMAD3," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 97, no. 9, pp. 3292-3301, 2012.
274. A. Kilic, M. Santolini, T. Nakano *et al.*, "A systems immunology approach identifies the collective impact of 5 miRs in Th2 inflammation," *JCI Insight*, vol. 3, no. 11, pp., 2018.
275. Y. Jin, S. D. Tymen, D. Chen *et al.*, "MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing," *PLoS One*, vol. 8, no. 5, pp. e64434, 2013.
276. L. Wang, L. Chang, Z. Li *et al.*, "miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway," *Med Oncol*, vol. 31, no. 5, pp. 934, 2014.
277. M. Lukamowicz-Rajska, C. Mittmann, M. Prummer *et al.*, "MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients," *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, pp. 78433-78447, 2016.

278. N. M. Kane, L. Howard, B. Descamps *et al.*, "Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells," *Stem cells*, vol. 30, no. 4, pp. 643-654, 2012.
279. F. Cao, T. Liu, S. Sun, S. Feng, "The role of the miR-99b-5p/mTOR signaling pathway in neuroregeneration in mice following spinal cord injury," *Molecular medicine reports*, vol. 16, no. 6, pp. 9355-9360, 2017.
280. X. Ye, H. Luo, Y. Chen *et al.*, "MicroRNAs 99b-5p/100-5p Regulated by Endoplasmic Reticulum Stress are Involved in Abeta-Induced Pathologies," *Front Aging Neurosci*, vol. 7, no. pp. 210, 2015.
281. D. Hildebrand, M. E. Eberle, S. M. Wolfle *et al.*, "Hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a Cluster Regulates Pathogen Recognition Receptor-Stimulated Suppressive Antigen-Presenting Cells," *Front Immunol*, vol. 9, no. pp. 1224, 2018.
282. S. Guo, J. Lu, R. Schlanger *et al.*, "MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 32, pp. 14229-14234, 2010.
283. A. Enomoto, H. Murakami, N. Asai *et al.*, "Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE," *Developmental cell*, vol. 9, no. 3, pp. 389-402, 2005.
284. A. H. Chaanine, R. J. Hajjar, "AKT signalling in the failing heart," *Eur J Heart Fail*, vol. 13, no. 8, pp. 825-829, 2011.
285. A. R. Wende, B. T. O'Neill, H. Bugger *et al.*, "Enhanced cardiac Akt/protein kinase B signaling contributes to pathological cardiac hypertrophy in part by impairing mitochondrial function via transcriptional repression of mitochondrion-targeted nuclear genes," *Mol Cell Biol*, vol. 35, no. 5, pp. 831-846, 2015.
286. Y. Yamanaka, H. Tagawa, N. Takahashi *et al.*, "Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia," *Blood*, vol. 114, no. 15, pp. 3265-3275, 2009.
287. V. R. Amara, S. K. Surapaneni, K. Tikoo, "Metformin attenuates cardiovascular and renal injury in uninephrectomized rats on DOCA-salt: Involvement of AMPK and miRNAs in cardioprotection," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 362, no. pp. 95-104, 2019.
288. A. Piwkowska, D. Rogacka, M. Jankowski *et al.*, "Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 393, no. 2, pp. 268-273, 2010.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1: Γονίδια στόχοι του miR23b-5p

	miRNA name	Target ID	Gene symbol	Gene ID	Gene Description
1	MIMAT0004587	941259	MTMR4	9110	myotubularin related protein 4
2	MIMAT0004587	941298	SSMEM1	136263	serine-rich single-pass membrane protein 1
3	MIMAT0004587	941262	GIPC3	126326	GIPC PDZ domain containing family, member 3
4	MIMAT0004587	941345	TEC	7006	tec protein tyrosine kinase
5	MIMAT0004587	941362	GOLGA6L6	727832	golgin A6 family-like 6
6	MIMAT0004587	941275	LOC440243	440243	putative golgin subfamily A member 6-like
7	MIMAT0004587	941334	GOLGA6L1	283767	golgin A6 family-like 1
8	MIMAT0004587	941378	RNF166	115992	ring finger protein 166
9	MIMAT0004587	941231	MLIP	90523	muscular LMNA-interacting protein
10	MIMAT0004587	941294	SIRPA	140885	signal-regulatory protein alpha
11	MIMAT0004587	941250	GREM2	64388	gremlin 2, DAN family BMP antagonist
12	MIMAT0004587	941247	NTRK3	4916	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
13	MIMAT0004587	941264	TMEM127	55654	transmembrane protein 127
14	MIMAT0004587	941295	LITAF	9516	lipopolysaccharide-induced TNF factor
15	MIMAT0004587	941270	CEMIP	57214	cell migration inducing protein, hyaluronan binding
16	MIMAT0004587	941370	CHD4	1108	chromodomain helicase DNA binding protein 4
17	MIMAT0004587	941273	ABCA1	19	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
18	MIMAT0004587	941301	MAPRE1	22919	microtubule-associated protein, RP/EB family, mem.1
19	MIMAT0004587	941242	KCNIP1	30820	Kv channel interacting protein 1
20	MIMAT0004587	941319	OSGEP	55644	O-sialoglycoprotein endopeptidase
21	MIMAT0004587	941331	IPO11	51194	importin 11
22	MIMAT0004587	941352	LOC100130520	100130520	CD300c molecule-like
23	MIMAT0004587	941329	DSC3	1825	desmocollin 3
24	MIMAT0004587	941314	CLIP3	25999	CAP-GLY domain containing linker protein 3
25	MIMAT0004587	941357	MBNL1	4154	muscleblind-like splicing regulator 1
26	MIMAT0004587	941274	FAM49A	81553	family with sequence similarity 49, member A
27	MIMAT0004587	941279	NHS	4810	Nance-Horan syndrome
28	MIMAT0004587	941253	ZMYM3	9203	zinc finger, MYM-type 3
29	MIMAT0004587	941266	RNF144B	255488	ring finger protein 144B
30	MIMAT0004587	941316	USH2A	7399	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
31	MIMAT0004587	941344	REG1A	5967	regenerating islet-derived 1 alpha
32	MIMAT0004587	941285	FOXC1	2296	forkhead box C1

33	MIMAT0004587	941386	MLXIP	22877	MLX interacting protein
34	MIMAT0004587	941265	UBE2Q1	55585	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1
35	MIMAT0004587	941328	TMEM140	55281	transmembrane protein 140
36	MIMAT0004587	941271	APITD1-CORT	100526739	APITD1-CORT readthrough
37	MIMAT0004587	941311	PDCD1	5133	programmed cell death 1
38	MIMAT0004587	941303	CORT	1325	cortistatin
39	MIMAT0004587	941346	NUDT4	11163	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) typem4
40	MIMAT0004587	941252	ERGIC1	57222	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
41	MIMAT0004587	941276	ACER2	340485	alkaline ceramidase 2
42	MIMAT0004587	941282	ARNT	405	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
43	MIMAT0004587	941249	TMEM252	169693	transmembrane protein 252
44	MIMAT0004587	941348	PYGM	5837	phosphorylase, glycogen, muscle
45	MIMAT0004587	941243	ERC2	26059	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2
46	MIMAT0004587	941307	TBC1D10B	26000	TBC1 domain family, member 10B
47	MIMAT0004587	941272	PTPRT	11122	protein tyrosine phosphatase, receptor type, T
48	MIMAT0004587	941261	HSPB6	126393	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
49	MIMAT0004587	941332	STK38	11329	serine/threonine kinase 38
50	MIMAT0004587	941241	SLC17A2	10246	solute carrier family 17, member 2
51	MIMAT0004587	941286	FCHSD1	89848	FCH and double SH3 domains 1
52	MIMAT0004587	941309	CAMKK1	84254	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
53	MIMAT0004587	941255	CCDC97	90324	coiled-coil domain containing 97
54	MIMAT0004587	941356	KCNC4	3749	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4
55	MIMAT0004587	941254	HIC2	23119	hypermethylated in cancer 2
56	MIMAT0004587	941385	PDZRN3	23024	PDZ domain containing ring finger 3
57	MIMAT0004587	941376	CCNJL	79616	cyclin J-like
58	MIMAT0004587	941283	C20orf112	140688	chromosome 20 open reading frame 112
59	MIMAT0004587	941234	GPD1L	23171	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
60	MIMAT0004587	941339	PHF20	51230	PHD finger protein 20
61	MIMAT0004587	941305	TMEM217	221468	transmembrane protein 217
62	MIMAT0004587	941371	GBX2	2637	gastrulation brain homeobox 2
63	MIMAT0004587	941291	JAM3	83700	junctional adhesion molecule 3
64	MIMAT0004587	941335	IGF2	3481	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
65	MIMAT0004587	941350	MRPL43	84545	mitochondrial ribosomal protein L43

66	MIMAT0004587	941240	SORCS2	57537	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2
67	MIMAT0004587	941310	PLOD1	5351	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
68	MIMAT0004587	941288	LOC102723367	102723367	uncharacterized LOC102723367
69	MIMAT0004587	941363	NUFIP2	57532	nuclear fragile X mental retardation protein interacting2
70	MIMAT0004587	941355	CLOCK	9575	clock circadian regulator
71	MIMAT0004587	941244	DDX6	1656	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6
72	MIMAT0004587	941349	MOCS2	4338	molybdenum cofactor synthesis 2
73	MIMAT0004587	941302	JMY	133746	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
74	MIMAT0004587	941293	SETD1A	9739	SET domain containing 1A
75	MIMAT0004587	941377	AGPAT3	56894	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3
76	MIMAT0004587	941367	BARX2	8538	BARX homeobox 2
77	MIMAT0004587	941233	MYOZ3	91977	myozenin 3
78	MIMAT0004587	941269	DYNLRB1	83658	dynein, light chain, roadblock-type 1
79	MIMAT0004587	941268	C3orf56	285311	chromosome 3 open reading frame 56
80	MIMAT0004587	941384	SMIM15	643155	small integral membrane protein 15
81	MIMAT0004587	941248	KIRREL2	84063	kin of IRRE like 2 (Drosophila)
82	MIMAT0004587	941364	P2RX2	22953	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2
83	MIMAT0004587	941365	BMF	90427	Bcl2 modifying factor
84	MIMAT0004587	941257	KLHDC7A	127707	kelch domain containing 7A
85	MIMAT0004587	941315	PBOV1	59351	prostate and breast cancer overexpressed 1
86	MIMAT0004587	941284	CALU	813	calumenin
87	MIMAT0004587	941327	LIPG	9388	lipase, endothelial
88	MIMAT0004587	941304	ZNF777	27153	zinc finger protein 777
89	MIMAT0004587	941338	PCDH15	65217	protocadherin-related 15
90	MIMAT0004587	941366	MEX3A	92312	mex-3 RNA binding family member A
91	MIMAT0004587	941306	MARVELD1	83742	MARVEL domain containing 1
92	MIMAT0004587	941390	ZBTB8B	728116	zinc finger and BTB domain containing 8B
93	MIMAT0004587	941308	RAB7L1	8934	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
94	MIMAT0004587	941232	NMT1	4836	N-myristoyltransferase 1
95	MIMAT0004587	941368	DSC1	1823	desmocollin 1
96	MIMAT0004587	941239	TRIM49C	642612	tripartite motif containing 49C
97	MIMAT0004587	941281	TRIM49	57093	tripartite motif containing 49
98	MIMAT0004587	941236	XRRA1	143570	X-ray radiation resistance associated 1
99	MIMAT0004587	941321	MARCH8	220972	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8, E3 ubiquitin protein ligase

100	MIMAT0004587	941353	TP53INP2	58476	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2
101	MIMAT0004587	941300	NKD1	85407	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
102	MIMAT0004587	941354	MYO1B	4430	myosin IB
103	MIMAT0004587	941342	GPR153	387509	G protein-coupled receptor 153
104	MIMAT0004587	941369	DENR	8562	density-regulated protein
105	MIMAT0004587	941267	STK3	6788	serine/threonine kinase 3
106	MIMAT0004587	941237	HABP4	22927	hyaluronan binding protein 4
107	MIMAT0004587	941290	KIAA0753	9851	KIAA0753
108	MIMAT0004587	941360	MYEOV	26579	myeloma overexpressed
109	MIMAT0004587	941238	PSD3	23362	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
110	MIMAT0004587	941347	VSIG1	340547	V-set and immunoglobulin domain containing 1
111	MIMAT0004587	941297	COMMD6	170622	COMM domain containing 6
112	MIMAT0004587	941324	TBC1D13	54662	TBC1 domain family, member 13
113	MIMAT0004587	941325	LOC102724571	102724571	uncharacterized LOC102724571
114	MIMAT0004587	941330	CHD3	1107	chromodomain helicase DNA binding protein 3
115	MIMAT0004587	941382	YLPM1	56252	YLP motif containing 1
116	MIMAT0004587	941374	IFFO2	126917	intermediate filament family orphan 2
117	MIMAT0004587	941317	SPOCK1	6695	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1
118	MIMAT0004587	941296	EPHA5	2044	EPH receptor A5
119	MIMAT0004587	941372	GPC6	10082	glypican 6
120	MIMAT0004587	941263	NUP98	4928	nucleoporin 98kDa
121	MIMAT0004587	941245	PKDCC	91461	protein kinase domain containing, cytoplasmic
122	MIMAT0004587	941289	CSF1	1435	colony stimulating factor 1 (macrophage)
123	MIMAT0004587	941341	KBTBD13	390594	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 13
124	MIMAT0004587	941381	HDGF	3068	hepatoma-derived growth factor
125	MIMAT0004587	941337	USP4	7375	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)
126	MIMAT0004587	941343	LARP1	23367	La ribonucleoprotein domain family, member 1
127	MIMAT0004587	941230	ZNF319	57567	zinc finger protein 319
128	MIMAT0004587	941336	ADAM10	102	ADAM metallopeptidase domain 10
129	MIMAT0004587	941292	CNTN1	1272	contactin 1
130	MIMAT0004587	941277	NUP160	23279	nucleoporin 160kDa
131	MIMAT0004587	941380	LRRC41	10489	leucine rich repeat containing 41
132	MIMAT0004587	941373	COLGALT2	23127	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 2
133	MIMAT0004587	941256	SLC26A11	284129	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 11

134	MIMAT0004587	941351	LOC1009967	100996	putative speedy protein E8-like
135	MIMAT0004587	941322	HMGCS2	3158	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
136	MIMAT0004587	941260	PSD2	84249	pleckstrin and Sec7 domain containing 2
137	MIMAT0004587	941235	SNX12	29934	sorting nexin 12
138	MIMAT0004587	941323	CLMN	79789	calmin (calponin-like, transmembrane)
139	MIMAT0004587	941333	URM1	81605	ubiquitin related modifier 1
140	MIMAT0004587	941278	MYF6	4618	myogenic factor 6 (herculin)
141	MIMAT0004587	941361	PGK1	5230	phosphoglycerate kinase 1
142	MIMAT0004587	941388	RQCD1	9125	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (<i>S. pombe</i>)
143	MIMAT0004587	941389	MARCH4	57574	membrane-associated ring finger (C3HC4) 4, E3 ubiquitin protein ligase
144	MIMAT0004587	941326	GPATCH11	253635	G patch domain containing 11
145	MIMAT0004587	941379	TNFSF14	8740	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
146	MIMAT0004587	941383	GOLGA3	2802	golgin A3
147	MIMAT0004587	941375	PPA2	27068	pyrophosphatase (inorganic) 2
148	MIMAT0004587	941359	PCDHB16	57717	protocadherin beta 16
149	MIMAT0004587	941320	BPIFC	254240	BPI fold containing family C
150	MIMAT0004587	941287	ADAMTS15	170689	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1
151	MIMAT0004587	941340	LCOR	84458	ligand dependent nuclear receptor corepressor
152	MIMAT0004587	941313	PLEKHA5	54477	pleckstrin homology domain containing, family A member 5
153	MIMAT0004587	941246	SCARA5	286133	scavenger receptor class A, member 5 (putative)
154	MIMAT0004587	941258	CPNE5	57699	copine V
155	MIMAT0004587	941387	PATZ1	23598	POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1
156	MIMAT0004587	941358	CTSC	1075	cathepsin C
157	MIMAT0004587	941299	ENHO	375704	energy homeostasis associated
158	MIMAT0004587	941318	ADAM19	8728	ADAM metallopeptidase domain 19
159	MIMAT0004587	941280	MON1B	22879	MON1 secretory trafficking family member B
160	MIMAT0004587	941312	P2RY2	5029	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2
161	MIMAT0004587	941251	PCNX	22990	pecanex homolog (<i>Drosophila</i>)

Παράρτημα 2: Γονίδια στόχοι του miR99b-5p

	miRNA name	Target ID	Gene symbol	Gene ID	Gene Description
1	MIMAT0000689	426115	KBTBD8	84541	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8
2	MIMAT0000689	426132	HS3ST2	9956	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2
3	MIMAT0000689	426135	ZZEF1	23140	zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1
4	MIMAT0000689	426125	MTOR	2475	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
5	MIMAT0000689	426131	MBNL1	4154	muscleblind-like splicing regulator 1
6	MIMAT0000689	426126	TRIB2	28951	tribbles pseudokinase 2
7	MIMAT0000689	426123	SMARCA5	8467	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
8	MIMAT0000689	426134	TTC39A	22996	tetratricopeptide repeat domain 39A
9	MIMAT0000689	426116	ZADH2	284273	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2
10	MIMAT0000689	426130	RAVER2	55225	ribonucleoprotein, PTB-binding 2
11	MIMAT0000689	426113	PPP3CA	5530	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme
12	MIMAT0000689	426122	APIAR	55435	adaptor-related protein complex 1 associated regulatory protein
13	MIMAT0000689	426127	FGFR3	2261	fibroblast growth factor receptor 3
14	MIMAT0000689	426136	HS3ST3B1	9953	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1
15	MIMAT0000689	426119	NOX4	50507	NADPH oxidase 4
16	MIMAT0000689	426133	BAZ2A	11176	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A
17	MIMAT0000689	426110	ZNF845	91664	zinc finger protein 845
18	MIMAT0000689	426121	AGO2	27161	argonaute RISC catalytic component 2
19	MIMAT0000689	426112	PCSK9	255738	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
20	MIMAT0000689	426117	NR6A1	2649	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1
21	MIMAT0000689	426118	TAOK1	57551	TAO kinase 1
22	MIMAT0000689	426111	FZD8	8325	frizzled class receptor 8
23	MIMAT0000689	426128	MTMR3	8897	myotubularin related protein 3
24	MIMAT0000689	426129	EPDR1	54749	ependymin related 1
25	MIMAT0000689	426114	ETFDH	2110	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase
26	MIMAT0000689	426124	FZD5	7855	frizzled class receptor 5
27	MIMAT0000689	426120	CTD5PL	10217	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like