



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Π.Γ.Ν «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ ΜΠΑΜΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΠΛΕΓΜΕΝΗ Η΄ ΜΗ ΕΠΙΠΛΕΓΜΕΝΗ ΜΕ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ
ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΗΣΗ**

ΤΣΟΚΑΚΗ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΠΛΕΓΜΕΝΗ Η΄ ΜΗ ΕΠΙΠΛΕΓΜΕΝΗ
ΜΕ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

- **Ημερομηνία αίτησης:** 24/4/2013
- **Ορισμός τριμελούς επιτροπής:** 6/6/2013
- **Ορισμός θέματος:** 29/8/2013
- **Κατάθεση Α΄ προόδου:** 28/5/2014
- **Κατάθεση Β΄ προόδου:** 03/06/2015
- **Κατάθεση Γ΄ προόδου:** 19/7/2022
- **Κατάθεση επταμελούς επιτροπής:** 30/8/2022,
αριθμός πρωτοκόλλου: 82622/30-08-2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΛΒΑΤΣΙΩΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (επιβλέπων)

ΚΑΣΣΑΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΧΡΕΛΙΑΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του
Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΣΣΑΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΑΛΑΝΤΑΡΙΔΟΥ ΣΟΦΙΑ, Καθηγήτρια Μαιευτικής – Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΔΗΜΗΤΡΑΚΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΧΡΕΛΙΑΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΑΝΤΖΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΧΑΛΒΑΤΣΙΩΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΖΟΥΜΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
(Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)*

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ


ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΙΑΣΟΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022

Στο σύζυγό μου

Ω Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΩΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμότατα ευχαριστώ τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας, κο Παναγιώτη Χαλβατσιώτη, για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της μελέτης, την εμπιστοσύνη που επέδειξε σε εμένα, αλλά και για τη συνολική ουσιαστική υποστήριξή του στην έως τώρα πορεία μου. Η διατριβή αυτή δεν θα μπορούσε να έχει διεκπεραιωθεί τόσο άρτια χωρίς την καθοριστική συνδρομή του Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, κου Χρέλια Χαράλαμπου, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συμβολή του τόσο σε κλινικό όσο και επιστημονικό επίπεδο.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κο Δημήτριο Κασσάνο για την ουσιαστική συμβολή στην πραγματοποίηση της μελέτης. Ευχαριστώ ιδιαίτερα το Διευθυντή της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Πύργου και σύζυγό μου, κο Βασίλειο Τσιτσή, για την ουσιαστική συνεργασία της κλινικής του στη μελέτη.

Ιδιαίτερη τιμή αποτελεί η παρουσία στην επταμελή επιτροπή της Καθηγήτριας Μαιευτικής-Γυναικολογίας κας Σοφίας Καλανταρίδου, όπως και του Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κου Κωνσταντίνου Δημητρακάκη.

Θερμές ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαρία Καντζανού και στον Επίκουρο Καθηγητή κο Εμμανουήλ Ζουμάκη για την παρουσία τους στην επταμελή επιτροπή.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά κάθε έναν από τους ιατρούς, αλλά και το νοσηλευτικό προσωπικό της Γ' Μαιευτικής- Γυναικολογικής κλινικής του ΠΓΝ «Αττικόν» για την άριστη συνεργασία όλων αυτών των χρόνων.

Ένα θερμό ευχαριστώ στις έγκυες γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την αγάπη και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....σελ 3
2. SUMMARY.....σελ 5

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....σελ 7
4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΗΣΗ.....σελ 11
- 4(A). ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ, ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ
ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.....σελ 11
- 4(B). ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΤΗΝ ΕΠΙΠΛΕΓΜΕΝΗ ΚΥΗΣΗ.....σελ 13
5. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ.....σελ 15
- 5(A). ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 15
- 5(B). ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 19
- 5(Γ).ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ VEGF ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 25
- 5(Δ). ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ VEGF ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 31
- 5(Ε). ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΕΜΒΡΥΟ.....σελ 33
- 5(ΣΤ). ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ.....σελ 37
- 5(Ζ). ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ VEGF ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ VEGF-R ΣΤΗΝ
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 39
- 5(Η). ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ 6.....σελ 43
- 5(Θ). ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ IL-6 ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 45
6. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 49
- 6(A). ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ.....σελ 49
- 6(B). ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΣΤΗΝ
ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ.....σελ 61

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. ΥΠΟΘΕΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ.....σελ 65
8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ 67

9. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ.....σελ 73	σελ 73
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ 87	σελ 87
10(A). ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. ΤΑ ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ, ΤΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΑΤΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ, ΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΤΟΚΕΤΟΥ.....σελ 87	σελ 87
10(B). ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ. ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ.....σελ 105	σελ 105
10(Γ). ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ.....σελ 109	σελ 109
10(Γ1). ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ -174 G/C ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ IL- 6.....σελ 109	σελ 109
10(Γ2). ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ -174 G/C ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ IL-6 (ΑΠΟ ΤΟ ΜΥ) ΜΕ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....σελ 113	σελ 113
10(Γ3). ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ VEGF ΚΑΙ VEGF-R.....σελ 121	σελ 121
10(Γ4). ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ VEGF ΚΑΙ VEGF-R ΜΕ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....σελ 129	σελ 129
11.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ 143	σελ 143
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ 151	σελ 151
13. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι (ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ).....σελ 169	σελ 169
14. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ (ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ).....σελ 171	σελ 171
15. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....σελ 177	σελ 177

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο αυξανόμενος επιπολασμός της παχυσαρκίας στη σημερινή εποχή φαίνεται ότι δημιουργεί αρνητικό αντίκτυπο στην περίοδο της κύησης, οδηγώντας ολοένα και περισσότερες έγκυες ασθενείς να εμφανίζουν επιπλοκές, όπως Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ή Προεκλαμψία, που αποτελεί σοβαρή υπερτασική νόσο της κύησης.

Επιγενετικές τροποποιήσεις που διαμορφώνουν τη γονιδιακή ρύθμιση θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην παθογένεια του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, ενώ επιπλέον θεωρείται ότι επιγενετικές αλλοιώσεις μπορούν να διαδραματίσουν ρόλο στη διαμεσολάβηση επιπλοκών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, όπως η προεκλαμψία. Έχοντας διερευνήσει επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA του προαγωγέα των γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και τροποποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της κύησης, καταλήξαμε σε συγκεκριμένα συμπεράσματα. Τα σημαντικότερα από αυτά ήταν τα εξής: Σε ό,τι αφορά την προεκλαμψία, τα γονίδια IL15 και IL17RA είναι σημαντικά υπερμεθυλιωμένα σε ασθενείς με προεκλαμψία σε σύγκριση με υγιή άτομα. Επιπλέον, τα γονίδια ATF2, CCL25, IL12B και IL6ST υπερμεθυλιώνονται στο Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης σε σύγκριση με την Προεκλαμψία.

Δεδομένου ότι αναδείχθηκαν διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης σε γονίδια των προφλεγμονωδών παραγόντων μεταξύ Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και Προεκλαμψίας, μελετήσαμε γενετικές μεταβολές στην προφλεγμονώδη κυτοκίνη ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF και τον υποδοχέα του VEGF-R, μορίων που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην εκδήλωση των ανωτέρω επιπλοκών, με στόχο την πιθανή αναγνώριση προδιαθεσικών παραγόντων για την έγκαιρη διάγνωση των προβλημάτων στην κύηση. Η γονιδιακή ανάλυση ανέδειξε μειωμένη έκφραση του VEGF με ταυτόχρονα αυξημένη έκφραση του VEGF-R στις επιπλεγμένες κυήσεις, όπως στην Προεκλαμψία και στις κυήσεις με προϋπάρχοντα Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. Ανάλογα ήταν τα ευρήματα στις έγκυες γυναίκες με αυξημένο δείκτη μάζας-σώματος, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως το γονιδιακό προφίλ της παχύσαρκης εγκύου έχει κοινό υπόβαθρο με αυτό της διαβητικής και επομένως προδιαθέτει σε επιπλεγμένη κύηση. Σε ό,τι αφορά την

ανάλυση των πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης 6, το αλληλίο G φάνηκε να σχετίζεται με την εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση, είτε με τη μορφή Σακχαρώδη Διαβήτη είτε με τη μορφή Προεκλαμψίας. Και σε αυτήν την περίπτωση, οι παχύσαρκες έγκυες έφεραν τον ίδιο πολυμορφισμό με τις γυναίκες με επιπλεγμένη κύηση, υποδηλώνοντας πως η παχυσαρκία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα πρόκλησης επιπλεγμένης κύησης.

Συνολικά, η κατανόηση της γενετικής και επιγενετικής ρύθμισης στην προεκλαμψία τόσο στο γονιδίωμα στη συστηματική κυκλοφορία της μητέρας όσο και τοπικά στον πλακούντα και σε άλλα εμπλεκόμενα όργανα, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάδειξη νέων βιοδεικτών και πιθανών θεραπευτικών στόχων για τη βέλτιστη διαχείριση της κατάστασης, η οποία δυστυχώς ακόμη και σήμερα αποτελεί σημαντική αιτία αυξημένης μητρικής θνητότητας και/ή περιγεννητικής θνησιμότητας.

2. SUMMARY

Nowadays, the increasing prevalence of obesity today seems to have a negative impact on the gestational period, leading more and more pregnant patients to develop complications such as Gestational Diabetes or Preeclampsia, which is a serious hypertensive disorder of pregnancy.

Epigenetic modifications that modulate gene regulation are thought to be involved in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus, and in addition, epigenetic alterations are thought to play a role in mediating pregnancy-related complications, such as preeclampsia. Having investigated epigenetic mechanisms, such as the change in the methylation status of the DNA of the promoter of the genes involved in inflammation and therefore the modification of gene expression during pregnancy, we came to specific conclusions. The most important of these were the following: Regarding preeclampsia, the IL15 and IL17RA genes were found to be significantly hypermethylated in patients with preeclampsia compared with healthy individuals. In addition, the ATF2, CCL25, IL12B, and IL6ST genes were hypermethylated in Gestational Diabetes compared to Preeclampsia.

Given that we were able to highlight different patterns of methylation between Gestational Diabetes and Preeclampsia in proinflammatory factors, we studied genetic changes in the proinflammatory cytokine interleukin 6 (IL-6) and in vascular endothelial growth factor (VEGF), both known to be involved in the onset of the above complications with the aim of identifying possible predisposing factors for the early diagnosis of such problems in pregnancy. Genetic analysis showed reduced expression of VEGF in complicated pregnancies, such as preeclampsia and pregnancies with pre-existing type 2 diabetes. In contrast, increased expression of VEGF-R receptor levels was identified in these pregnancies. In addition, similar findings were discovered among pregnant women with increased body mass index (BMI), leading to the conclusion that the genetic profile of the obese woman shares a common background with that of the diabetic one and therefore predisposes to complications in pregnancy. Regarding the analysis of interleukin 6 polymorphisms, it was found that the G allele is associated with the occurrence of complications in pregnancy, either in the form of

diabetes or in the form of preeclampsia. It is interesting here that obese pregnant women also carried the same polymorphism, making obesity potentially a form of complicated pregnancy.

Overall, understanding of the genetic and epigenetic regulation of preeclampsia at the level of both the maternal genes and those of the placenta and other organs involved could provide new biomarkers and therapeutic targets for improving the management of this disease, which unfortunately even today is a significant cause of increased maternal mortality and / or perinatal morbidity.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αυξανόμενος επιπολασμός της παχυσαρκίας και της υπερβολικής αύξησης βάρους κατά την κύηση έχει οδηγήσει τις γυναίκες να αναπτύξουν πιο συχνά επιπλοκές εγκυμοσύνης όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης της Κύησης, που μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης με τη μορφή της Προεκλαμψίας. Η προεκλαμψία αποτελεί υπερτασική διαταραχή της κύησης που σχετίζεται με αυξημένη μητρική και περιγεννητική θνητότητα και θνησιμότητα. Παρόλο που η συμπτωματική αντιμετώπιση τα τελευταία χρόνια έχει βελτιωθεί, δεν υπάρχει επί του παρόντος θεραπευτική αγωγή και μόνο η περάτωση του τοκετού, συνήθως πιο πρόωρα, με την απομάκρυνση του πλακούντα ανακουφίζει τη μητέρα από τα συμπτώματα της νόσου.

Η ανώμαλη πλακουντοποίηση, που λαμβάνει χώρα από το πρώτο τρίμηνο της κύησης σε προεκλαμπτικές έγκυες, ευθύνεται για τη διοχέτευση παραγόντων, όπως αντιαγγειογενετικές πρωτεΐνες και φλεγμονώδεις κυτοκίνες, εντός της μητρικής κυκλοφορίας, οι οποίοι μεταβάλλουν τη μητρική ενδοθηλιακή κυτταρική λειτουργία και οδηγούν στα χαρακτηριστικά συστηματικά σημεία και συμπτώματα της Προεκλαμψίας.

Η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών, μέσω των οποίων τα προαναφερθέντα μόρια συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της προεκλαμπτικής εγκύου, αποτέλεσε έναυσμα για τη μελέτη επιλεγμένων γενετικών και επιγενετικών μεταβολών που σχετίζονται με το φαινόμενο και μπορεί να αποτελούν πιθανούς παράγοντες κινδύνου ή προδιαθετικούς παράγοντες για την εμφάνιση Προεκλαμψίας σε έγκυες γυναίκες που πάσχουν από Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και δεν έλαβαν αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση του διαβήτη.

4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

4(A). Υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναίμια και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης της Εγκυμοσύνης αποτελεί μία κατάσταση διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη με έναρξη ή πρώτη αναγνώριση της νόσου στη διάρκεια της κύησης (1).

Η διαβητική κύηση συνδέεται με αλλαγές στη συγκέντρωση ορμονών, αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και μεταβολιτών στη μητρική κυκλοφορία. Αλλαγές συντελούνται τόσο στην εμβρυϊκή κυκλοφορία όσο και στον πλακούντα, που αφορούν τις κυτταροκίνες που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό, τα επίπεδα γλυκόζης και τα επίπεδα ινσουλίνης. Ως αποτέλεσμα, οι πλακούντες στις διαβητικές κυήσεις εμφανίζουν αλλαγές στη μορφολογία και στη λειτουργία τους.

Η υπεργλυκαιμία στην εμβρυϊκή κυκλοφορία προκαλεί υπερινσουλιναίμια στο έμβρυο. Στις διαβητικές έγκυες που λαμβάνουν ινσουλίνη ανευρίσκονται επίσης αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα. Τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στη μητρική και εμβρυϊκή κυκλοφορία επηρεάζουν την ανάπτυξη του πλακούντα εξαιτίας της αυξημένης έκφρασης των υποδοχέων ινσουλίνης και στις δύο πλακουντιακές επιφάνειες.

Οι κυτταροκίνες του λιπώδους ιστού – λιποκυτταροκίνες- συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και δημιουργούν μια προφλεγμονώδη κατάσταση. Αυξημένα επίπεδα του TNF- α ανιχνεύονται στη μητρική κυκλοφορία και παράλληλα μειωμένα επίπεδα στην εμβρυϊκή κυκλοφορία, ενώ η λεπτίνη είναι αυξημένη στο πλάσμα τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο. Η παραγωγή λεπτίνης από τον πλακούντα είναι αυξημένη στη διαβητική κύηση (11, 12, 13).

Όταν η διαβητική κύηση δεν αντιμετωπίζεται εγκαίρως, αυξάνεται ο κίνδυνος για δυσμενή περιγεννητική έκβαση, όπως η Προεκλαμψία, μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από νέα έναρξη υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας, και δυσλειτουργία τελικών οργάνων (2, 3). Οι περισσότερες από τις επιπλεγμένες με προεκλαμψία κυήσεις φτάνουν τελειόμηνες ή σχεδόν τελειόμηνες με ευνοϊκή

μητρική και εμβρυϊκή έκβαση, ωστόσο βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για μητρική και/ή εμβρυϊκή θνητότητα ή σοβαρή νοσηρότητα (4, 5).

Η επίπτωση της υπέρτασης και της προεκλαμψίας είναι αποδεδειγμένα αυξημένη σε έγκυες γυναίκες με διαβήτη κύησης (6). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί πως η αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (7, 8), ενώ η διαταραγμένη ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διάρκεια του διαβήτη (9). Επομένως η ινσουλινοαντίσταση αποτελεί βασικό στοιχείο της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας, με αρκετά στοιχεία να καταδεικνύουν τη φλεγμονή ως κύριο χαρακτηριστικό. Η προς τα άνω ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης οδηγεί σε αγγειακή νόσο, που αποτελεί και τη βάση της ανοσοβιολογίας της προεκλαμψίας (10).

Εικόνα 1



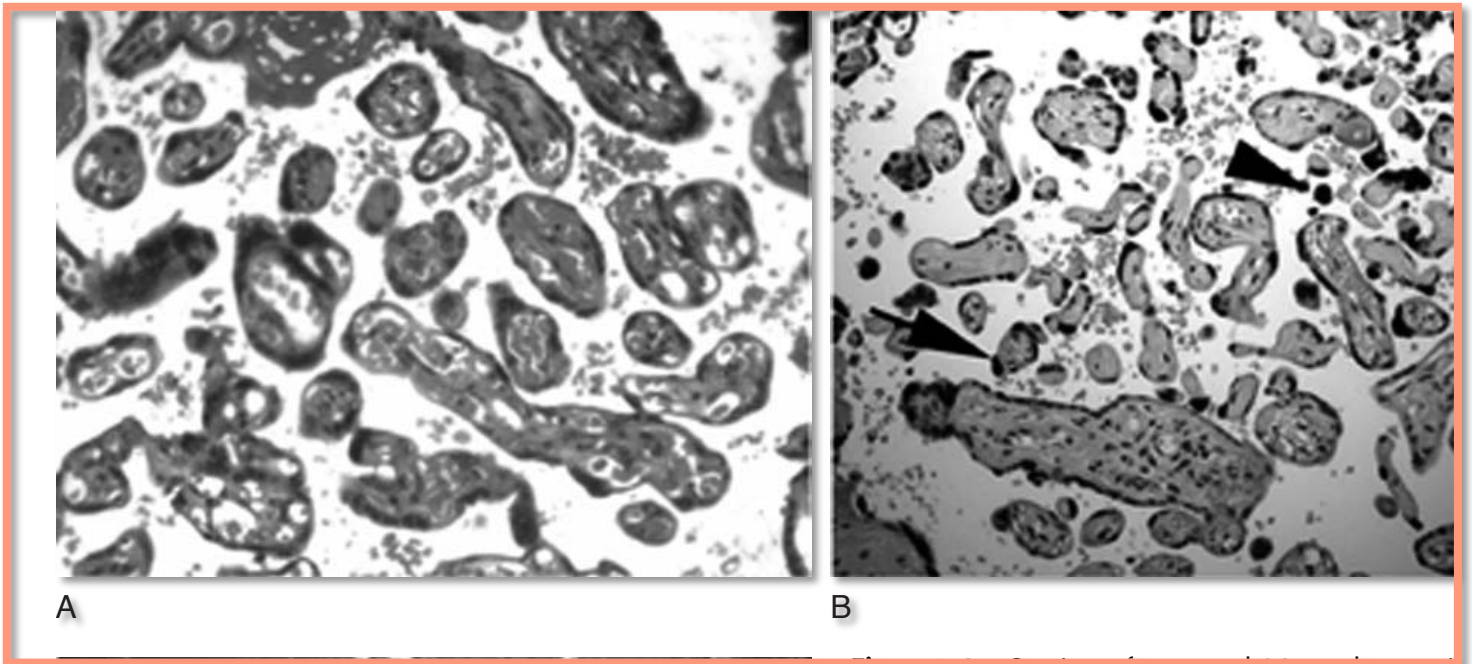
(www.genassistabcs.com)

4(B). Ιστοπαθολογία του πλακούντα στην επιπλεγμένη κύηση

Η παθολογία του πλακούντα στις διαβητικές κυήσεις σχετίζεται με τις διαφορετικές όψεις της μητρικής νόσου. Ενώ κάποια ευρήματα δείχνουν μία άμεση επίδραση της ινσουλίνης στον πλακούντα, τα περισσότερα υποδεικνύουν τις σχετιζόμενες με το διαβήτη συνυπάρχουσες παθήσεις, όπως η υπέρταση. Είναι γνωστό ότι η ινσουλίνη δεν διέρχεται τον πλακούντα, αλλά επαρκή στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχουν υποδοχείς ινσουλίνης στην τροφοβλάστη, των οποίων ο αριθμός μεταβάλλεται ανάλογα με τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα της μητέρας. Η γλυκόζη της μητέρας ελεύθερα εισέρχεται στην εμβρυϊκή κυκλοφορία και η προκαλούμενη εμβρυϊκή υπεργλυκαιμία έχει επίδραση στην ανάπτυξη του πλακούντα.

Δύο από τις κύριες μεταβολές που προκαλεί ο μητρικός διαβήτης είναι η αυξημένη αγγείωση και η ανωριμότητα των λαχνών του πλακούντα. Η αυξημένη αγγείωση είναι απάντηση στην υποξαιμία λόγω της ανωριμότητας των λαχνών που χαρακτηρίζονται από τριχοειδή σε κεντρική θέση δημιουργώντας μεγαλύτερη απόσταση για να διοχετευτεί το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά από τη μητρική στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Σε γενικές γραμμές, οι διαβητικές κυήσεις που δεν επιπλέκονται με υπέρταση εμφανίζουν πλακούντες με λιγότερους συγκυτιακούς κόμβους, μεγαλύτερες λάχνες, κεντρικά τριχοειδικά αγγεία και περισσότερα αγγεία ανά λάχνη σε σύγκριση με τους διαβητικούς πλακούντες με συνοδό υπέρταση (14, 15).

Εικόνα 2



Πλακούς από Α) φυσιολογική κύηση 38 εβδομάδων

Β) κύηση 38 εβδομάδων με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη και χρόνια υπέρταση. Στην εικόνα Β οι χοριακές λάχνες έχουν λιγότερα τριχοειδή και περισσότερους συγκυτιακούς κόμβους (βέλος)

(Textbook of Diabetes and Pregnancy, 2nd edition, Hod, Jovanovic, Di Renzo, De Leiva, Langer, 2008)

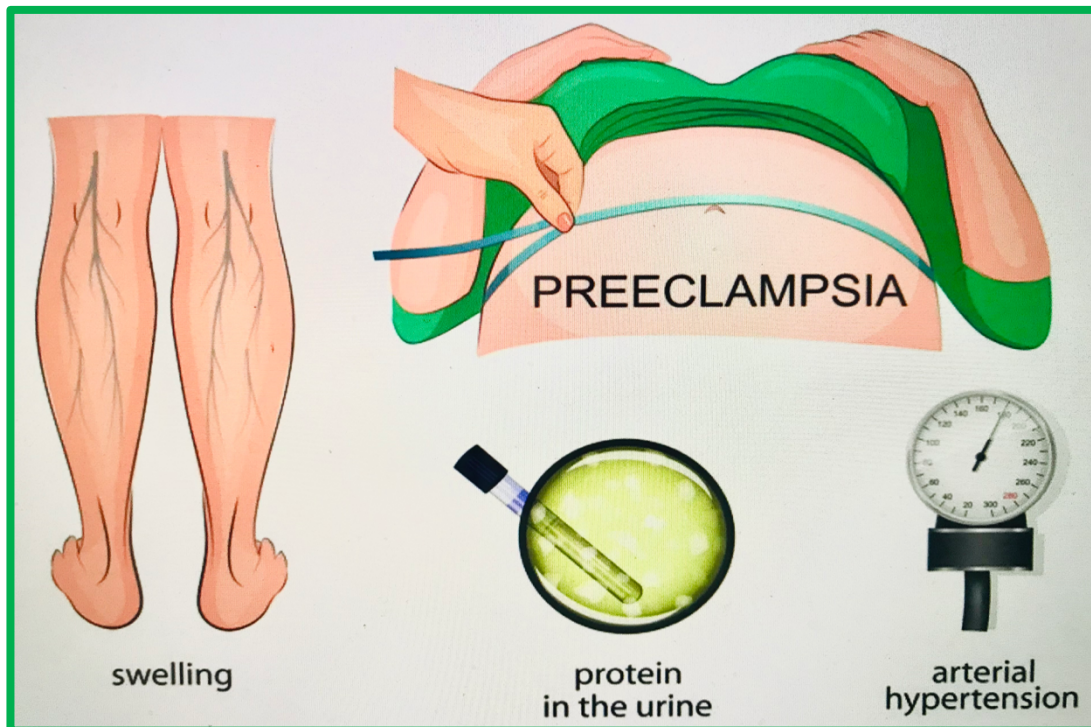
5. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ

5(A). Γενετική στην Προεκλαμψία

- Ορισμός, κλινική εικόνα, παθοφυσιολογία

Η προεκλαμψία είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την έναρξη υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας ή υπέρτασης και δυσλειτουργίας οργάνου – στόχου με ή χωρίς πρωτεϊνουρία μετά τις 20 εβδομάδες κύησης (Πίνακας 1). Επιπρόσθετα σημεία και συμπτώματα περιλαμβάνουν οπτικές διαταραχές, κεφαλαλγία, επιγαστρικό άλγος, θρομβοκυττοπενία και μη φυσιολογική ηπατική λειτουργία. Αυτές οι κλινικές εκδηλώσεις είναι το αποτέλεσμα ήπιας μέχρι σοβαρής μικροαγγειοπάθειας των οργάνων στόχων, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του ήπατος, των νεφρών και του πλακούντα (16). Δυνητικά πιθανές μητρικές επιπλοκές περιλαμβάνουν πνευμονικό οίδημα, εγκεφαλική αιμορραγία, ηπατική ανεπάρκεια, νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο. Οι εμβρυϊκές/ νεογνικές επιπλοκές της νόσου προκύπτουν από την πλακουντιακή υποαιμάτωση και τη συχνή ανάγκη για πρόωρο τοκετό (17).

Εικόνα 3



(www.drugs.com)

Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας πιθανώς περιλαμβάνει τόσο μητρικούς όσο και εμβρυϊκούς/πλακουντιακούς παράγοντες. Ανωμαλίες στην ανάπτυξη της αγγείωσης του πλακούντα νωρίς στην κύηση μπορούν να οδηγήσουν σε σχετική πλακουντιακή υποαιμάτωση /υποξία/ ισχαιμία, τα οποία οδηγούν στην απελευθέρωση αντιαγγειογενετικών παραγόντων εντός της μητρικής κυκλοφορίας που μεταβάλλουν τη μητρική συστηματική ενδοθηλιακή λειτουργία και προκαλούν υπέρταση και άλλες εκδηλώσεις της νόσου (αιματολογική, νευρολογική, καρδιαγγειακή, πνευμονική, νεφρική και ηπατική δυσλειτουργία) (18). Ωστόσο, το έναυσμα για την ανώμαλη πλακουντιακή ανάπτυξη και την επακόλουθη αλληλουχία των γεγονότων παραμένει άγνωστο.

Οι ανωμαλίες στην ανάπτυξη της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας λαμβάνουν χώρα πολύ πριν οι κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας γίνουν εμφανείς. Στην προεκλαμψία, η κυτταροτροφοβλάστη διηθεί το φθαρτοειδές τμήμα των σπειροειδών αρτηριών, αλλά αποτυγχάνει να διεισδύσει στο αντίστοιχο τμήμα του μυομητρίου. Συνεπώς, τα μεγάλα, ελικοειδή αγγειακά κανάλια που χαρακτηρίζουν το φυσιολογικό πλακούντα δεν αναπτύσσονται: αντιθέτως, τα αγγεία παραμένουν με στενό αυλό, οδηγώντας σε υποαιμάτωση και ισχαιμία. Περιβαλλοντικοί, ανοσολογικοί και γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν όλοι ρόλο σε αυτή τη διαδικασία.

Πίνακας 1: Κριτήρια για τη διάγνωση της Προεκλαμψίας

Συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mmHg ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mmHg σε δύο τουλάχιστον περιπτώσεις με 4 ώρες διαφορά μεταξύ τους μετά τις 20 εβδομάδες κύησης σε προηγουμένως νορμοτασικό ασθενή και νέα εμφάνιση 1 ή περισσότερων από τα ακόλουθα:

- Πρωτεϊνουρία ≥ 0.3 g σε μέτρηση ούρων 24ωρου ή λόγος πρωτεΐνης/ κρεατινίνης ≥ 0.3 (mg/mg) (30 mg/mmol) σε τυχαίο δείγμα ούρησης ή stick ούρων $\geq +2$
- Αιμοπετάλια $< 100,000/\text{microL}$
- Κρεατινίνη ορού > 1.1 mg/dL (97.2 micromol/L) ή διπλασιασμός της συγκέντρωσης της κρεατινίνης απουσία άλλης νεφρικής νόσου
- Τρανσαμινάσες ήπατος τουλάχιστον διπλάσιες του ανώτερου ορίου της φυσιολογικής τιμής
- Πνευμονικό οίδημα
- Εγκεφαλικά ή οπτικά συμπτώματα (πχ, πρωτοεμφάνιση επίμονης κεφαλαλγίας που δεν αποδίδεται σε άλλες αιτίες και που δεν ανταποκρίνεται σε συνήθεις δόσεις αναλγητικών, θολή όραση, φωταψίες/ σπίθες, σκοτώματα)

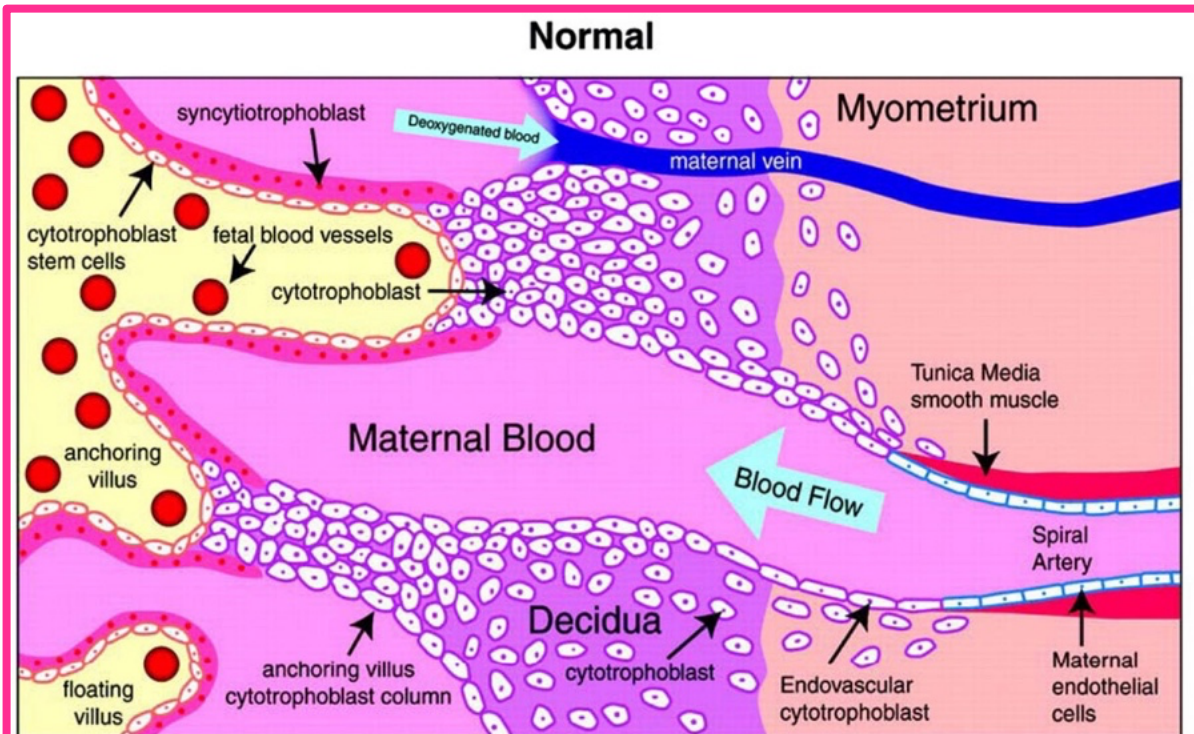
5(B). Ο ρόλος της συστηματικής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην Προεκλαμψία

Όλες οι κλινικές εκδηλώσεις της Προεκλαμψίας μπορούν να θεωρηθούν κλινικές απαντήσεις στη γενικευμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (19, 20). Η υπέρταση προκύπτει λόγω της διαταραγμένης ενδοθηλιακής ρύθμισης του αγγειακού τόνου, η πρωτεϊνουρία και το οίδημα προκαλούνται από την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, ενώ η αγγειοπάθεια είναι το αποτέλεσμα της ανώμαλης ενδοθηλιακής έκφρασης των πρώιμων παραγόντων πήξης. Η κεφαλαλγία, οι κρίσεις, τα οπτικά συμπτώματα, το άλγος επιγαστρίου και η ενδομήτρια υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη αποτελούν τα επακόλουθα της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας του αγγειακού συστήματος των οργάνων στόχων, όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, οι νεφροί και ο πλακούντας.

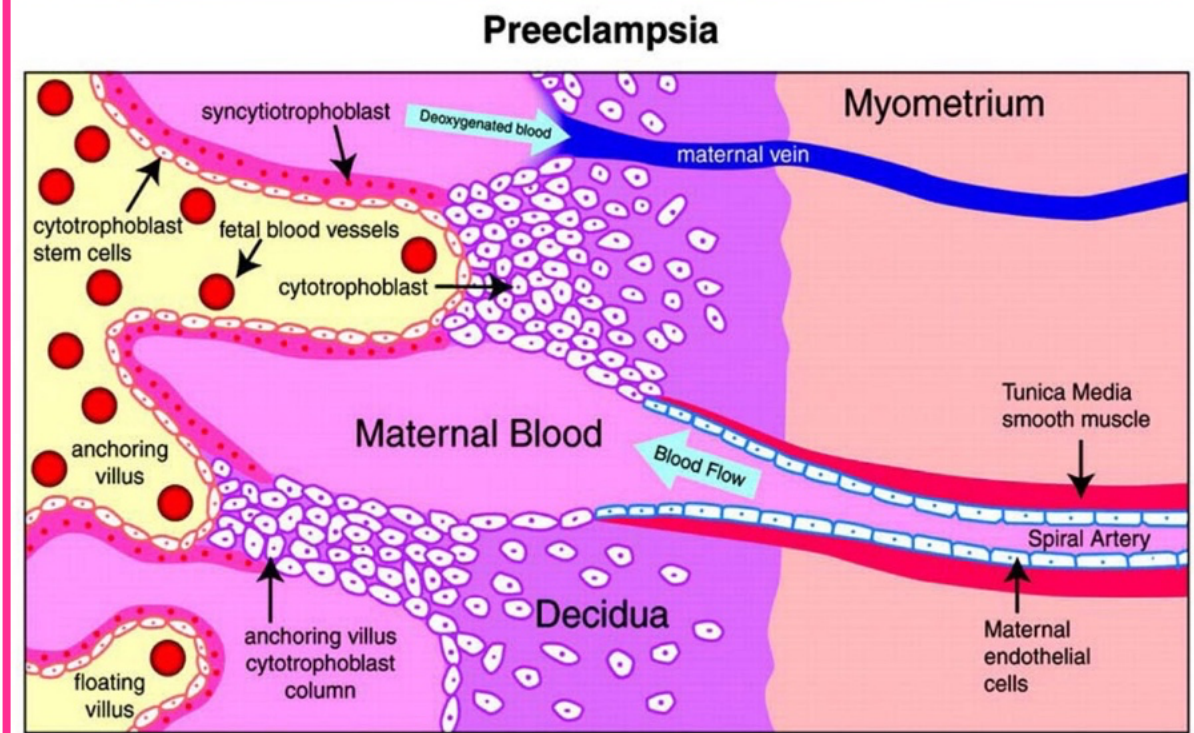
Σε ότι αφορά την παθοφυσιολογία του πλακούντα στις κυήσεις που επιπλέκονται από Προεκλαμψία, πρέπει πρώτα να γίνει αναφορά στο μηχανισμό πλακουντοποίησης της φυσιολογικής κύησης. Σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες, η εξωλαχνική κυτταροτροφοβλάστη εμβρυϊκής προέλευσης εισβάλλει στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας του φθαρτού και του μυομητρίου. Αυτή η διεισδυτική κυτταροτροφοβλάστη αντικαθιστά το ενδοθηλιακό στρώμα των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών, μετατρέποντάς αυτές από μικρά αγγεία υψηλής αντοχής σε αγγεία μεγάλου διαμετρήματος (Εικόνα 4A). Ωστόσο, στην Προεκλαμψία, αυτός ο μετασχηματισμός είναι ατελής. Η διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες περιορίζεται στον επιφανειακό φθαρτό και δε φτάνει στο μυομήτριο (Εικόνα 4B).

Εικόνα 4

A



B



(Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. Hypertension 2005;46:1077-85)

- **Ρόλος των VEGF, PlGF, και sFlt-1**

Η διαδικασία πλακουντοποίησης στα θηλαστικά απαιτεί εκτεταμένη αγγειογένεση για την εγκατάσταση ικανού αγγειακού δικτύου για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο. Μια ποικιλία προ-αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, PlGF) και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (sFlt-1) εκφράζονται από τον αναπτυσσόμενο πλακούντα, με την ισορροπία μεταξύ τους να επιτελεί κρίσιμο ρόλο για τη φυσιολογική πλακουντιακή ανάπτυξη. Η αυξημένη παραγωγή αντι-αγγειογενετικών παραγόντων διαταράσσει αυτήν την ισορροπία και οδηγεί σε συστηματική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που χαρακτηρίζει την προεκλαμψία.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF αποτελεί μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την αγγειακή λειτουργία. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3, αποτελείται από οκτώ εξώνια και είναι ένα ειδικό ενδοθηλιακό μιτογόνο που διαδραματίζει ρολό «κλειδί» στην παραγωγή της αγγειογένεσης (21, 22). Συνεπώς, ο VEGF θεωρείται ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό της τροφοβλάστης, του εμβρυονικού αγγειακού συστήματος και των μητρικών και εμβρυϊκών αιμοποιητικών κυττάρων *in utero*. Υπάρχουν αρκετοί μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (sNPS) στο γονίδιο του VEGF, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση και την πρωτεϊνική παραγωγή, και ενδεχομένως να επηρεάζουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη νόσων που χαρακτηρίζονται από διαταραγμένη αγγειογένεση, όπως η προεκλαμψία (23).

Οι δράσεις του VEGF διαμεσολαβούνται πρωτίστως μέσω της αλληλεπίδρασής του με τους δύο υψηλής συνάφειας υποδοχείς τυροσίνης – κινάσης, VEGFR-1 και VEGFR-2, οι οποίοι εκφράζονται επιλεκτικά επάνω στην αγγειώδη ενδοθηλιακή κυτταρική επιφάνεια. Ο VEGF έχει δύο ισομορφές: μια διαμεμβρανική ισομορφή και μια διαλυτή ισομορφή (sFlt-1 ή sVEGFR-1). Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PlGF) είναι ένα ακόμα μέλος της VEGF οικογένειας, ο οποίος παράγεται πρωτίστως εντός του πλακούντα και συνδέεται με τον υποδοχέα VEGFR-1.

Ο sFlt-1 ανταγωνίζεται την προ-αγγειογενετική βιολογική δραστηριότητα των κυκλοφορούντων VEGF και PlGF, μέσω της πρόσδεσης σε αυτούς και της παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασής τους με τους ενδογενείς υποδοχείς τους. Η αυξημένη πλακουντιακή έκφραση και έκκριση του sFlt-1 φαίνεται ότι διαδραματίζει

κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας, όπως προκύπτει από πλήθος παρατηρήσεων (24-33):

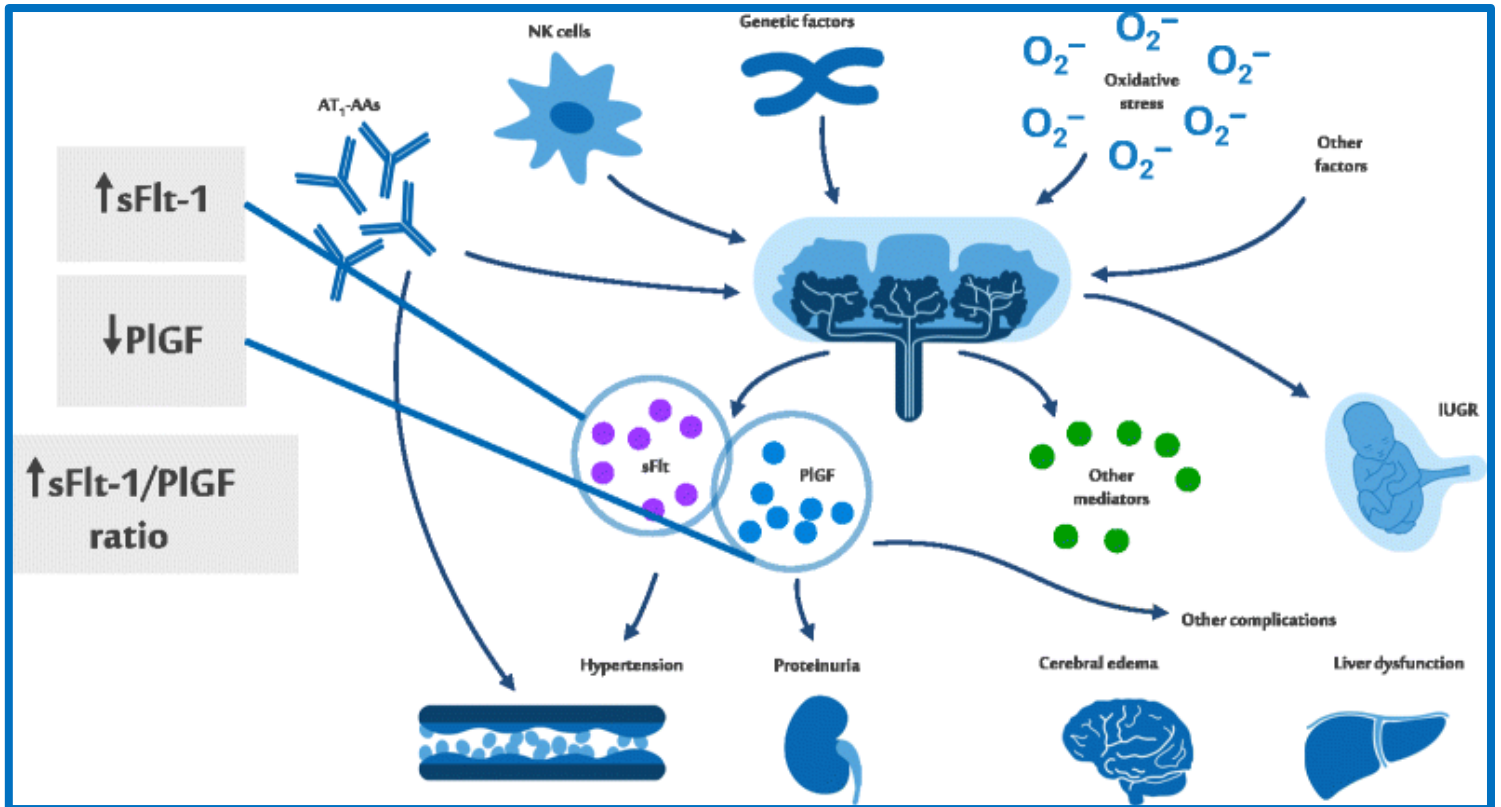
- Η χορήγηση sFlt-1 σε έγκυα ποντίκια προκαλεί λευκωματουρία, υπέρταση και νεφρικές μεταβολές του πειραματικού ενδοθηλίου.
- Η απομάκρυνση του sFlt-1 in vitro, σε καλλιέργειες κυττάρων προεκλαμπτικού ιστού αποκαθιστά την ενδοθηλιακή λειτουργία και αγγειογένεση σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντίστροφα, η εξωγενής χορήγηση των VEGF και PlGF αντιστρέφει το αντι-αγγειογενετικό περιβάλλον που προκαλεί η περίσσεια του sFlt-1.
- Σε προεκλαμπτικές ασθενείς, τα κυκλοφορούντα επίπεδα του sFlt-1 είναι αυξημένα ενώ τα επίπεδα του ελεύθερου VEGF και ελεύθερου PlGF είναι μειωμένα, σε σύγκριση με ασθενείς με φυσιολογική πίεση. Μελέτες έχουν δείξει πως οι γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα VEGF και PlGF αρκετά νωρίτερα από την κλινική εμφάνιση της νόσου (31, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Μία μελέτη έδειξε ότι, αν και τα επίπεδα του sFlt-1 αυξάνουν κατά τη διάρκεια της κύησης σε όλες τις γυναίκες, η αύξηση αυτή συντελείται νωρίτερα στην κύηση (στις 21–24 εβδομάδες, αντί για τις 33-36 εβδομάδες) και σε μεγαλύτερο βαθμό σε αυτές που θα εμφανίσουν προεκλαμψία (16). Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα sFlt-1 στον ορό μεταξύ των δύο ομάδων (φυσιολογικών και προεκλαμπτικών) ήταν εμφανής πέντε εβδομάδες πριν από την έναρξη της κλινικής νόσου. Τα επίπεδα των PlGF και VEGF μειώθηκαν ταυτόχρονα με την αύξηση του sFlt-1.
- Σε άλλη μελέτη, η συγκέντρωση του sVEGFR-1 σχετίστηκε με την αυξανόμενη δριμύτητα της νόσου. Υψηλότερη συγκέντρωση καταγράφηκε σε γυναίκες με σοβαρή ή πρώιμη (<34 εβδομάδες) προεκλαμψία, σε σύγκριση με εκείνες που εμφάνισαν ήπια ή όψιμη προεκλαμψία (13). Επιπλέον, οι γυναίκες με προεκλαμψία είχαν υψηλότερα επίπεδα sVEGFR-1 σε σχέση με τις γυναίκες που διατήρησαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση, δύο έως πέντε εβδομάδες πριν από την έναρξη της κλινικής νόσου (28).

- Μεταβολές στα επίπεδα των sFlt-1 και PlGF σχετίζονται με δυσμενείς μητρικές και περιγεννητικές επιπτώσεις που σχετίζονται με την προεκλαμψία (40, 41, 42, 43, 44).

Παρόλα αυτά, το έναυσμα για την αυξημένη παραγωγή sFlt-1 από τον πλακούντα παραμένει άγνωστο. Το πιθανότερο αίτιο είναι η ισχαιμία του πλακούντα. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν η αυξημένη έκκριση sFlt-1 ευθύνεται για τις πρώιμες αναπτυξιακές ανωμαλίες του πλακούντα που χαρακτηρίζουν την προεκλαμψία, ή εάν αυτό αποτελεί δευτερογενή απάντηση στην πλακουντιακή ισχαιμία που προκαλείται από κάποιο άλλο παράγοντα. Γενετικοί παράγοντες πιθανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υπερβολική παραγωγή sFlt-1, ενώ έχει ενοχοποιηθεί και το μέγεθος του πλακούντα (45). Η υψηλή τιμή του λόγου sFlt-1/PlGF στο πλάσμα μπορεί πιθανώς να αναγνωρίσει τις γυναίκες, για τις οποίες απαιτείται τοκετός εντός δύο εβδομάδων εξαιτίας σοβαρής προεκλαμψίας (26). Στο μέλλον, η αποφυγή ή η χορήγηση φαρμάκων που ελαττώνουν τα επίπεδα sFlt-1 ή προάγουν τα επίπεδα PlGF αντίστοιχα μπορεί να χρησιμεύσει για την αποτροπή ή τη θεραπεία της προεκλαμψίας (46-50). Η θεραπεία με χαμηλού μοριακού βάρους ασπιρίνη έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα PlGF στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (51).

Ο ισχαιμικός πλακούντας φαίνεται ότι διοχετεύει παράγοντες (όπως αντι-αγγειογενετικές πρωτεΐνες και φλεγμονώδεις κυτοκίνες) εντός της μητρικής κυκλοφορίας, οι οποίοι μεταβάλλουν τη μητρική ενδοθηλιακή κυτταρική λειτουργία και οδηγούν στα χαρακτηριστικά συστηματικά σημεία και συμπτώματα της προεκλαμψίας. Η σχέση μεταξύ της προϋπάρχουσας αγγειακής νόσου και της προδιάθεσης για εμφάνιση προεκλαμψίας πιθανώς να οφείλεται σε προϋπάρχουσα ενδοθηλιακή κυτταρική καταστροφή. Αυτή η προϋπάρχουσα κυτταρική βλάβη είναι δυνατόν επίσης να εξηγήσει το λόγο που οι γυναίκες με προεκλαμψία βρίσκονται και σε αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρδιαγγειακή νόσο αργότερα στη ζωή τους.

Εικόνα 5



Η αναλογία sFlt-1/PlGF μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό γυναικών που είναι πιθανό να αναπτύξουν προεκλαμψία ή να έχουν πρόωρο τοκετό.

(Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology* [Bethesda]. 2009;24:147–158)

5(Γ). Πολυμορφισμοί του VEGF στην Προεκλαμψία

Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNPs) του VEGF έχουν αναγνωρισθεί έως σήμερα, και από τα μέσα της δεκαετίας του 2000 πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αξιολογήσουν τη συσχέτισή τους με αυξημένο κίνδυνο και προδιάθεση για προεκλαμψία. Οι πολυμορφισμοί, οι οποίοι έχουν μελετηθεί κυρίως και για τους οποίους μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τη συνεισφορά ή επίδρασή τους στην εμφάνιση προεκλαμψίας, είναι τέσσερις, και πιο συγκεκριμένα οι -634 G/C (rs2010963), +936 C/T (rs3025039), -1154 G/A (rs1570360) και -2578 C/A (rs699947). Ωστόσο, ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών είναι σχετικά περιορισμένος, περιλαμβάνουν μικρούς πληθυσμούς και παρουσιάζουν μεθοδολογικές διαφορές μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την καταγραφή ετερογενών ευρημάτων. Επιπλέον, η μεγαλύτερη πλειονότητα των διαθέσιμων δεδομένων αφορά σε Ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ λίγα στοιχεία έχουν προκύψει για τους Καυκάσιους.

▪ Πολυμορφισμός -634 G/C (rs2010963)

Ένας από τους πολυμορφισμούς του VEGF που έχουν μελετηθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό είναι ο -634 G/C (rs2010963), ο οποίος εντοπίζεται στο 5' UTR άκρο του γονιδίου. Ο γονότυπος GG έχει συσχετιστεί με αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου και αντίθετα ο γονότυπος CC με μειωμένη έκφραση, και ως εκ τούτου το αλληλίο C έχει ενοχοποιηθεί για χαμηλή έκφραση του VEGF και πρόκληση της έναρξης της προεκλαμψίας (52).

Τα ευρήματα για τον πολυμορφισμό -634 G/C είναι ετερογενή, με αρκετές μελέτες να μην έχουν διαπιστώσει καμία συσχέτιση με την προεκλαμψία σε διαφορετικούς πληθυσμούς (53, 54, 55, 56, 57). Αντίθετα, μία μελέτη από τους Bányász και συνεργάτες έδειξε πως το αλληλίο G συνοδεύεται από μεγαλύτερη παραγωγή VEGF και ως αποτέλεσμα μειώνει τον κίνδυνο για σοβαρή προεκλαμψία (58). Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν σε μεταγενέστερη μελέτη σε Ασιατικό πληθυσμό, στην οποία αν και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συχνότητα του πολυμορφισμού -634G/C ανάμεσα στις γυναίκες με προεκλαμψία και τις υγιείς μάρτυρες, αυξημένη συχνότητα καταγράφηκε στις γυναίκες με σοβαρή προεκλαμψία σε σχέση με αυτές με πιο ήπια

μορφή της νόσου. Επιπλέον, ο γονότυπος CC σχετίστηκε με χαμηλά επίπεδα VEGF στον ορό των γυναικών (59). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο πολυμορφισμός -634 G/C σχετίζεται με τη σοβαρού βαθμού προεκλαμψία και η παρουσία του αλληλίου C είναι πιθανός παράγοντας κινδύνου για προδιάθεση για σοβαρή προεκλαμψία (59). Επίσης και στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, μία μελέτη από το 2008 έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού -634 G/C με τον κίνδυνο για εκδήλωση προεκλαμψίας (60).

Δύο παλαιότερες μετα-αναλύσεις το 2013 των έως τότε δημοσιευμένων δεδομένων (61, 62) ανέδειξαν θετική σχέση ανάμεσα στον πολυμορφισμό -634 G/C και τον κίνδυνο για προεκλαμψία, και συσχέτιση του αλληλίου C, με μεγαλύτερη προδιάθεση για εμφάνιση προεκλαμψίας στον συνολικό πληθυσμό που συμπεριλήφθηκε στη μελέτη ανεξαρτήτως εθνοτικής καταγωγής. Επιπλέον, η ανάλυση των Song και συνεργάτες κατέγραψε αντίστοιχη συσχέτιση μεμονωμένα και στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (61). Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση του 2020 μελέτησε τη συσχέτιση ανάμεσα στους 4 πιο συχνούς πολυμορφισμούς του VEGF, πιο συγκεκριμένα τους +936 C/T (rs3025039), -634 G/C (rs2010963), -2578 C/A (rs699947) και -1154 G/A (rs1570360), και τον κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας (63). Στην τελική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα από 23 μελέτες που είχαν δημοσιευτεί πριν την 1η Απριλίου 2019, σε συνολικά 2597 περιστατικά γυναικών με προεκλαμψία και 3075 υγιείς μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, ο πολυμορφισμός -634G/C του VEGF δε συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για προεκλαμψία στο συνολικό πληθυσμό. Αντίθετα, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Ωστόσο, σύμφωνα με τους ερευνητές, το εύρημα δε θεωρήθηκε αρκετά ισχυρό και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς Ευρωπαίων γυναικών (63). Η συσχέτιση του πολυμορφισμού -634G/C με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας στους Καυκάσιους επιβεβαιώθηκε και σε μία άλλη μεγάλη μετα-ανάλυση του 2020 από τους Duan και συνεργάτες (64).

- **Πολυμορφισμός +936 C/T (rs3025039)**

Ο πολυμορφισμός +936 C/T (rs3025039) βρίσκεται στο 3' UTR άκρο του γονιδίου του VEGF. Το αλληλίο C φέρει μία θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη AP-4 (activator protein-4), η σύνδεση της οποίας ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου του VEGF

(65). Η παρουσία του αλληλίου T οδηγεί σε απώλεια της θέσης σύνδεσης της AP-4, με αποτέλεσμα την έκφραση μειωμένων επιπέδων VEGF στους φορείς του γονότυπου TT (66). Η επίδραση του πολυμορφισμού +936 C/T στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGF αποτέλεσε έναυσμα για τη διερεύνηση του πιθανού του ρόλου ως προδιαθεσιακό παράγοντα για την εμφάνιση προεκλαμψίας, ωστόσο με ποικίλα και αντικρουόμενα ευρήματα.

Κάποιες από τις παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει θετική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό +936 C/T και την προεκλαμψία σε γυναίκες από την Ασία και την Ελλάδα, και πρότειναν την παρουσία του αλληλίου T ως παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας (67) και σοβαρής προεκλαμψίας (53, 68). Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε μία πρόσφατη μελέτη του 2020 σε γυναίκες από το Σουδάν (69), όπου ο πολυμορφισμός +936 C/T σχετίστηκε ισχυρά με την πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας. Η συχνότητα του αλληλίου T ήταν μεγαλύτερη στις γυναίκες με προεκλαμψία σε σχέση με τις υγιείς μάρτυρες και αξιολογήθηκε ως παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας (70). Αντίθετα, μία πιο πρόσφατη μελέτη σε δείγμα γυναικών από τις Φιλιππίνες, επίσης έδειξε συσχέτιση με την προεκλαμψία, αλλά συσχέτισε το αλληλίο C με την προδιάθεση για εμφάνιση προεκλαμψίας (57). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, το αλληλίο T, το οποίο συνοδεύεται από χαμηλή έκφραση του VEGF, συμμετέχει στη διατήρηση μιας φυσιολογικής κύησης ασκώντας προστατευτικό ρόλο έναντι της εμφάνισης προεκλαμψίας. Αυτό το φαινόμενο είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση πως οι γυναίκες με προεκλαμψία έχουν αυξημένα επίπεδα VEGF. Οι συγγραφείς εκτιμούν πως η ετερογένεια μεταξύ των ευρημάτων τους με τις άλλες μελέτες πιθανώς να οφείλεται στην καταγωγή και το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών που έχουν συμπεριληφθεί στην κάθε μελέτη (72). Ταυτόχρονα, άλλες μελέτες δε βρήκαν καμία συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό +936 C/T και την προεκλαμψία (43, 71, 72). Η απουσία συσχέτισης ανάμεσα στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό και την προεκλαμψία επιβεβαιώθηκε και σε μία σύγχρονη μελέτη του 2021 σε γυναίκες από το Περού (72). Αν και ο γονότυπος TT ήταν πιο συχνός σε γυναίκες με προεκλαμψία, ενώ ο γονότυπος CT στην ομάδα ελέγχου, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για τον πολυμορφισμό του VEGF +204 G/C. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι

δύο πολυμορφισμοί του VEGF δεν σχετίζονται με την προεκλαμψία και δεν φαίνεται να αποτελούν γενετικούς δείκτες για την προδιάθεση για εμφάνιση προεκλαμψίας, τουλάχιστον στο συγκεκριμένο πληθυσμό (72).

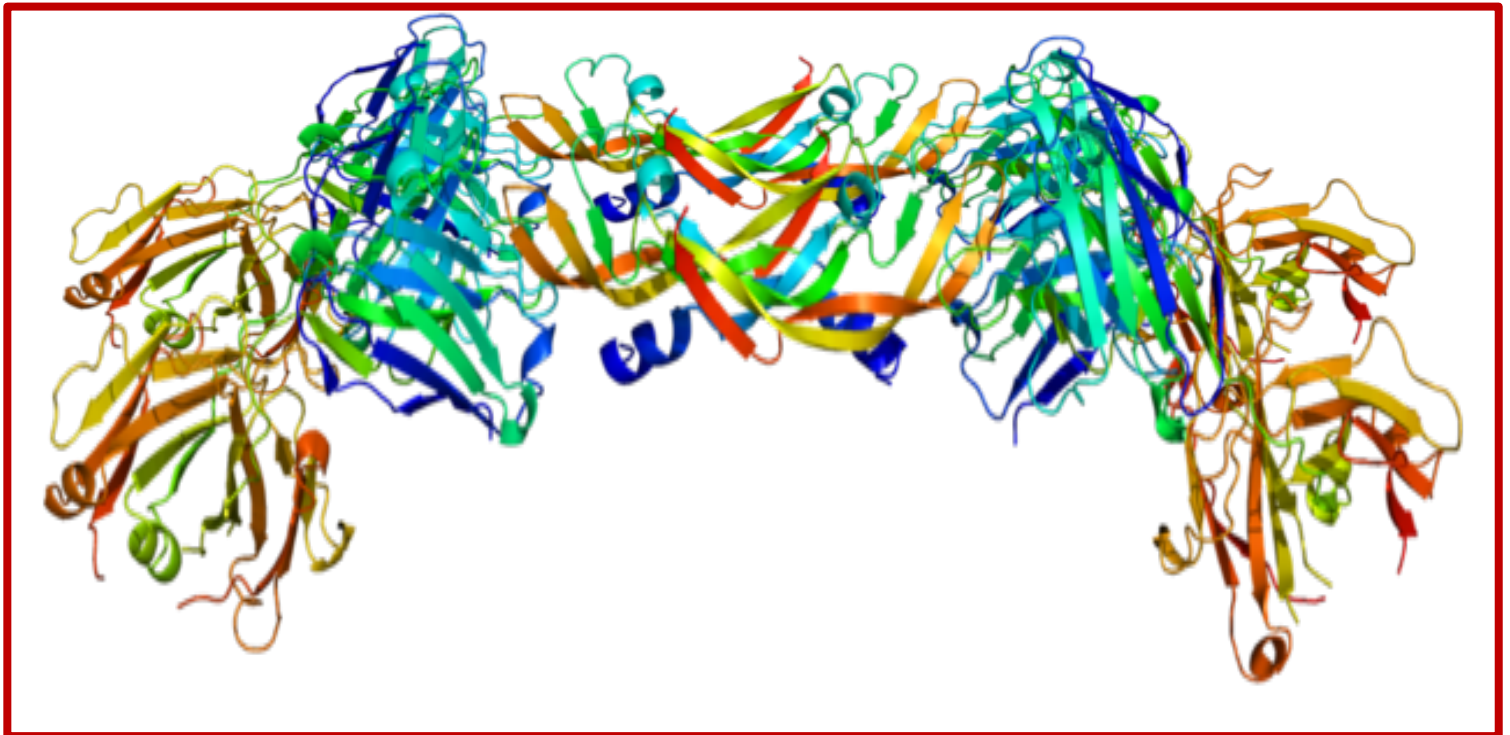
Η μετα-ανάλυση του Cheng και συνεργατών από 11 μελέτες σε 805 περιστατικά με προεκλαμψία και 1.033 μάρτυρες (62) ανέδειξε τον πολυμορφισμό +936 C/T ως παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας. Οι φορείς του αλληλίου T βρέθηκαν να είναι σε αυξημένο κίνδυνο για προεκλαμψία σε σχέση με τους φορείς του γονότυπου CC (62). Η μετα-ανάλυση του Song και συνεργατών το ίδιο έτος (61) επιβεβαίωσε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού και του αλληλίου T με την προεκλαμψία, αλλά το εύρημα παρατηρήθηκε μόνο στον Ασιατικό πληθυσμό, ενώ υπήρχε απουσία συσχέτισης στους Ευρωπαίους (61). Η μεταγενέστερη μετα-ανάλυση του 2020 των Wang και συνεργατών σε 14 μελέτες με 1.711 περιστατικά προεκλαμψίας και 2.100 υγιείς μάρτυρες (63) κατέληξε πως υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και τον κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας και πως το αλληλίο T καθιστά τους φορείς επιρρεπείς στην εμφάνιση της νόσου, πιθανώς λόγω των τροποποιημένων επιπέδων έκφρασης του VEGF. Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε τον ρόλο του πολυμορφισμού +936 C/T ως παράγοντα κινδύνου για προεκλαμψία τόσο στον Ασιατικό όσο και στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (64). Σε συμφωνία, και η άλλη μεγάλη μετα-ανάλυση του 2020 από τους Duan και συνεργάτες (64) σε 1.426 περιπτώσεις με προεκλαμψία και 1.872 μάρτυρες, επιβεβαίωσε τον αυξημένο κίνδυνο των φορέων του αλληλίου T για εμφάνιση προεκλαμψίας. Περαιτέρω ανάλυση υπο-ομάδων με βάση την εθνοτική καταγωγή ανέδειξε ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο για τον Κινέζικο πληθυσμό (64).

▪ **Πολυμορφισμοί -1154 G/A (rs1570360) και -2578 C/A (rs699947)**

Οι πολυμορφισμοί -1154 G/A (rs1570360) και -2578 C/A (rs699947) εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου VEGF, ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς σε σχέση με την προεκλαμψία, και υποδεικνύουν απουσία συσχέτισης με την εμφάνιση προεκλαμψίας (59, 54, 58, 73). Το μοναδικό εύρημα έως τώρα σε μία μόνο μελέτη είναι πως ο πολυμορφισμός -2578 C/A, και

συγκεκριμένα η παρουσία του αλληλίου A, σχετίζεται με πιο πρόωρη διάγνωση πρωτεϊνουρίας και υπέρτασης, υποδηλώνοντας πως μπορεί να είναι μεσολαβητής στην πρόοδο της προεκλαμψίας (57). Πράγματι, και οι μετα-αναλύσεις επιβεβαιώνουν πως η παρουσία αυτών των δύο πολυμορφισμών δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας, ωστόσο ο μικρός αριθμός των διαθέσιμων δεδομένων περιορίζει την αξιοπιστία των ευρημάτων (60, 61, 62). Περισσότερες μελέτες σε μεγάλους και διαφορετικούς πληθυσμούς απαιτούνται για την επικύρωση των δεδομένων.

Εικόνα 6



VEGF

(Εικόνα από Wikipedia)

5(Δ). Απλότυποι του VEGF στην Προεκλαμψία

Μία πρόσφατη μελέτη σε γυναίκες από την Τυνησία (300 γυναίκες με προεκλαμψία και 300 μάρτυρες) αξιολόγησε την παρουσία των 10 πιο συχνών και λιγότερο συχνών πολυμορφισμών του VEGF και τη συσχέτισή τους με τον κίνδυνο για προεκλαμψία (74). Τα αποτελέσματα δεν ανέδειξαν σημαντική διαφορά στις συχνότητες των πολυμορφισμών μεταξύ των 2 ομάδων γυναικών και καταγράφηκε απουσία συσχέτισης ανάμεσα σε κάθε πολυμορφισμό, μεμονωμένα και την προεκλαμψία. Ωστόσο, αναδείχθηκαν 7 πολυμορφισμοί, οι οποίοι όταν συνδυάζονται σε συγκεκριμένους απλότυπους, σχετίζονται θετικά ή αρνητικά με την εμφάνιση προεκλαμψίας. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη έδειξε πως οι γνωστοί πολυμορφισμοί του VEGF -634 G/C (rs2010963), -1154 G/A (rs1570360) και -2578 C/A (rs699947), σε συνδυασμό με τους λιγότερο μελετημένους πολυμορφισμούς -1498 T/C (rs833061), -460 T/C (rs25648), +398 G/A (rs833068) and +497 G/A (rs833070) δημιουργούν συγκεκριμένους απλότυπους με διαφορετική συχνότητα εμφάνισης σε γυναίκες με προεκλαμψία σε σχέση με αυτές που φυσιολογική κύηση. Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν 3 απλότυποι (ATGCCAA, ACAGCAG και CCAGCGG), οι οποίοι συνδέονται με αυξημένη προδιάθεση για προεκλαμψία, και 2 απλότυποι (CCAGCAA και ATGCCGG) με προστατευτική επίδραση. Επιπλέον, ο απλότυπος ATGCCAA σχετίστηκε με τη βαρύτητα της προεκλαμψίας, ενώ οι φορείς του απλότυπου CCGGTAG είχαν μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας. Συνολικά οι ερευνητές πρότειναν πως η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας φαίνεται να καθορίζεται κυρίως από τους απλότυπους του VEGF γονιδίου, παρά από την παρουσία μεμονωμένων πολυμορφισμών. Συγκεκριμένοι απλότυποι μπορεί ενδεχομένως να αποτελούν δυνητικούς δείκτες γενετικής προδιάθεσης, και μένει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες κοόρτες ασθενών και σε πληθυσμούς διαφορετικής φυλετικής/εθνοτικής καταγωγής (74).

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι πως παλαιότερη μελέτη σε Μεξικάνικο πληθυσμό είχε διερευνήσει τους απλότυπους από τον συνδυασμό 5 πολυμορφισμών του VEGF, και πιο συγκεκριμένα των -2578 C/A (rs699947), -1154 G/A (rs1570360), +405 G/C (rs2010963) και -7C/T (rs25648), αλλά βρήκε απουσία συσχέτισης με την προεκλαμψία (55). Αντικρουόμενα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε άλλη μελέτη σε

303 εγκύους γυναίκες με προεκλαμψία (94), υπέρταση κύησης (101) ή φυσιολογική κύηση (108), στις οποίες μελετήθηκε ο συνδυασμός των πολυμορφισμών -2578 C/A, -1154 G/A και -634 G/C (60). Ο απλότυπος -2578C, -1154G και -634C, ο οποίος σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF, ήταν πιο σπάνιος στην ομάδα των γυναικών με προεκλαμψία σε σχέση με τις μάρτυρες, και ως εκ τούτου προτάθηκε πως πιθανώς να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της εμφάνισης προεκλαμψίας (60).

5(E). Πολυμορφισμοί του VEGF στον πλακούντα και στο έμβρυο

Περιορισμένος αριθμός μελετών έχει αξιολογήσει τους πολυμορφισμούς του VEGF στον πλακούντα των γυναικών με προεκλαμψία. Μία πρόσφατη μελέτη διερεύνησε τους πολυμορφισμούς -634 G/C, -2549 I/D, και -1154 G/A στο γενετικό υλικό από τον πλακουντιακό ιστό γυναικών με προεκλαμψία και υγιών μαρτύρων Ασιατικής καταγωγής (60). Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη mRNA έκφραση του VEGF στον πλακούντα των γυναικών με προεκλαμψία, οι οποίες έφεραν το γονότυπο -634C/C, σε σχέση με αυτές με τους γονοτύπους GG και CG. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τον πιθανό ρόλο του γονότυπου -634C/C ως παράγοντα κινδύνου για προεκλαμψία. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς -2549 I/D και -1154G/A και στην mRNA έκφραση στις γυναίκες με προεκλαμψία καθώς και στις υγιείς μάρτυρες (60). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαίωσαν προηγούμενες παρατηρήσεις από την ίδια ερευνητική ομάδα, όπου οι γονότυποι -634GC και CC στο γενετικό υλικό του πλακούντα ήταν σημαντικά συχνότεροι στις γυναίκες με προεκλαμψία, σχετίστηκαν δε με 2,6 και 2 φορές υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψία αντίστοιχα, ενώ σχετίστηκαν και με τη δριμύτητα της προεκλαμψίας (61). Επίσης, σε συμφωνία με την παραπάνω μελέτη, ο πολυμορφισμός -1154G/A στον πλακούντα δε σχετίστηκε με την προεκλαμψία. Αντίθετα, αυτή η μελέτη ανέδειξε συσχέτιση ανάμεσα στον γονότυπο -2549D/D στον πλακούντα και τη σοβαρή προεκλαμψία, και πρότεινε πως η ταυτόχρονη παρουσία των πολυμορφισμών -2549 I/D, -1154 G/A, και 634 G/C (απλότυπος DGC) στον εμβρυικό ιστό αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας (61).

Επιπλέον, λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει τους πολυμορφισμούς του VEGF σε δείγματα αίματος από την ομφαλική φλέβα των εμβρύων. Οι Chendrauί και συνεργάτες είχαν μελετήσει 5 πολυμορφισμούς του VEGF, συγκεκριμένα τους -2578 A/C, -1498 C/T, -1154 A/G, -634 C/G, και +936 C/T, στην εμβρυική κυκλοφορία μετά από κύηση με ή χωρίς προεκλαμψία (73). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορά στη συχνότητα των πολυμορφισμών μεταξύ των περιστατικών με προεκλαμψία σε σχέση με αυτά χωρίς. Εντούτοις, η παρουσία των γονοτύπων -1154 AG και -2578 CC σχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα του VEGF στην ομφαλική φλέβα στα περιστατικά με προεκλαμψία, υποδεικνύοντας μία πιθανή γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση

προεκλαμψίας (73). Σε άλλη μελέτη σε πληθυσμό από την Τουρκία (77), ο πολυμορφισμός -634 C/G μελετήθηκε στα έμβρυα από πρόωρες κυήσεις, κυήσεις με προεκλαμψία και φυσιολογικές κυήσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν συσχέτιση ανάμεσα στον γονότυπο CC και την πρόωρη κύηση, με το αλληλίο C να αυξάνει την πιθανότητα προωρότητας κατά 2,8 φορές και να συστήνεται ως πιθανός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για πρόωρη κύηση. Οι φορείς του αλληλίου C θεωρήθηκε πως έχουν αυξημένη προδιάθεση για πρόωρη κύηση. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως η ίδια μελέτη δεν ανέδειξε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό -634 C/G στα έμβρυα και στην προεκλαμψία. Οι ερευνητές εικάζουν πως ενδεχομένως η παρουσία του πολυμορφισμού στο έμβρυο δεν αυξάνει την προδιάθεση της μητέρας για εμφάνιση προεκλαμψίας ή δεν συνδέεται με τη διαταραγμένη γονιδιακή ανταπόκριση της μητέρας στην προεκλαμψία (77).

Μία πρόσφατη μελέτη του 2020 από τους Chen και συνεργάτες διερεύνησε τον πολυμορφισμό -634C/C ταυτόχρονα στη μητέρα και το έμβρυο και τη σχέση του με την προεκλαμψία με τη χρήση υβριδικού μοντέλου σε Κινέζικο πληθυσμό (78). Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό, τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο, με τον κίνδυνο για προεκλαμψία. Η παρουσία του γονότυπου CC ή GC στο έμβρυο σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο της μητέρας για προεκλαμψία, σε σχέση με τον γονότυπο GG, αναδεικνύοντας πως η επίδραση του γονιδιώματος του εμβρύου στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας μπορεί να είναι σημαντική και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (78). Παλαιότερα, οι Procorciuc και συνεργάτες είχαν αναλύσει την παρουσία του πολυμορφισμού +936 C/T σε ζεύγη μητέρων και νεογνών με προεκλαμψία και φυσιολογική κύηση (79). Ο πολυμορφισμός σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για προεκλαμψία, οποιασδήποτε βαρύτητας. Οι μητέρες φορείς του γονότυπου TT είχαν 6 φορές υψηλότερο κίνδυνο για σοβαρή προεκλαμψία, και η παρουσία του αλληλίου T ταυτόχρονα στη μητέρα και στο νεογέννητο αύξησε τον κίνδυνο για ήπια και σοβαρή προεκλαμψία καθώς και για ισχαιμία του πλακούντα. Αντίθετα, η παρουσία του αλληλίου T, μόνο στη μητέρα ή μόνο στο νεογνό, δε σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο. Σύμφωνα με τους ερευνητές, φαίνεται πως υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στους γονότυπους της μητέρας και του κυήματος, η οποία επηρεάζει την ισορροπία των αγγειογενετικών παραγόντων και εμπλέκεται στην εμφάνιση προεκλαμψίας, καθώς και στην έκβαση της κύησης. Η

συνδυαστική έκφραση του πολυμορφισμού +936 C/T στην μητέρα και στο έμβρυο εκτιμήθηκε ως παράγοντας που καθορίζει τον κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας (79).

5(ΣΤ). Πολυμορφισμοί του VEGF στον ελληνικό πληθυσμό

Τα διαθέσιμα δεδομένα για τους πολυμορφισμούς του VEGF και την πιθανή συνεισφορά τους στον κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας στον Ελληνικό πληθυσμό είναι εξαιρετικά περιορισμένα, με μόνο μία δημοσιευμένη μελέτη. Η ομάδα των Παπάζογλου και συνεργάτες το 2004 μελέτησαν τους πολυμορφισμούς -2578 C/A, -634 G/C και +936 C/T σε 42 γυναίκες με προεκλαμψία και 73 υγιείς μάρτυρες (38). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συχνότητα των πολυμορφισμών του VEGF μεταξύ των γυναικών με ή χωρίς προεκλαμψία. Ωστόσο, σημαντική διαφορά καταγράφηκε για τον πολυμορφισμό +936 C/T όταν συγκρίθηκαν οι γυναίκες με σοβαρή προεκλαμψία με την ομάδα ελέγχου, με σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα του αλληλίου T. Λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενα ευρήματα πως τα άτομα με το αλληλίο T έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα VEGF στο πλάσμα, φαινόμενο που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας, οι ερευνητές πρότειναν πως η παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού πιθανώς να έχει σημαντική επίδραση στην κύηση και να σχετίζεται με την σοβαρή προεκλαμψία (53). Λαμβάνοντας υπόψη τον κρίσιμο ρόλο του VEGF στην εγκυμοσύνη, έχει προταθεί πως η μειωμένη ικανότητα του ιστού της μητέρας για προς τα άνω ρύθμιση του μονοπατιού του VEGF όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός +936 C/T πιθανώς να έχει σημαντική επίδραση στη διαδικασία της κύησης με αρνητικές συνέπειες όπως η εμφάνιση προεκλαμψίας (80).

5(Z). Επίπεδα έκφρασης του VEGF και του υποδοχέα VEGF-R στην Προεκλαμψία

Η αναγνώριση πως η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ των προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων αποτελεί έναν πιθανό υποκείμενο μηχανισμό στις διαταραχές της κύησης, όπως ο Σακχαρώδης διαβήτης κύησης και η Προεκλαμψία, έχει αποτελέσει έναυσμα για τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων επιπέδων του VEGF στον ορό γυναικών με διαταραχές της κύησης. Επιπλέον, ο VEGF έχει ενοχοποιηθεί για τη συμβολή του στις διαταραχές της κύησης και μέσω της πρόκλησης υποξίας στον πλακούντα (81). Παλαιότερα, οι Gu και συνεργάτες παρατήρησαν αυξημένη έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του VEGF σε σχέση με την υποξία σε καλλιέργεια τροφοβλαστών (82), ενώ στη συνέχεια η μελέτη των Zhou και συνεργάτες ανέδειξε τη συμμετοχή του VEGF και του υποδοχέα του στη διαφοροποίηση, στη διήθηση και στην επιβίωση των κυτταροτροφοβλαστών στη σοβαρή προεκλαμψία (25).

Τα ευρήματα αναφορικά με την έκφραση του VEGF στις διαταραχές της κύησης ποικίλουν, με κάποιες μελέτες να βρίσκουν αυξημένα ολικά επίπεδα του VEGF στην προεκλαμψία, τα οποία μπορεί να σχετίζονται και με τη βαρύτητα της προεκλαμψίας, ενώ άλλες, μειωμένα ή ίδια επίπεδα με τις υγιείς γυναίκες (83, 84, 32, 85, 24, 86). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε μειωμένα επίπεδα VEGF και αυξημένα επίπεδα sFlt-1, του ενδογενή ανταγωνιστή του VEGF, στον ορό γυναικών με προεκλαμψία σε σχέση με γυναίκες με υπέρταση κύησης, τα οποία σχετίστηκαν και με τη βαρύτητα της προεκλαμψίας (87). Παλιότερα, οι Levine και συνεργάτες είχαν επίσης αναφέρει αυξημένη έκφραση του sFlt-1 και παράλληλη μείωση της έκφρασης του ελεύθερου VEGF στην προεκλαμψία πριν την εμφάνιση μητρικών συμπτωμάτων (31). Χαμηλότερα επίπεδα του ελεύθερου VEGF στον ορό γυναικών με σοβαρή προεκλαμψία σε σχέση με γυναίκες με ήπια προεκλαμψία ή χωρίς υπέρταση επιβεβαιώθηκε και πιο πρόσφατα από τους Cheng και συνεργάτες (88). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τη θεωρία, πως η αυξημένη παραγωγή sFlt-1 στον πλακούντα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέσω του ανταγωνισμού με τον VEGF, η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στην εμφάνιση προεκλαμψίας. Έτσι, έχει προταθεί πως η μέτρηση της τοπικής έκφρασης του VEGF στο ενδομήτριο μπορεί να υπερτερεί της ποσοτικοποίησης των επιπέδων του VEGF στη συστηματική

κυκλοφορία, καθώς συνδέεται άμεσα με την αυξημένη παραγωγή sFlt-1 στον πλακούντα στις διαταραχές της κύησης (89). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα για την έκφραση του VEGF στη συστηματική κυκλοφορία επηρεάζονται σημαντικά από πλήθος μεθοδολογικών παραμέτρων, στις οποίες συγκαταλέγονται οι διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του VEGF που χρησιμοποιούνται στις μελέτες και οι οποίες ανιχνεύουν είτε τον ελεύθερο είτε τον συζευγμένο VEGF, συμβάλλοντας στην ετερογένεια των ευρημάτων μεταξύ των μελετών (90). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την έκφραση του υποδοχέα VEGF-R στις επιπλεγμένες κύσεις είναι ελάχιστα, και υποδεικνύουν πως η προεκλαμψία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα (26).

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση έγινε από τους Ahmad et al, οι οποίοι ανέφεραν αυξημένη παραγωγή VEGF στις λάχνες του πλακούντα γυναικών με προεκλαμψία σε σχέση με γυναίκες με φυσιολογική κύηση (33). Σε μία πρόσφατη μελέτη αξιολογήθηκε η mRNA και η πρωτεϊνική έκφραση του VEGF και του υποδοχέα VEGF-R1 τοπικά σε τέσσερις επιμέρους περιοχές (κεντρική μητρική, κεντρική εμβρυϊκή, περιφερική μητρική και περιφερική εμβρυϊκή) από τον πλακούντα 43 γυναικών με προεκλαμψία και 51 γυναικών με φυσιολογική κύηση (91). Η έκφραση του VEGF ήταν χαμηλότερη στις γυναίκες με προεκλαμψία, είτε είχαν πρόωρη κύηση είτε όχι, σε σχέση με τις υγιείς σε όλες τις περιοχές. Η πρωτεΐνη του VEGF είχε μέγιστη έκφραση στην κεντρική εμβρυϊκή περιοχή του πλακούντα και στις 2 ομάδες γυναικών, ενώ η mRNA έκφραση ήταν επίσης υψηλότερη στην ίδια περιοχή αλλά μόνο στις γυναίκες με προεκλαμψία. Όσον αφορά στον υποδοχέα VEGF-R1, υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης παρατηρήθηκαν στην κεντρική και περιφερική εμβρυϊκή περιοχή και υψηλότερα επίπεδα mRNA στην περιφερική μητρική περιοχή στις γυναίκες με προεκλαμψία. Η μελέτη αυτή ενισχύει τη θεωρία πως τοπικά στον πλακούντα συμβαίνουν αλλαγές στην έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων, πιθανώς ως απόκριση στην υποξία (91).

Η παρουσία πολυμορφισμών στο γονίδιο του VEGF σε ένα άτομο μπορεί να αποτελεί μία κληρονομική εγγενή αιτία για τη διαταραγμένη παραγωγή (υπερέκφραση ή υποέκφραση) του μορίου. Έτσι, το γενετικό υπόβαθρο της τροποποιημένης έκφρασης του VEGF συμβάλει επίσης στον διαφορετικό κίνδυνο για εμφάνιση διαταραχών της κύησης. Παρόλο που κάποιοι πολυμορφισμοί του VEGF είναι πιο

συχνοί σε γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη κύησης και προεκλαμψία, δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένο αν προκαλούν ή συνοδεύονται από τροποποιημένα επίπεδα έκφρασης του μορίου. Λίγες μελέτες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο του VEGF με τις τροποποιήσεις στα επίπεδα έκφρασής του. Πιο συγκεκριμένα, έχει καταγραφεί πως οι γυναίκες με τον πολυμορφισμό +936 C/T οι οποίες είναι φορείς του αλληλίου T εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα του VEGF σε σχέση με τις γυναίκες που φέρουν το αλληλίο C, συμβάλλοντας στον αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση προεκλαμψίας (53, 66). Σε λίγες μελέτες, ο γονότυπος GG του πολυμορφισμού -634 G/C έχει σχετιστεί με αυξημένη έκφραση του VEGF, ενώ αντίθετα ο γονότυπος CC του πολυμορφισμού -2578 C/A με μειωμένη έκφραση (59, 52). Οι Keshavarzi και συνεργάτες βρήκαν επίσης σημαντικά υψηλότερα mRNA επίπεδα του VEGF στον πλακούντα γυναικών με προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η mRNA έκφραση ήταν κατά 2,6 φορές υψηλότερη σε γυναίκες με προεκλαμψία που έφεραν τον γονότυπο CC του πολυμορφισμού -634 G/C, επιβεβαιώνοντας προηγούμενα ευρήματα πως η παρουσία του αλληλίου C μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας μέσω της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου (75sr).

5(H). Ρόλος της Ιντερλευκίνης - 6

Η φυσιολογική κύηση σχετίζεται με μια ελεγχόμενη φλεγμονώδη διαδικασία, η οποία επιδεινώνεται στην προεκλαμψία, ως απάντηση στην υπερβολική πλακουντιακή διέγερση (92).

Η ισορροπία μεταξύ των Th2 και Th1 κυτοκινών συσχετίζεται με το περιγεννητικό αποτέλεσμα. Η παραγωγή Th1 κυτοκινών αναστέλλεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης, ενώ η υπερβολική έκφρασή τους οδηγεί πιθανώς στην εμφάνιση προεκλαμψίας (93). Τα Th1 κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2 (IL-2), ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α), ενώ τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν τις ιντερλευκίνες -6, -10, και -4, καθώς και αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β (TGF-β) (94). Οι μεταβολές της συγκέντρωσης αρκετών κυτοκινών στο πλάσμα, όπως των TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 και IL-18, έχουν ενοχοποιηθεί για ελαττωματική πλακουντιακή διείσδυση και ενδοθηλιακή βλάβη στην προεκλαμψία (95). Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και η υπερπαραγωγή κυτοκινών από τον πλακούντα ως απάντηση στην τοπική ισχαιμία πιθανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αρτηριοπάθεια και στην ενδοθηλιακή βλάβη που σχετίζεται με την προεκλαμψία (99, 100, 101, 102).

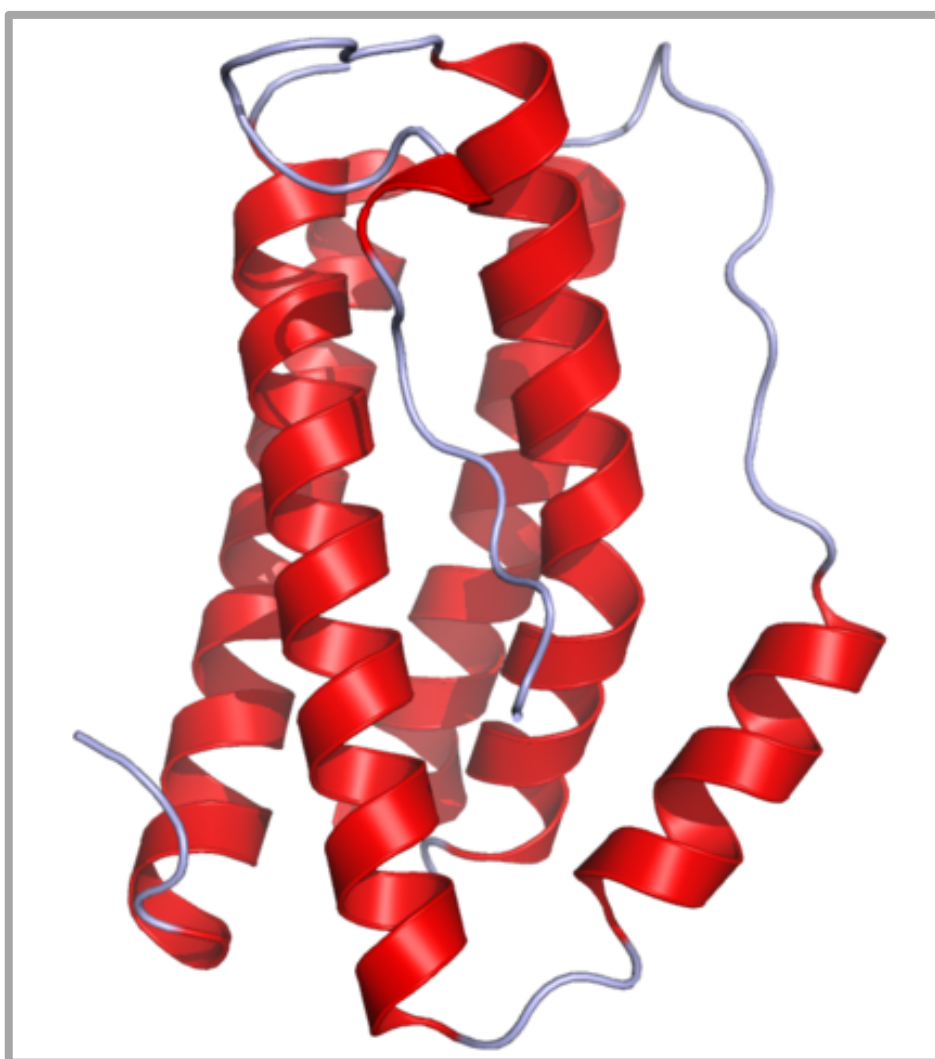
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυτοκίνες πιθανώς σχετίζονται με την παθογένεση της προεκλαμψίας. Υψηλά επίπεδα των ιντερλευκινών IL-1, IL-2 και IL-6, του TNF-α, όπως και της IFN-γ έχουν ανευρεθεί στο πλάσμα γυναικών που πάσχουν από προεκλαμψία. Αυτοί οι φλεγμονώδεις παράγοντες φαίνεται ότι έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην εξέλιξη της κύησης (96, 97, 98).

Η ιντερλευκίνη-6 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q21, και είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη και έχει περιγραφεί αρχικά ως παράγοντας διαφοροποίησης των B-κυττάρων, με πλειοτροπικές λειτουργίες σε ανοσολογικές απαντήσεις κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, φλεγμονωδών νόσων, αιμοποίησης και ογκογένεσης. Επιπλέον, διαθέτει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (105, 106, 107). Ο υποδοχέας της IL-6 (IL-6R) αποτελείται από δύο λειτουργικές αλυσίδες, την IL-6R alpha (IL-6Ra) και μια μη συνδεδετική δεσμευτική αλυσίδα (γλυκοπρωτεΐνη 130), οι οποίες διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση γονιδίων με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων (108, 109). Η IL-6

ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση, συγκεκριμένα τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων και την τελική διαφοροποίηση των Β-κυττάρων.

Η ιντερλευκίνη-6 είναι γνωστό ότι σχετίζεται με ανθεκτικές στην ινσουλίνη καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και της παχυσαρκίας (110, 111, 112). Αυξημένα επίπεδα IL-6 έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις προεκλαμψίας σε πρόσφατες μελέτες (103, 104).

Εικόνα 7



ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 6

(Εικόνα από Wikipedia)

5(Θ). Πολυμορφισμοί της IL-6 στην Προεκλαμψία

Η ιντερλευκίνη-6 έχει ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή της σε διάφορες δυσμενείς καταστάσεις κατά την κύηση, και πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αποσαφηνίσουν το ρόλο των κυκλοφορούντων επιπέδων της αλλά και την παρουσία πολυμορφισμών του γονιδίου στην προεκλαμψία. Ο πολυμορφισμός της IL-6 -174 G/C είναι αυτός που έχει μελετηθεί κυρίως, σε μία προσπάθεια να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τον πιθανό ρόλο του ως προδιαθεσικό παράγοντα ή παράγοντα αυξημένου κινδύνου για προεκλαμψία. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα διαθέσιμα ευρήματα είναι λίγα, καθιστώντας της εξαγωγή συμπερασμάτων μάλλον επισφαλή.

▪ Πολυμορφισμός -174 G/C

Ο πολυμορφισμός -174 G/C εντοπίζεται στον περιοχή του υποκινητή του γονιδίου στο χρωμόσωμα 7 και σχετίζεται με διατάραξη της παραγωγής της IL-6 (113, 114). Η αντικατάσταση της γουανίνης (G) από κυτοσίνη (C) στη συγκεκριμένη θέση επιφέρει μείωση της δραστηριότητας του υποκινητή. Σαν αποτέλεσμα, ο γονότυπος CC του πολυμορφισμού συνοδεύεται από χαμηλότερη παραγωγή IL-6, ενώ οι γονότυποι GG και GC δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη φυσιολογική παραγωγή της ιντερλευκίνης.

Μία από τις πρώτες μελέτες που διερεύνησε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού -174 G/C της ιντερλευκίνης-6 με την προεκλαμψία σε γυναίκες από τη Φιλανδία ήταν αυτή των Saarela και συνεργάτες το 2006 (115). Στη μελέτη συμμετείχαν 133 γυναίκες με προεκλαμψία και 115 υγιείς μάρτυρες. Η κατανομή των αλληλίων και των γονοτύπων του πολυμορφισμού ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες, με αποτέλεσμα την απουσία συσχέτισης. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο πολυμορφισμός δε φαίνεται να συνεισφέρει στην προδιάθεση για εμφάνιση προεκλαμψίας στον υπό μελέτη πληθυσμό (115). Αντίστοιχα ευρήματα παρατηρήθηκαν αργότερα στη μελέτη των Stonek και συνεργατών (116). Στη μελέτη συμμετείχαν 107 γυναίκες με προεκλαμψία και 107 μάρτυρες, όλες Καυκάσιες, από τις οποίες απομονώθηκε γενετικό υλικό από επιχρίσματα παρειάς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συχνότητα των αλληλίων ή των γονοτύπων μεταξύ των γυναικών με προεκλαμψία και των μαρτύρων, καταλήγοντας πως ο πολυμορφισμός δεν φαίνεται να σχετίζεται με την προεκλαμψία στον Καυκάσιο

πληθυσμό (116). Η μελέτη ήταν σε συμφωνία και επιβεβαίωσε προηγούμενα ευρήματα για απουσία συσχέτισης ανάμεσα στον πολυμορφισμό -174 G/C και την προεκλαμψία (117). Η ίδια ομάδα των Stonek και συνεργατών αξιολόγησε την παρουσία του πολυμορφισμού σε σχέση με διάφορες επιπλοκές της κύησης, και πιο συγκεκριμένα την προεκλαμψία, τη μικρή ηλικία κύησης, τον πρόωρο τοκετό και τον ενδομήτριο θάνατο (118). Αυτή η μεγάλη, προοπτική μελέτη κοόρτης σε 1626 Καυκάσιες έγκυες γυναίκες, έδειξε πως η παρουσία του πολυμορφισμού δεν αυξάνει τον κίνδυνο για καμία από τις προαναφερθείσες επιπλοκές της κύησης, και έτσι δεν αξιολογείται ως παράγοντας κινδύνου (118). Η απουσία συσχέτισης ανάμεσα στον πολυμορφισμό -174 G/C και της προεκλαμψίας αλλά και της εκλαμψίας παρατηρήθηκε και για γυναίκες από τη Βραζιλία, τόσο τις λευκές όσο και τις Mulatto (119, 120). Επιπλέον και μία μελέτη σε 101 γυναίκες με προεκλαμψία και 95 υγιείς από την Τουρκία απέτυχε να δείξει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την προεκλαμψία (121).

Μία μετα-ανάλυση του 2011 προσπάθησε να διερευνήσει το ρόλο των φλεγμονωδών παραγόντων TNF- α , IL-6 και IL-10, αξιολογώντας τόσο τα επίπεδα έκφρασής τους στον ορό, όσο και την παρουσία πολυμορφισμών σε γυναίκες με προεκλαμψία (122). Στην τελική ανάλυση για τον πολυμορφισμό -174 G/C της IL-6 συμπεριλήφθηκαν μόλις τέσσερις μελέτες με συνολικά δεδομένα από 396 γυναίκες με προεκλαμψία και 507 μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, δεν καταγράφηκε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και την προεκλαμψία, όπως ήταν αναμενόμενο εφόσον όλες οι έως τότε διαθέσιμες μελέτες είχαν αρνητικά ευρήματα. Ωστόσο, η ανάλυση έδειξε αυξημένα επίπεδα IL-6 σε γυναίκες με προεκλαμψία σε σχέση με τις υγιείς. Αξίζει να αναφερθεί πως τα έως τότε διαθέσιμα δεδομένα για την έκφραση της IL-6 ήταν αρκετά περισσότερα από τα αντίστοιχα για την παρουσία πολυμορφισμών (122).

Τα επόμενα χρόνια ακολουθήσαν και άλλες μελέτες για τον πολυμορφισμό -174 G/C της IL-6 και την προεκλαμψία σε διάφορους πληθυσμούς. Μία μελέτη από το Μεξικό σε 411 γυναίκες με προεκλαμψία και 613 μάρτυρες, επιβεβαίωσε τα ευρήματα των παλαιότερων μελετών για απουσία συσχέτισης του πολυμορφισμού με την προεκλαμψία (123). Αρνητικά ήταν τα ευρήματα και από μία μεγάλη μελέτη με

ανάλυση 40 γονιδίων, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλήφθηκε και η ιντερλευκίνη-6, και 55 νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε λευκούς Αμερικανούς και Αφρο-Αμερικανούς με προεκλαμψία και μικρή ηλικία κύησης (124). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, και η μελέτη των Pinheiro και συνεργάτες δε διαπίστωσε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό -174 G/C και τη σοβαρή προεκλαμψία σε γυναίκες από τη Βραζιλία, παρά μόνο μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του αλληλίου C με τα επίπεδα έκφρασης της IL-6 σε γυναίκες χωρίς υπέρταση κύησης (125). Περισσότερα δεδομένα που υποστηρίζουν την έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στην ιντερλευκίνη-6 και την προεκλαμψία προέκυψαν και στον Κινέζικο πληθυσμό, όπου 3 πολυμορφισμοί του γονιδίου (-174 G/C, -572 G/C και -597 G/A) δε φάνηκε να συμβάλλουν στην προδιάθεση και τον κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας (126). Σε συμφωνία, και η μελέτη των Wu και συνεργατών, επίσης, στους Κινέζους δεν έδειξε συσχέτιση των πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης-6 με την προεκλαμψία (127). Ωστόσο, διαπιστώθηκε πως πολυμορφισμοί στον υποδοχέα IL-6R, σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς στα γονίδια IL-1R1, TNFS11 και IL-5RA, σχετίζονται με την παθογένεση της προεκλαμψίας, και με αυξημένο κίνδυνο ανάλογα με επιμέρους υποτύπους της νόσου (127).

Η πρώτη ένδειξη για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού -174 G/C της IL-6 με την προεκλαμψία ήρθε από τη μελέτη των Sowmya και συνεργατών σε 140 γυναίκες με πρόωρη προεκλαμψία και 135 μάρτυρες στην Ινδία (128). Η μελέτη έδειξε ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού με την προεκλαμψία, και πρότειναν πως μπορεί να αποτελεί σημαντικό γενετικό ρυθμιστή στην αιτιολογία της πρόωρης προεκλαμψίας σε αυτόν τον πληθυσμό (128). Πιο πρόσφατα, οι Pachero-Romero και συνεργάτες από το Περού κατέγραψαν σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλίων και των γονοτύπων του πολυμορφισμού -174 G/C μεταξύ γυναικών με προεκλαμψία και των μαρτύρων. Οι φορείς του γονότυπου GG και το αλληλίο G φάνηκε να σχετίζονται με τον κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας (72).

Οι Konwar και συνεργάτες μελέτησαν 16 διαφορετικούς πολυμορφισμούς σε 12 γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονή του πλακούντα σε δείγματα από 269 πλακούντες, σε 72 περιστατικά με οξεία χοριοαμνιονίτιδα και 197 χωρίς (129). Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλίων

του πολυμορφισμού -174 G/C της IL-6, οι φορείς του γονότυπου CC φάνηκε να είναι σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Επιπρόσθετα, ένας άλλος κοντινός πολυμορφισμός του γονιδίου, και πιο συγκεκριμένα ο rs1800796, βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο, πιθανώς λόγω της τροποποίησης στη μεθυλίωση του DNA. Οι φορείς του γονότυπου CC του πολυμορφισμού είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τους φορείς του γονότυπου GG, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της IL-6 στον πλακούντα. Οι ερευνητές πρότειναν πως οι πολυμορφισμοί της IL-6 μπορεί να επηρεάζουν την προδιάθεση για εμφάνιση χοριοαμνιονίτιδας στον πληθυσμό της ανατολικής Ασίας (129).

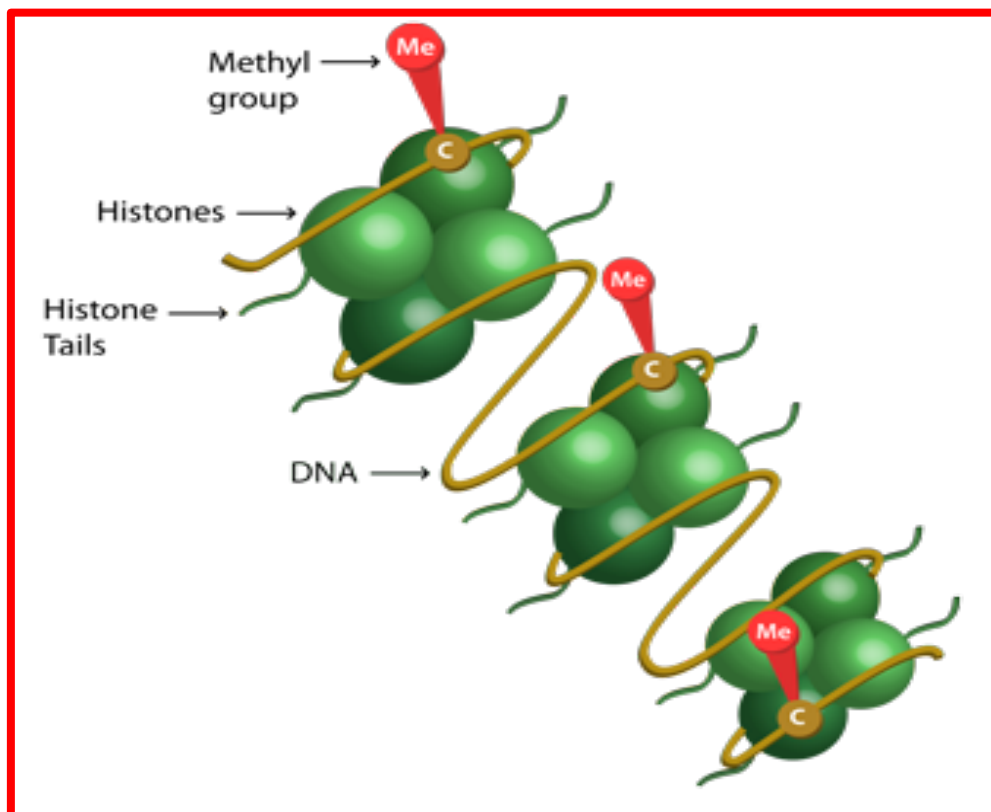
Σε μία προσπάθεια για συνολική αξιολόγηση του ρόλου του πολυμορφισμού της ιντερλευκίνης-6 -174 G/C ως προδιαθεσικό παράγοντα για εμφάνιση προεκλαμψίας, οι Veisian και συνεργάτες συγκέντρωσαν τα διαθέσιμα δεδομένα από 12 μελέτες σε 1.821 περιστατικά με προεκλαμψία και 3.339 μάρτυρες σε μία μετα-ανάλυση (130). Στο σύνολο του πληθυσμού, δεν καταγράφηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον κίνδυνο για εκδήλωση προεκλαμψίας. Εντούτοις, είναι άξιο αναφοράς πως οι μελέτες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, τόσο όσον αφορά στους πληθυσμούς όσο και στη μεθοδολογία, παράγοντες που συμβάλλουν στην ετερογένεια. Περαιτέρω ανάλυση με βάση την εθνοτική καταγωγή έδειξε πως ο εν λόγω πολυμορφισμός σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση προεκλαμψίας στους Ασιάτες, σε αντίθεση με τους Καυκάσιους και τους μικτούς πληθυσμούς. Αυτή η παρατήρηση ενδεχομένως να αντικατοπτρίζει διαφορές στο γενετικό προφίλ των πληθυσμών ή την επίδραση των τοπικών περιβαλλοντικών παραγόντων (130).

6. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

6(A). Επιγενετική ανάλυση της κύησης

Ο τομέας της επιγενετικής αναφέρεται στην ανάλυση των κληρονομικών μεταβολών που είναι δυνατόν να συμβούν στη χρωματίνη και το DNA, και δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του DNA (131). Μεγάλοι τομείς της επιγενετικής περιλαμβάνουν τη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA, των μεταβολών στις ιστόνες και τη γονιδιωματική αποτύπωση. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μεγάλη επέκταση της έρευνας στον τομέα της επιγενετικής και της εμβρυϊκής και μητρικής βιολογίας (132-134). Δεδομένου ενός σταθερού γονοτύπου, η επιγενετική μπορεί να προσδώσει ένα βαθμό φαινοτυπικής πλαστικότητας λόγω του στρες, της θρέψης ή άλλων περιβαλλοντικών επιδράσεων, επιτρέποντας στο έμβρυο να ανταποκριθεί στο περιβάλλον και να μεταβάλει τη γονιδιακή του έκφραση αναλόγως. Επιπρόσθετα, οι επιγενετικές μεταβολές, εάν συμβούν στους γαμέτες, μπορεί να είναι κληρονομήσιμοι και να έχουν φαινοτυπικές επιπτώσεις στην επόμενη γενιά (135).

Εικόνα 8



(www.epigentek.com)

Μια αναδυόμενη έννοια υποδηλώνει πως η επιγενετική απορρύθμιση προ της σύλληψης ή κατά τη διάρκεια της κύησης πιθανώς να αυξάνει την ευαισθησία ή την προδιάθεση για εμφάνιση προεκλαμψίας (136). Σε ό,τι αφορά την κύηση, υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν το ρόλο της επιγενετικής όχι μόνο στη μορφολογία του πλακούντα αλλά και στην ανάπτυξη και λειτουργία του (137). Η κατάλληλη επιγενετική ρύθμιση των αποτυπωμένων και των μη-αποτυπωμένων γονιδίων είναι πρωταρχικής σημασίας για τον αναπτυσσόμενο πλακούντα. Περιβαλλοντικοί παράγοντες (π.χ. αιθανόλη, tension oxygen και τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής), μπορεί να διαταράξουν την επιγενετική του πλακούντα και κατ' επέκταση τη φυσιολογία του με πιθανές επιπτώσεις την εμφάνιση μητρικής θνητότητας, την υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη και τις επιπλοκές στην κύηση (138, 139).

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και της διαφοροποίησης των ιστών περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τις μεταβολές των ιστονών και τη βιογένεση και δράση των μη κωδικοποιησιμων (non coding) RNAs (ncRNAs) (140, 141). Τα ncRNA ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και την προσβασιμότητα των παραγόντων μεταγραφής και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο DNA. Επιπλέον, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που είναι απαραίτητοι για την κυτταρική διαφοροποίηση και συνεπώς την ανάπτυξη, συνοψίζονται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί (142).

Πίνακας 2: Επιγενετικοί μηχανισμοί στην ανάπτυξη του πλακούντα

Επιγενετικός μηχανισμός	Στόχος	Είδος κυττάρου	Βιολογική συνάφεια
H3K9/27me3	MMP-2, MMP-9	Ανθρώπινος πλακούντας	Συσχέτιση με την κινητικότητα και διείσδυση της τροφοβλάστης
H3K4 ακετυλίωση+ H3K9 μεθυλίωση	Maspin	Ανθρώπινος πλακούντας	Αρνητική συσχέτιση με την ανθρώπινη τροφοβλάστη (κινητικότητα και διείσδυση)

Ακετυλιωμένο H3	Ειδικές της κύησης γλυκοπρωτεΐνες	JEG-3	Αναστολή των HDACs σε κύτταρα JEG-3 Ανοδική ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης PSG και mRNA
HDAC3	GCMa	Cell Line	Θέση δέσμευσης GCMa (pGBS) στον προαγωγέα συγκυτίνης και αναστολή της έκφρασής του
Ακετυλίωση του H2A και H2B		TSCs από ποντίκια	Μειώνει την EMT και τη διείσδυση των TSC διατηρώντας το φαινότυπο του στελέχους τους
H3K4Me2; H4K20me3	Ευρύ γονιδίωμα	SCTs	Το H3K4Me2 εντοπίζεται μαζί με το ενεργό RNAP II στην πλειοψηφία των πυρήνων STB
H3K27me3	Ευρύ γονιδίωμα	vCT	H3K27me3 σε μεγάλο βαθμού εκπροσώπηση στα vCT
lncRNA TUG1	RND3	HTR-8/SVneo, JEG-3	Το TUG1 αποσιωπά επιγενετικά τη μεταγραφή RND3 αλληλεπιδρώντας με την EZH2 που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και διείσδυση στις τροφοβλάστες
lncRNA RPAIN	C1q	HTR8/SVneo	Αναστολή του πολλαπλασιασμού και της διείσδυσης. Αναστέλλει την έκφραση C1q
lncRNA MALAT1		JEG-3	Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διείσδυση και την απόπτωση

lncRNA MEG3		HTR8/SVneo and JEG-3	Ρυθμίζει τη μετανάστευση και την απόπτωση
lncRNA MIR503HG lncRNA LINC00629		JEG-3	Ρυθμίζει τη μετανάστευση και τη διείσδυση
lncRNA SPRY4-IT1	HuR	HTR8/SVneo	Ρυθμίζει τη μετανάστευση και την απόπτωση/παρεμβαίνει στη σηματοδότηση της β-κατενίνης Wnt
lncRNA H19	Συνδέει μικρά RNAs και πρωτεΐνες	vCT, JAR	Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση
miR-141-3p and miR-200a-3p	Τρανσθυρετίνη (TTR)	Συγκυτιτοποιημένο BeWo	Αναστέλλει την έκφραση TTR με άμεση δέσμευση στο 3'UTR του TTR. Ρυθμίζει την πρόσληψη θυροξίνης από το SCT
miR-34	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1), SERPINA3	JAR	Ρυθμίζει τη διείσδυση
miR-155 miR-17_92, miR-106a_363	Cyclin D1	HTR-8/SVneo	Εξασθενεί τον πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης
miR-106b_25	GCM1		Εξασθενεί τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης
miR-675	NOMO1, Igf1R	JEG3 cells	Περιορίζει τον πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης
Σύμπλεγμα C19MC miR		HTR8/SVneo	Διαταραχή μετανάστευσης

Μεθυλίωση του σώματος του γονιδίου	DAXX	Ανθρώπινος πλακούντας	Απώλεια μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της συγκυτιοποίησης του νCT σε SCT και τη διαφοροποίηση των EVTs σε διεισδυτικές EVT
Μεθυλίωση του προαγωγέα του γονιδίου	APC	Ανθρώπινος πλακούντας και κύτταρα χοριοκαρκινώματος	Διείσδυση τροφοβλάστης
Υπομεθυλωμένος προαγωγέας	MASPIN	Ανθρώπινος πλακούντας	Αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή των EVTs
Υπερμεθυλωμένος προαγωγέας	RASSF1A	Ανθρώπινος πλακούντας; JAR; JEG3	Πιθανός ρόλος στην ανάπτυξη της κυτταροτροφοβλάστης μέσω των επιπτώσεών του στα γονίδια ID2 που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση
Ευρεία μεθυλίωση του γονιδίου	PMDs (μερικώς μεθυλωμένες περιοχές)	Ανθρώπινος πλακούντας: χοριακές λάχνες	Επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση και φλεγμονή
Ευρεία μεθυλίωση του γονιδίου	Ευρύ γονιδίωμα	Ανθρώπινα SCTs σε σύγκριση με τα νCTs	Υπομεθυλωμένα SCTs σε σύγκριση με τα νCTs
Ευρεία μεθυλίωση του γονιδίου	Ευρύ γονιδίωμα	BeWo και BeWo + Forskolin	Κατάσταση μεθυλίωσης DNA πολλών γονιδίων που ρυθμίστηκαν στο επίπεδο έκφρασης και μεταβλήθηκαν από σύντηξη που προκλήθηκε από φορσκολίνη
Μεθυλίωση	HOX γονίδια: TLX1, HOXA10, DLX5	Ανθρώπινος πλακούντας	Η αυξημένη μεθυλίωση κατά τη διάρκεια της κύησης συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση. Συμμετοχή στη διαφορετική έκφραση των SCTs

Ευρεία μεθυλίωση του γονιδίου	Ευρύ γονιδίωμα	Υποπληθυσμός τροφοβλάστης, vCTs και EVTs	Κάθε κυτταρικός πληθυσμός έχει ένα ξεχωριστό μεθύλωμα
Μεθυλίωση	Cdx2; Eomes; Plet1; Tcfap2c	Βλαστοκύτταρα τροφοβλάστης ποντικών (TSCs)	Η μεθυλίωση ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην εγκατάσταση των TSC
Μεθυλίωση	Ευρύ γονιδίωμα	Βλαστοκύστη	Υπομεθυλίωση του τροφεκτοδερμίου σε σύγκριση με την εσωτερική κυτταρική μάζα

Οι ανωμαλίες στη μεθυλίωση του DNA στην προεκλαμψία έχουν αναλυθεί σε ποικιλία δειγμάτων. Εκτός από τα κύτταρα του πλακούντα, οι ερευνητές έχουν αναλύσει κυκλοφορούντα κύτταρα μητρικού αίματος ή κύτταρα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cell-free DNA), καθώς και μητρικά ενδοθηλιακά κύτταρα (πολύ λιγότερο προσβάσιμα, ωστόσο) και λευκά αιμοσφαίρια αίματος ομφάλιου λώρου (εμβρυϊκής προέλευσης). Όπως καταγράφεται στον Πίνακα 3 (142), ένα μεγάλο πλήθος γονιδίων με διαταραγμένη μεθυλίωση (υπομεθυλίωση ή υπερμεθυλίωση) έχει συσχετιστεί με την προεκλαμψία σε διαθέσιμες μελέτες.

Πίνακας 3: Διαφορετικά μεθυλιωμένα γονίδια στην προεκλαμψία

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΓΟΝΙΔΙΟ	STATUS ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΣΤΟΧΟΣ
Πλακούντας και μητρικό πλάσμα	<i>SERPINB5</i>	Υπομεθυλίωση	Διείσδυση τροφοβλάστης
Μητρικά λευκά αιμοσφαίρια α' τριμήνου και δείγματα πλακούντα	<i>ABCA1</i>	Υπομεθυλίωση	Μεταφορέας χοληστερόλης σε μακροφάγα

Μητρικά λευκά αιμοσφαίρια α' τριμήνου, δείγματα πλακούντα, αίμα ομφαλίου λώρου	<i>GNAS</i>	Υπομεθυλίωση	Διαβήτης, υπέρταση και μεταβολικές παθήσεις
Μητρικά λευκά αιμοσφαίρια α' τριμήνου και δείγματα πλακούντα	<i>TAPBP</i>	Υπομεθυλίωση	Προσθήκη πεπτιδίων στο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
Μητρικά λευκά αιμοσφαίρια α' τριμήνου και δείγματα πλακούντα	<i>DYNLL1</i>	Υπομεθυλίωση	Μεταβολική επεξεργασία φωσφορικών
Μητρικά λευκά αιμοσφαίρια α' τριμήνου και δείγματα πλακούντα	<i>ORPD1</i>	Υπομεθυλίωση	Υποδοχέας οπιοειδών
Πλακούντας	<i>TIMP3</i>	Υπομεθυλίωση	Αναστολέας μεταλλοπρωτεάσης
Πλακούντας	<i>P2RX4</i>	Υπομεθυλίωση	Απόπτωση και φλεγμονή
Πλακούντας	<i>PAPPA2</i>	Υπομεθυλίωση	Ρυθμιστής ινσουλινομόρφου αυξητικού παράγοντα
Πλακούντας	<i>DLX5</i>	Υπομεθυλίωση	Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση τροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>KRT15</i>	Υπομεθυλίωση	κυτοσκελετός
Πλακούντας	<i>SERPINA3</i>	Υπομεθυλίωση	Αναστολή φλεγμονής, αποικοδόμηση παθογόνων και αναδιαμόρφωση ιστών
Πλακούντας	<i>FN1</i>	Υπομεθυλίωση	Κυτταρική προσκόλληση, πολλαπλασιασμός τροφοβλάστης, διαφοροποίηση και απόπτωση

Πλακούντας	<i>TEAD3</i>	Υπομεθυλίωση	Ομοιόσταση κυττάρων, φλεγμονή, πήξη, ενεργοποίηση συμπληρώματος
Πλακούντας	<i>JUNB</i>	Υπομεθυλίωση	Μονοπάτι σηματοδότησης TNF
Πλακούντας	<i>PKM2</i>	Υπομεθυλίωση	Κυτταρικός μεταβολισμός
Πλακούντας	<i>NDRG1</i>	Υπομεθυλίωση	Διείσδυση τροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>BHLHE40</i>	Υπομεθυλίωση	Αναστολή διαφοροποίησης τροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>INHBA</i>	Υπομεθυλίωση	Αναστολή διαφοροποίησης τροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>CYP11A1</i>	Υπομεθυλίωση	Αυτοφαγία τροφοβλάστης και μονοπάτι στεροειδογένεσης
Πλακούντας	<i>HSD3B1</i>	Υπομεθυλίωση	Μονοπάτι στεροειδογένεσης
Πλακούντας	<i>TEAD3</i>	Υπομεθυλίωση	Μονοπάτι στεροειδογένεσης
Πλακούντας	<i>CYP19</i>	Υπομεθυλίωση	Μονοπάτι στεροειδογένεσης
Πλακούντας	<i>CRH</i>	Υπομεθυλίωση	Βιοδιαθεσιμότητα κορτιζόλης στον πλακούντα
Πλακούντας	<i>TFPI-2</i>	Υπομεθυλίωση	Αποκλεισμός της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας
Πλακούντας	<i>VEGF</i>	Υπομεθυλίωση	Αγγειογένεση
Αίμα ομφαλίου λώρου, πλακούντας	<i>IGF2</i>	Υπομεθυλίωση	Εμβρυονική ανάπτυξη και ανάπτυξη εμβρύου
Πλακούντας και μητρικό περιφερικό αίμα	<i>GNA12</i>	Υπομεθυλίωση	Αρτηριακή πίεση

Πλακούντας	<i>CAPG</i>	Υπομεθυλίωση	Λειτουργία μακροφάγων
Πλακούντας	<i>GLI2</i>	Υπομεθυλίωση	Εμβρυϊκή ανάπτυξη
Πλακούντας	<i>KRT13</i>	Υπομεθυλίωση	Κυτοσκελετός
Πλακούντας	<i>LEP</i>	Υπομεθυλίωση	Ομοιόσταση και μεταβολισμός των κυττάρων
Πλακούντας	<i>LP1</i>	Υπομεθυλίωση	Μεταβολισμός λιπιδίων
Πλακούντας	<i>CEBPα</i>	Υπομεθυλίωση	Διέγερση μεταγραφής του προαγωγέα LEP
Πλακούντας	<i>SH3PXD2A</i>	Υπομεθυλίωση	Διείσδυση τροφοβλάστης και σχηματισμός ποδοσωμάτων
Πλακούντας	<i>NCAM1</i>	Υπομεθυλίωση	Αλληλεπίδραση και προσκόλληση τροφοβλάστης
Δείγμα ομφαλίου λώρου	<i>HSD11B2</i>	Υπομεθυλίωση	Μετάδοση κορτιζόλης από τη μητέρα στο έμβρυο
Πλακούντας	<i>WNT2</i>	υπερμεθυλίωση	Πλακουντοποίηση και κυτταρική σηματοδότηση
Πλακούντας	<i>SPESP1</i>	υπερμεθυλίωση	Γονιμοποίηση
Πλακούντας	<i>NOX5</i>	υπερμεθυλίωση	Ενεργοποίηση οξυγόνου-Σηματοδότηση ειδών

Πλακούντας	<i>ALCAM</i>	υπερμεθυλίωση	Κυτταρική προσκόλληση
Πλακούντας	<i>IGF-1</i>	υπερμεθυλίωση	Πλακουντοποίηση, λειτουργία τροφοβλάστης, ανάπτυξη εμβρύου
Πλακούντας	<i>SOX7</i>	υπερμεθυλίωση	Εμβρυϊκή ανάπτυξη και κυτταρική μοίρα
Πλακούντας	<i>CDX1</i>	υπερμεθυλίωση	Περιορισμός διείσδυσης τροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>CXCL1</i>	υπερμεθυλίωση	Χημειοκίνη ως επαγωγέας αγγειογένεσης
Πλακούντας	<i>ADORA2B</i>	υπερμεθυλίωση	Διαταραχή του πλακούντα και περιορισμός της ανάπτυξης του εμβρύου
Πλακούντας	<i>FAM3B</i>	υπερμεθυλίωση	Δραστηριότητα κυτοκινών
Πλακούντας	<i>SYNE1</i>	υπερμεθυλίωση	Πυρηνική οργάνωση και δομική ακεραιότητα
Πλακούντας	<i>AGAP1</i>	υπερμεθυλίωση	Κυτταρική ανάπτυξη, συνάθροιση και λειτουργία
Πλακούντας	<i>CRHBP</i>	υπερμεθυλίωση	Βιοδιαθεσιμότητα κορτιζόλης στον πλακούντα
Πλακούντας και μητρικό αίμα	<i>STAT5A</i>	υπερμεθυλίωση	Ενεργοποίηση μεταγραφής

Πλακούντας και μητρικό αίμα	<i>RASSF1A</i>	υπερμεθυλίωση	Ογκοκατασταλτικό γονίδιο
Πλακούντας	<i>PTPRN2</i>	υπερμεθυλίωση	Μεταβολική επεξεργασία φωσφορικών
Πλακούντας	<i>GATA4</i>	υπερμεθυλίωση	Ανάπτυξη πλακούντα
Πλακούντας	<i>TNF</i>	υπερμεθυλίωση	Διέγερση MMP-9, ενεργοποίηση ανοσοποιητικού συστήματος, επιβίωση κυττάρων, μετανάστευση και διαφοροποίηση
Πλακούντας	<i>COL5A1</i>	υπερμεθυλίωση	Εξωκυττάριο στρώμα
Πλακούντας	<i>CDH11</i>	υπερμεθυλίωση	Εγκατάσταση τροφοβλάστης στον πλακούντα, διαφοροποίηση συγκυτιοτροφοβλάστης
Πλακούντας	<i>HLA-G</i>	υπερμεθυλίωση	Μητρική ανοσολογική ανοχή και ανοσοαπόρριψη

6(B). Επιγενετικές τροποποιήσεις στο μητρικό περιφερικό αίμα στην Προεκλαμψία

Μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης πολλών γονιδίων έχουν συσχετιστεί με την προεκλαμψία. Το 2013, ο White και οι συνεργάτες έδειξαν ότι η προεκλαμψία ευνοούσε την υπερμεθυλίωση στα λευκά αιμοσφαίρια του μητρικού αίματος χρησιμοποιώντας τις συστοιχίες μεθυλίωσης-27k της Illumina (143). Σε άλλη μελέτη, τα γονίδια GRIN2b, GABRA1, PCDHB7 and BEX1 βρέθηκαν διαφορετικά μεθυλιωμένα, με εμπλουτισμό της οδού σηματοδότησης των νευροπεπτιδίων. Εκ νέου ανάλυση της μεθυλίωσης επιλεγμένων γονιδίων που έχουν ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκονται στην προεκλαμψία, αποκάλυψε ότι στα μητρικά κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα, το CpG 4 γονιδίων, των POMC, AGT, CALCA και DDAH1, είχε διαφορετική μεθυλίωση στην προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτά τα 4 γονίδια είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν την ανοσοτροποποίηση και τη φλεγμονώδη απόκριση, υποδηλώνοντας ότι τουλάχιστον οι αλλαγές στη φυσιολογία του πλακούντα στην προεκλαμψία έχουν επιγονιδωματικές συνέπειες στα μητρικά κυκλοφορούντα κύτταρα (144).

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το 3 έως 6% του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα μητρικού αίματος προέρχεται από τον πλακούντα. Το οξειδωτικό στρες στην προεκλαμψία οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση της τροφοβλάστης, απελευθέρωση των μικροσωματιδίων SCT, και πενταπλάσια έως δεκαπλάσια αύξηση του κυκλοφορούντος εμβρυϊκού DNA στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (145, 31). Το status μεθυλίωσης των ελεύθερων εμβρυϊκών μορίων έχει προταθεί ως μη επεμβατικός βιοδείκτης για την παθολογία του εμβρύου και του πλακούντα πριν από την έναρξη κλινικών συμπτωμάτων. Αυτό έχει αποδειχθεί για το Maspin, για το οποίο η μη μεθυλιωμένη έκδοση εμφανίζει διάμεση μεθυλίωση περισσότερο από 5,7 φορές υψηλότερη σε κυήσεις με προεκλαμψία σε σχέση με τις κυήσεις της ομάδας ελέγχου (146, 147). Ένας άλλος επιγενετικός δείκτης προεκλαμψίας που έχει αναφερθεί είναι η μεθυλίωση του RASSF1A (τομέας Ras Association που περιέχει την πρωτεΐνη 1) (148, 149).

Δεδομένου των πολλών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει η μεθυλίωση, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι ερευνητές έχουν συνδέσει τα σφάλματα στη μεθυλίωση με μια ποικιλία σημαντικών συνεπειών, όπως η εμφάνιση ασθενειών. Όσον αφορά την προεκλαμψία και το σακχαρώδη διαβήτη κύησης, οι Ching και συνεργάτες (150) ανέφεραν ότι τα πρότυπα υπερμεθυλίωσης σε όλο το γονιδίωμα

στους προαγωγείς είναι κοινά στις χοριοαμνιακές μεμβράνες σε κύσεις με πρώιμης έναρξης προεκλαμψία. Οι Lash και συνεργάτες (151) πραγματοποίησαν προφίλ μεθυλιώματος στο DNA από το μητρικό περιφερικό αίμα και από τον πλακούντα, αποκαλύπτοντας πιθανούς δείκτες. Οι Liu και συνεργάτες (152) πρότειναν ότι τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA στους ανθρώπινους πλακούντες σχετίζονται σημαντικά με την προεκλαμψία και το σακχαρώδη διαβήτη κύησης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. ΥΠΟΘΕΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ

Στο πλάσμα διαβητικών ασθενών ανευρίσκονται σε αυξημένη συγκέντρωση οξειδωτικά σώματα, φλεγμονώδεις παράγοντες, καθώς και αγγειακοί αυξητικοί παράγοντες, που εντάσσονται και αυτοί στο καθεστώς φλεγμονώδους απάντησης που επικρατεί στο Σακχαρώδη Διαβήτη. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με αντικείμενο το Διαβήτη της Κύησης, που ομοιάζει παθοφυσιολογικά με το Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, έχουν αποδείξει πως επικρατεί ένα κυρίως ενδοθηλιακό προφλεγμονώδες περιβάλλον, που εκδηλώνεται με σημαντική αύξηση των ενδοθηλιακών φλεγμονωδών δεικτών, ενώ ανευρίσκεται ανισορροπία μεταξύ αγγειοποιητικών και αντι-αγγειοποιητικών παραγόντων.

Εφ' όσον η Προεκλαμψία και ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ιδιαίτερα ο προϋπάρχων της κύησης) αποτελούν παθολογικές καταστάσεις που μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, όπως μικροαγγειοπάθεια & ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, διατυπώνουμε την υπόθεση ότι για την ανάπτυξη επιπλοκών στη Διαβητική κύηση, ιδιαίτερα με τη μορφή της Προεκλαμψίας, επιδρούν μικτού τύπου μεταβολές, με τη μορφή γενετικών και επιγενετικών διαφοροποιήσεων.

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η ανάδειξη του πιθανού ρόλου των επιγενετικών και γενετικών τροποποιήσεων ως προδιαθεσικών παραγόντων για την εμφάνιση επιπλοκών της κύησης και της συμβολής τους στην αποσαφήνιση των υποκείμενων μηχανισμών των ανωτέρω επιπλοκών.

Συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά τους επιγενετικούς μηχανισμούς, σκοπός αυτής της διατριβής αποτελεί η ανάδειξη της μεταβολής της κατάστασης μεθυλίωσης του DNA στον προαγωγέα των γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή, ως αιτιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση προεκλαμψίας σε έγκυες γυναίκες. Σε ό,τι αφορά τους γενετικούς μηχανισμούς, η διατριβή αυτή στοχεύει στην ποσοτική αξιολόγηση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF και του αντίστοιχου υποδοχέα VEGF-R και στην ανάλυση του πολυμορφισμού του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 στις επιλεγμένες κύσεις σε σύγκριση με τις υγιείς μάρτυρες.

8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στη μελέτη συμμετείχαν γυναίκες, που παρακολουθήθηκαν στη Γ΄ Μαιευτική Κλινική στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών» και στη Μαιευτική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Πύργου και είχαν δώσει εγγράφως τη συγκατάθεσή τους για συμμετοχή στη μελέτη.

Οι ομάδες των εθελοντών και τα κριτήρια για τη δημιουργία των ομάδων παρατίθενται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Ομάδες ασθενών

Ομάδα Α	Γυναίκες χωρίς Διαβήτη Κύησης, με φυσιολογικό δείκτη σωματικής μάζας (BMI)
Ομάδα Β	Γυναίκες χωρίς Διαβήτη Κύησης, με υψηλό δείκτη σωματικής μάζας (BMI)
Ομάδα Γ	Γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη της Εγκυμοσύνης υπό δίαιτα
Ομάδα Δ	Γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη της Εγκυμοσύνης υπό ινσουλίνη
Ομάδα Ε	Γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, που είχε διαγνωστεί πριν την εγκυμοσύνη
Ομάδα ΣΤ	Γυναίκες με Προεκλαμψία (διαβητικές και μη διαβητικές)

○ **ΥΛΙΚΟ**

Έχουν συμπεριληφθεί **36** εθελόντριες, που ανήκουν στις εξής κατηγορίες:

 **Ομάδα Α:**

5 Μητέρες με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (BMI), χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη, που δε παρουσίασαν κάποια επιπλοκή στην εγκυμοσύνη τους.

 **Ομάδα Β:**

5 Μητέρες με αυξημένο BMI, χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη, που δε παρουσίασαν κάποια επιπλοκή στην εγκυμοσύνη τους.

 **Ομάδα Γ:**

5 Μητέρες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, ο οποίος ελέγχθηκε με δίαιτα.

 **Ομάδα Δ:**

6 Μητέρες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, ο οποίος ελέγχθηκε με ινσουλίνη.

 **Ομάδα Ε:**

7 Μητέρες με προϋπάρχοντα Διαβήτη Κύησης (**ΣΔ 2**), για τον οποίο ακολούθησαν αγωγή με ινσουλίνη ή αντιδιαβητικά δισκία.

 **Ομάδα ΣΤ:**

8 Μητέρες που εμφάνισαν Προεκλαμψία στη διάρκεια της κύησης, αρκετές εκ των οποίων είχαν ως υπόβαθρο είτε υπέρταση είτε Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ή και τα δύο.

○ **ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις, οι οποίες περιέλαβαν το βάρος πριν την εγκυμοσύνη, το ύψος, το δείκτη σωματικής μάζας (BMI) και την ηλικία της ασθενούς. Ελήφθη πλήρες μαιευτικό - γυναικολογικό και ιατρικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό. Επίσης, καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία και οι συνήθειες των γυναικών, όπως το κάπνισμα, η διάρκεια της κύησης σε εβδομάδες, το αποκτηθέν βάρος κατά την εγκυμοσύνη και τα στοιχεία του τοκετού και του νεογνού. Πραγματοποιήθηκαν οι κάτωθι εργαστηριακές μετρήσεις:

1. Γενική αίματος

2. Βιοχημικός έλεγχος: HOMA τεστ, γλυκόζη, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, νάτριο, κάλιο, Mg, P, Ca, SGOT, SGPT, γ- GT, ALP, χολερυθρίνη ολική, χολερυθρίνη άμεση, ολικά λευκώματα, αλβουμίνη, LDH, CPK, CK-MB, χοληστερόλη, HDL, LDL, τριγλυκερίδια, Fe ορού, φερριτίνη, Lp(a) και ApoB
3. Δείκτες οξειδωτικού φορτίου: H₂O₂, 8-isoPGF₂a (ούρων)
4. Δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας: TAC, δισμουτάση, γλουταθειόνη πλάσματος
5. Δείκτες βλάβης του DNA: 8-OHdG ούρων
6. Δείκτες φλεγμονής στο πλάσμα: TNFa, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IFN-γ, CRP, adiponectin
7. Δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στο πλάσμα: VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, Vwf, PAH-1, FIB.
8. Εξετάσεις ούρων

Πριν την έναρξη της ενεργής φάσης του τοκετού, και αφού ελήφθη ενυπόγραφα σε όλες η συγκατάθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στη μητέρα για τη μέτρηση των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων και συλλογή ούρων (με καθητηριασμό). Κατά τη διάρκεια του τοκετού ελήφθησαν τεμάχια πλακούντα και τεμάχια μυϊκού ιστού των ασθενών για τη γενετικό σκέλος της μελέτης. Ο μυϊκός ιστός είχε προέλευση τους ορθούς κοιλιακούς μύες σε περίπτωση καισαρικής τομής και τους μύες του περινέου σε περίπτωση φυσιολογικού τοκετού. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε και όλα τα βιολογικά υλικά φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη μέχρι χρησιμοποίησής τους.

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την επιγενετική μελέτη προήλθε από δείγματα DNA ολικού αίματος από 18 έγκυες γυναίκες (6 με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, οι οποίες δεν έλαβαν αποτελεσματική θεραπεία και τον αντιμετώπιζαν μόνο με δίαιτα, 6 ασθενείς που εμφάνισαν Προεκλαμψία και 6 υγιείς μάρτυρες), όλες με παρόμοιο BMI (προ της εγκυμοσύνης) και ηλικία. Οι ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης υποβλήθηκαν σε δίαιτα για την επίτευξη γλυκαιμικού ελέγχου με βάση τις κλινικές οδηγίες. Γυναίκες άνω των 40 ετών αποκλείστηκαν από τη μελέτη, καθώς και όσες είχαν θετικό ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ ή/και ναρκωτικών κατά την τρέχουσα

εγκυμοσύνη. Τέλος, αποκλείστηκαν έγκυες γυναίκες που έπασχαν από κακοήθειες, λοιμώδεις ή χρόνιες παθήσεις, για να μην δημιουργηθούν πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες. Οι υγιείς μάρτυρες επιλέχθηκαν μεταξύ εθελοντών εγκύων γυναικών χωρίς ιστορικό αυτοανοσίας, κακοήθειας, υπέρτασης ή οικογενειακού ιστορικού για Σακχαρώδη Διαβήτη και Προεκλαμψία. Μετρήθηκαν ανθρωπομετρικές μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του βάρους πριν την εγκυμοσύνη, του βάρους που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια της κύησης και του ύψους. Καταγράφηκε το μαιευτικό, γυναικολογικό και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό των γυναικών. Οι απαραίτητες εργαστηριακές εξετάσεις σχετικά με τον διαβήτη και την προεκλαμψία έγιναν λίγο πριν τον τοκετό, ενώ πραγματοποιήθηκε αιμοληψία 40ml κατά τον τοκετό. Ο δείκτης HOMA υπολογίστηκε ως η γλυκόζη πολλαπλασιασμένη με την ινσουλίνη διαιρεμένη με το 405. Το υλικό μεταφέρθηκε με υγρό άζωτο, στη συνέχεια υποβλήθηκε αμέσως σε φυγοκέντρηση και ο ορός και το πλάσμα αποθηκεύτηκαν άσηπτα σε βαθιά κατάψυξη μέχρι την επεξεργασία. Για την επιγενετική μελέτη, παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν μόνο τον ορό της μητέρας.

○ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σε ό,τι αφορά τη γενετική ανάλυση, Οι ποσοτικές μεταβλητές ελέγχθηκαν για την κανονικότητα της κατανομής τους με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Οι μεταβλητές με κανονική κατανομή εκφράζονται ως μέσες τιμές (mean) και τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD), ενώ εκείνες που ακολουθούν κανονική κατανομή εκφράζονται ως διάμεσες τιμές (median) και ενδοτεταρτημοριακά εύρη (interquartile range). Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Η σύγκριση αναλογιών διενεργήθηκε με το Fisher's exact test όπου ήταν κατάλληλο. Για τη σύγκριση των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ περισσότερων από δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο παραμετρικός έλεγχος ανάλυσης διασποράς (ANOVA) ή ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis. Ο έλεγχος της σχέσης μεταξύ ζευγών ποσοτικών μεταβλητών αξιολογήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης του Spearman (ρ). Τα επίπεδα σημαντικότητας ήταν αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα

τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.

Σε ό,τι αφορά την επιγενετική μελέτη, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 20.0 (SPSS Inc, Chicago) για Windows. Η μεθυλίωση θεωρήθηκε ότι ήταν υπερμεθυλιωμένη εάν ήταν >20% σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση Kruskal–Wallis χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει την ύπαρξη οποιασδήποτε πιθανής στατιστικής σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ομάδων. Οι διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μη παραμετρική δοκιμή Mann-Whitney.

○ **ΣΥΜΜΟΡΦΩΣΗ ΜΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ**

Η μελέτη εγκρίθηκε από τη θεσμική επιτροπή δεοντολογίας και όλες οι συμμετέχουσες υπέγραψαν ενημερωμένη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Όλες οι διαδικασίες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις ηθικές αρχές της Διακήρυξης του Παγκόσμιας Ιατρικής Ένωσης του Ελσίνκι.

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

A. Μετά από τη συλλογή και τη φύλαξη των δειγμάτων σε βαθιά κατάψυξη, παρέμειναν σε κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος για τους μετέπειτα πειραματικούς χειρισμούς.

Τα στάδια της πειραματικής ανάλυσης και οι αρχές της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκαν για την επιγενετική μελέτη περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

ο **Ανάλυση μεθυλίωσης PCR**

DNA από δείγματα αίματος απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ Nucleospin Tissue (Macherey-Nigel GmbH & Co, Düren, Γερμανία). Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ περιορισμού DNA EpiTect Methyl II που παρέχεται από την Qiagen (Chatsworth, CA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα DNA που είχαν υποστεί πέψη αναλύθηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τα προφίλ ανθρώπινης φλεγμονώδους αντίδρασης και αυτοανοσίας EpiTect Methyl II Signature PCR Array (Qiagen, Chatsworth, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το Human Inflammatory Response & Autoimmunity EpiTect Methyl II Signature PCR Array καταγράφει την κατάσταση μεθυλίωσης του προαγωγέα ενός πάνελ 22 γονιδίων [χημειοκίνες: CCL25, CXCL14, CXCL3, CXCL5, CXCL6, κυτοκίνες: IL12A, IL117C Receptor Associe, IL12C, πρωτεΐνες: IL10RA, IL13RA1, IL15, IL17RA, IL4R, IL6R, IL6ST, άλλα γονίδια φλεγμονώδους απόκρισης και αυτοανοσίας: ATF2, FADD, GATA3, IL13, IL7, TYK2]. Η ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανίχνευσης ακολουθίας ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το EpiTect Methyl II PCR Array System. Το ελάχιστο επίπεδο υπερμεθυλίωσης που θεωρείται θετικό ορίζεται στο 20%. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

- **Επικύρωση του ευρήματος μικροσυστοιχίας με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)**

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA επιλεγμένων μεθυλιωμένων γονιδίων αναλύθηκαν με qRT-PCR χρησιμοποιώντας το Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. Το RNA εξήχθη από πλήρες αίμα χρησιμοποιώντας Trizol και το RNA μετατράπηκε σε cDNA χρησιμοποιώντας κιτ αντίστροφης μεταγραφής υψηλής χωρητικότητας (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν και τα γονίδια ενδιαφέροντος συγκρίθηκαν με το GAPDH ως ενδογενή αναφορά. Η σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $\Delta\Delta CT$. Η ανάλυση των δεδομένων σχετικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο και τη μέθοδο 2 ($-\Delta\Delta C(T)$).

B. Τα στάδια της πειραματικής ανάλυσης και οι αρχές της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκαν για τη γενετική μελέτη περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

- **Απομόνωση του DNA**

Η μελέτη του DNA μας πληροφορεί για τα κληρονομούμενα χαρακτηριστικά περιέχοντας τον κώδικα που καθορίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών και μπορεί να απομονωθεί εύκολα από οποιοδήποτε εμπύρνηνο κύτταρο αποτελώντας άριστη πρώτη ύλη για πειράματα μοριακής βιολογίας ή για μετέπειτα αναλυτικές διαδικασίες και προ-παρασκευαστικούς σκοπούς. Οι συσσωρευμένες γενετικές πληροφορίες του παρουσιάζουν μια εξαιρετική σταθερότητα στο χρόνο, ως αποτέλεσμα δομικής αλληλοσυμπλήρωσης, αυτόματης επιδιόρθωσης και ενζυμικής αντιγραφής των νουκλεοτιδικών αλυσίδων του, ενώ συγχρόνως μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε συνθήκες απλής κατάψυξης. Για την απομόνωση λοιπόν του γενετικού υλικού χρησιμοποιούνται ευρέως διάφορα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων (κιτ) ανάλογα με το είδος του γενετικού υλικού (DNA, RNA), με την πηγή απομόνωσης (όπως αίμα κι άλλα βιολογικά υγρά, τρόφιμα, φυτά ή κύτταρα από καλλιέργειες) και την ποσότητα που πρόκειται να απομονωθεί.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου συνίστανται στην ευκολία και ταχύτητα χειρισμού και στη διαθεσιμότητα των αναλυτικών οδηγιών εκτέλεσης της διαδικασίας, στον ταυτόχρονο χειρισμό πολλών δειγμάτων, στην επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και στην υψηλή ποιότητα ανακτημένου γενετικού υλικού μαζί με μείωση του κινδύνου διασταυρούμενης μόλυνσης.

Η αρχή της μεθόδου απομόνωσης DNA στηρίζεται στη χρησιμοποίηση ειδικών στηλών SiO_2 , η οποία δεσμεύει εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα ενώ συγχρόνως είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να δράσουν σαν αναστολείς της DNA πολυμεράσης κατά την αντίδραση της PCR. Η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος προκαλώντας έτσι την έκλυση του DNA από τη μεμβράνη. Το εμπορικό Kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το **Nucleospin® Tissue GenomicDNA (Macherey-Nagel)**.

Στάδια πειραματικής πορείας :

- Συλλογή και προετοιμασία των εξεταζόμενων δειγμάτων, κατά την οποία τα δείγματα από τις συνθήκες κατάψυξης όπου διατηρούνται πρέπει να εισέλθουν στις συνθήκες περιβάλλοντος.
- Κατά το πρώτο στάδιο της απομόνωσης DNA, απαιτείται προσθήκη με χρήση πιπέτας αυτορυθμιζόμενου όγκου 180μL LysisBufferT1 και 25μL ProteinaseK, για να επιτευχθεί διάσπαση των πρωτεϊνών του μίγματος. Ακολουθεί έντονη ανάδευση των δειγμάτων για 2-3min στο vortex, τοποθέτησή τους στη θερμική πλάκα επώασης του εργαστηρίου και παραμονή για 1-3h στους 56°C.
- Στο επόμενο στάδιο λύσης της κυτταρικής μεμβράνης, προστίθενται 200μL LysisBuffer B3 στο κάθε δείγμα ξεχωριστά κι ακολουθεί επώασή τους στο θερμομπλόκ για περίπου 10min στους 70°C.
- Ακολουθεί προσθήκη 210μL αιθανόλης 96-100% κι ήπια ανάδευση για την πραγματοποίηση και παρατήρηση της κατακρήμνισης του DNA
- Στο βήμα δέσμευσης του DNA, χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες και σωλήνες συλλογής Nucleospin® TissueColumnsandTubes, έγινε ποσοτική μεταφορά του κάθε δείγματος με μια πιπέτα από το erpendorf tube στη στήλη χωρητικότητας 700μL και φυγοκέντριση για 1min στις 11000 xg (στροφές)
- Απόγχυση του περιεχομένου του σωλήνα.

- Για το πλύσιμο της στήλης πυριτίου και τον καθαρισμό του εξεταζόμενου δείγματος DNA, ακολουθεί η πρώτη πλύση με προσθήκη με μια πιπέτα 500μL WashBufferBW, το οποίο περιέχει 36-50% υδροχλωρική γουανιδίνη, στη στήλη Nucleospin® TissueColumn, φυγοκέντριση για 1min στις 11000 xg (στροφές), απόρριψη του σωλήνα κι επανατοποθέτησή του στη στήλη
- Κατά τη δεύτερη πλύση, προστίθενται στο κέντρο της στήλης του κάθε δείγματος 500μL WashBufferB5, το οποίο περιέχει 36-50% υδροχλωρική γουανιδίνη και 20-50% 2-προπανόλη, φυγοκεντρώνται για 1min στις 11000 xg (στροφές) κι αποχύνεται το κάτω υγρό του σωλήνα με τοποθέτησή του ξανά στη στήλη
- Για να επιτευχθεί το πλήρες στέγνωμα της στήλης, χρειάζεται μια ακόμη φυγοκέντριση για 2-3min στις 11000 xg (στροφές) και κατόπιν αλλαγή του tube συλλογής που βρίσκεται κάτω από τη στήλη Nucleospin® TissueColumn
- Όσον αφορά την ανάκτηση του καθαρού DNA, απαιτείται η προσθήκη συνολικά 100μL ElutionBufferBE, η ηρεμία κάθε δείγματος για 1min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κι ύστερα η φυγοκέντρωση για 1min στις 14000 xg (στροφές). Για παραλαβή μεγαλύτερης συγκέντρωσης ανακτημένου DNA, αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται 2 φορές με ισόποση κάθε φορά διαίρεση και χρησιμοποίηση του διαλύματος έκλουσης όσο το δυνατόν στο κέντρο της στήλης
- Μεταφορά σε ένα καινούριο eppendorf tube των 100μL DNA που έχουν απομονωθεί κι αποθήκευσή τους σε ψυγείο κατάψυξης -4°C.

○ Φωτομέτρηση του DNA/RNA

Η καθαρότητα του DNA/RNA μετρείται με την ακτινοβολία στο υπεριώδες μήκος κύματος (U.V) με απορρόφηση στα 280nm που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της πρωτεΐνης που εκχυλίζεται μαζί με το DNA/RNA και με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260nm που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του στο διάλυμα, δεδομένου ότι μια μονάδα οπτικής πυκνότητας 1 O.D αντιστοιχεί σε 50μg/ml δίκλωνου μορίου DNA ή σε 40μg/ml μονόκλωνου μορίου RNA. Η αναλογία εκφράζεται ως λόγος A_{260}/A_{280} κι εκτιμά την καθαρότητα του DNA/RNA που απομονώθηκε, δηλαδή αν υπάρχει πρόσμιξη με RNA (στην περίπτωση αξιολόγησης του DNA) ή με πρωτεΐνες ή με άλλες ουσίες.

Η καλύτερη μέθοδος εκτίμησης της ποιότητας του DNA/RNA και της συγκέντρωσης αυτών των ενισχυμένων βιομορίων θεωρείται η αξιολόγηση της έκτασης της κατανομής τους σε πύκνωμα αγαρόζης και το μέγιστο διάλυμα αυτών που μπορεί να ενισχυθεί με την PCR.

○ **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την εξέταση των δειγμάτων μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Verity 96 wells της εταιρείας Applied Biosystems International.

Εξοπλισμός:

1. Θερμοκυκλοποιητής
2. Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου Gilson και τα αντίστοιχα tips
3. Ειδικά eppendorf tubes των 0,2mL για τη συσκευή της PCR

Αντιδραστήρια:

1. Master Mix (Hot Start Promega)
2. Distilled water/DNase/RNase Free

Εκκινητές IL-6 forward -5'- TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT -3' και reverse -5'-

3. CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3' 100μM
4. Δείγματα απομονωμένου DNA

Τα απαραίτητα στοιχεία του μίγματος αντιδραστηρίων για την επίτευξη της αντίδρασης της PCR μπορούν να περιγραφούν ως:

- I. **To DNA - στόχος (target DNA)**, που λειτουργεί ως εκμαγείο για την *in vitro* μεγέθυνση της επιθυμητής αλληλουχίας βάσεων και προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα εφαρμογής και σε μη καθαρό δείγμα, σε ελάχιστη ποσότητα DNA αλλά και σε διασπασμένο DNA, αρκεί η αλληλουχία-στόχος να είναι ακέραια ώστε να εξασφαλιστεί η αντιγραφή της στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης.
- II. **Εκκινητές (primers)**, που αποτελούν ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους συνήθως 18 ως 30 βάσεων που παρασκευάζονται τεχνητά με διάφορες μεθόδους. Κάθε εκκινητής χρησιμοποιείται για την επιλογή του τμήματος του DNA-στόχου που θα πολλαπλασιαστεί μεταξύ των αφετηριών που αποτελούν

και τα άκρα του, διαθέτοντας αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των δυο αντιπαράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Επιπλέον, η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m), η οποία καθορίζεται από την ποσοστιαία σύσταση σε ζεύγη βάσεων κυρίως GC αλλά και AT, του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με την T_m του δεύτερου ενώ συγχρόνως οι αλληλουχίες των εκκινητών δεν πρέπει να υβριδίζονται μεταξύ τους και η απόστασή τους να είναι τέτοια ώστε να επιτρέπεται η σύνθεση του νέου DNA.

Η ειδικότητα της αντίδρασης PCR οφείλεται στην ακρίβεια της σύνδεσης των αφετηριών ολιγονουκλεοτιδίων στις πλευρικές αλυσίδες εκατέρωθεν του DNA-στόχου και στην κατάλληλη αναλογία συγκεντρώσεων εκκινητών/ DNA-στόχου. Όταν έχουμε μικρή συγκέντρωση εκκινητών, τότε μόρια DNA μένουν με ακάλυπτες θέσεις υβριδισμού ή σε περίπτωση περίσσειας εκκινητών παρατηρείται πρόσδεση σε μη ειδικές θέσεις. Συμπερασματικά, οι εκκινητές αντιπροσωπεύουν τις περιοχές έναρξης της σύνθεσης πολλαπλών αντιγράφων DNA, καθορίζοντας τα άκρα του τμήματος των αντιγράφων.

III. **DNA πολυμεράση**, η οποία ως μορφή θερμοανθεκτικού ενζύμου της πολυμεράσης του θερμόφιλου βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (TaqPolymerase) με ιδανική θερμοκρασία δράσης στους 72°C, έδωσε μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR επεκτείνοντας προϋπάρχοντα τμήματα DNA και συνθέτοντας περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Για την καταλυτική δράση του ενζύμου αυτού κατά τη διαδικασία *in vitro* -αντιγραφής του DNA, απαιτείται η παρουσία 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων και η μετέπειτα προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των αφετηριών με συνολικό προσανατολισμό 5'→3' με αποτέλεσμα την επιμήκυνσή τους και τελικώς τη σύνθεση δυο νέων αλυσίδων DNA συμπληρωματικών προς τις πρότυπες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η συγκεκριμένη Taqπολυμεράση δεν αδρανοποιείται στις επαναλαμβανόμενες υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA και πως ο απαραίτητος χρόνος αντιγραφής του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

IV. **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουλεοτίδια (dNTPs)** που λειτουργούν ως δομικό υπόστρωμα της αντίδρασης και οι συγκεντρώσεις τους σχετίζονται άμεσα με τη

συγκέντρωση των Mg^{+2} , εμφανίζοντας εύρος τιμών 20-200 Mm. Πρέπει ακόμη να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στον καθορισμό της συγκέντρωσης των dNTPs καθώς αυξημένες συγκεντρώσεις τους δίνουν χαμηλή ειδικότητα της αντίδρασης, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις αποδίδουν προϊόντα μειούμενης απόδοσης. Επίσης θεωρείται σημαντική η ισορροπία στην ποσοστιαία αναλογία των τεσσάρων 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) στο μίγμα, αφού πλεόνασμα του ενός οδηγεί σε σημαντικό ποσοστό σφαλμάτων κατά τη διαδικασία αντιγραφής.

- V. **Ρυθμιστικό διάλυμα (Solutionbuffer)** συγκεκριμένου pH, το οποίο χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της δραστηριότητας και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης, υποβοηθώντας έτσι την πολλαπλή αντιγραφή. Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει NaCl και KCl που διευκολύνουν την ένωση των εκκινητών στο DNA-στόχο κι ενισχύουν την ενζυμική δραστηριότητα, Tris-HCl σε συγκέντρωση 10-50mM με pH 8,3 στους 20°C, σταθεροποιητές ενζύμων όπως τα ελεύθερα ιόντα Mg^{+2} , μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20 και TritonX-100) καθώς και ζελατίνη ή ορολευκωματίνη (Bovine Serum Albumin-BSA) ως απαραίτητα στοιχεία ενζυμικής λειτουργικότητας και ενίσχυσης της αντίδρασης. Σημαντική επίσης θεωρείται η σταθεροποίηση της συγκέντρωσης των δυο αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος μέχρι τα 50mM, αφού εάν η συγκέντρωσή τους υπερβεί αυτή την οριακή τιμή τότε αναστέλλεται η δράση της Ταqπολυμεράσης ενώ σε συγκέντρωση του KCl κάτω από την τιμή αυτή αυξάνεται η ενζυμική δραστηριότητα κατά 50%-60% επί των αντιδράσεων απουσίας KCl.

Όλα τα αντιδραστήρια που προαναφέρθηκαν βρίσκονται στο μίγμα της PCR σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο κάθε φορά. Αδιαμφισβήτητα, το μαγνήσιο αποτελεί απαραίτητο συνένζυμο για τη θερμοανθεκτική πολυμεράση κι η συγκέντρωσή του καθίσταται κρίσιμος παράγοντας ενίσχυσης της αντίδρασης. Συνεπώς, τα κατιόντα μαγνησίου επηρεάζουν τον υβριδισμό των εκκινητών, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων της PCR και την αποτελεσματικότητα της πολυμεράσης. Για το λόγο αυτό, σε υψηλές συγκεντρώσεις

Mg⁺², το οποίο σταθεροποιεί το δίκλωνο μόριο DNA με αποτέλεσμα την ύπαρξη τυχαίων προσκολλήσεων των εκκινητών, προκύπτουν μη ειδικά προϊόντα ενώ αντιθέτως οι χαμηλές συγκεντρώσεις ελαττώνουν την απόδοση της αντίδρασης. Επομένως, η βέλτιστη συγκέντρωση μαγνησίου θα πρέπει να προσδιορίζεται για κάθε νέα εφαρμογή της μεθόδου ξεχωριστά (159).

Πίνακας 6: Συντελεστές αντιδραστηρίων του mix στη μέθοδο της Real-time PCR

<u>Παρασκευή του mix της PCR</u>	
Αντιδραστήρια	Συντελεστές
Mix	x 25
Εκκινητής P1	x 1
Εκκινητής P2	x 1
H ₂ O	X13
Σύνολο αντιδραστηρίων	40

Πίνακας 7: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ρύθμισης του θερμοκυκλοποιητή της PCR

HoldingStage	95°C για 10min διάρκειας ενός κύκλου
Στάδιο Αποδιάταξης (DenaturationStage)	94°C για 50sec διάρκειας 40 κύκλων

Στάδιο Υβριδοποίησης των Εκκινητών (PrimerAnnealingStage)	55°C για 30sec διάρκειας 40 κύκλων
Στάδιο Επιμήκυνσης (ExtensionStage)	72°C για 50sec διάρκειας 40 κύκλων
Στάδιο Επιμήκυνσης (ExtensionStage)	72°C για 10min διάρκειας ενός κύκλου

Το προϊόν της PCR έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό 198bp.

- **Ηλεκτροφόρηση**

Για να γίνουν ορατά τα προϊόντα της αντίδρασης και να επιβεβαιωθεί η ειδικότητά τους, δηλαδή να διαπιστωθεί αν περιέχονται σε αυτά οι αναμενόμενες αλληλουχίες βάσεων του DNA-προτύπου χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) αποτελεί την ηλεκτροχημική μέθοδο διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως, σε γέλη αгарόζης ή σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Τα κατιόντα κινούνται προς την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο εντός ηλεκτρικού πεδίου και τα ανιόντα προς τη θετικά φορτισμένη. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί τη βάση μιας ιδιαίτερα χρήσιμης αναλυτικής μεθοδολογίας για τον καθορισμό, το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεο-πρωτεϊνικών συμπλόκων και χρησιμοποιείται ευρέως κατά την τεχνολογία ανασυνδυασμού του DNA (160).

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αгарόζης, η οποία λόγω της ευχρηστίας και της αποτελεσματικότητά της στο διαχωρισμό βιομορίων μεγέθους από 500bp (basepairs: μονάδα μέτρησης των ζευγών βάσεων) έως 25kb χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μοριακή έρευνα.

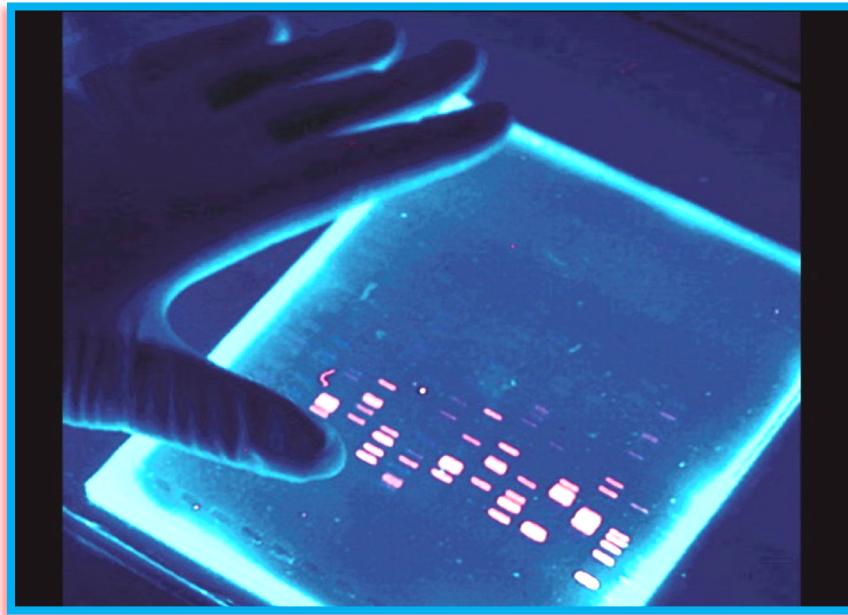
Η αγαρόζη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που προέρχεται από φύκη (*redalgae*) και διαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας σχηματίζοντας κατά την ψύξη του ένα στερεό πορώδες υπόστρωμα που καλείται ως πηκτή, πήκτωμα ή γέλη. Επιπροσθέτως, μείζων παράγοντας για την επίτευξη της ηλεκτροφόρησης αποτελεί η χρήση βρωμιούχου εθιδίου (ethidiumbromideEtBr) το οποίο αποτελεί μια φθορίζουσα χρωστική ουσία που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων μέσω σχηματισμού δεσμών VanDerWaals κι επιτρέπει την ανίχνευση των θραυσμάτων του DNA στη γέληαγαρόζης υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός σε 302-366 nm.

Αποτέλεσμα αυτών των συνθηκών αποτελεί η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων σωματιδίων του DNA με κατεύθυνση από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο και διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το φορτίο και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι λοιπόν τα μικρότερα μόρια εντοπίζονται προς το κάτω μέρος του πηκτώματος αφού συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του κι άρα κινούνται ταχύτερα, τα μεγαλύτερα μόρια εμφανίζονται στο επάνω μέρος της πηκτής εξαιτίας της βραδύτερης κίνησής τους και όσα τμήματα διαθέτουν το ίδιο μέγεθος δημιουργούν μια ενιαία ζώνη.

Για την οπτικοποίηση των DNA τμημάτων στην πηκτή αγαρόζης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, απαιτείται τοποθέτησή της σε λάμπα υπεριώδους φωτός στα 320nm, με αποτέλεσμα την ταχύτατη διάχυση του νουκλεϊκού οξέος και για αυτό παρατηρείται ο σχηματισμός ζωνών DNA (bands).

Η παρουσία ζώνης συγκεκριμένου μεγέθους (bp) σημειώνεται ως θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή ότι η επιθυμητή αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί αποτελεσματικά μέσω της αντίδρασης της PCR, ενώ η απουσία ζώνης θεωρείται ως αρνητικό αποτέλεσμα.

Εικόνα 9: Η επίδραση του υπεριώδους φωτός στη γέλη αγαρόζης και η εμφάνιση των DNA ζωνών (bp)

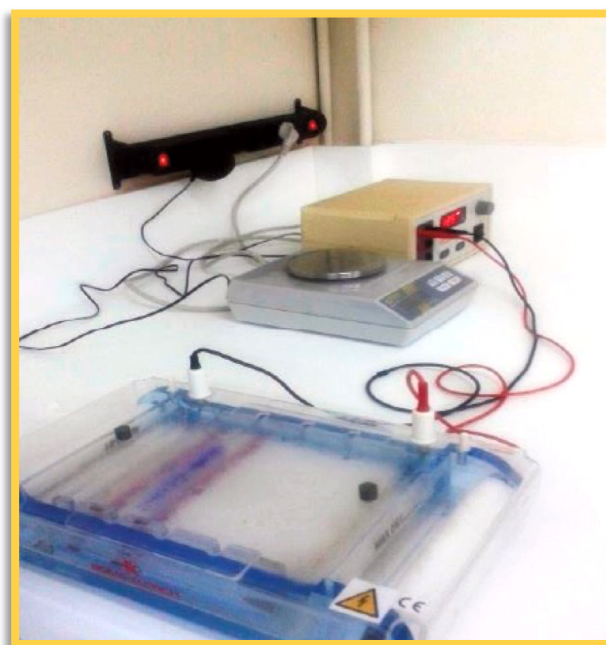


Εικόνα 10: Λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας



Εικόνα 11: Συσκευή ηλεκτροφόρησης, αναλυτικός ζυγός και τροφοδοτικό παροχής ηλεκτρικής τάσης (αριστερά)

Εικόνα 12: Φούρνος μικροκυμάτων και το εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης για την τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης μαζί με το χτενάκι σχηματισμού θέσεων των δειγμάτων (δεξιά)



- **Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση πολυμορφισμού μέσα σε πληθυσμούς του ίδιου είδους, όσο και για τη διάκριση διαφορετικών ειδών.

Πολυμορφισμός παρατηρείται σε τμήματα DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού. RFLP είναι μια συντομογραφία του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο των μικρών αλλά συγκεκριμένων παραλλαγών σε μια ακολουθία δίκλωνου DNA. Βασίζεται στην εξειδίκευση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, οι οποίες αναγνωρίζουν ένα σύνολο νουκλεοτιδίων που ονομάζεται θέση περιορισμού και

«κόβουν» το DNA σε αυτές τις θέσεις. Γενικά, όσο πιο μικρή είναι η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, τόσο περισσότερα είναι τα κομμάτια DNA που προκύπτουν μετά από την πέψη. Αν δύο μόρια DNA διαφέρουν στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, τότε κομμάτια διαφορετικού μεγέθους θα προκύψουν μετά από την πέψη. Τα τμήματα DNA μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης. Η RFLP χρησιμοποιείται ευρέως σε διαφοροποίηση και την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος καθώς και στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας σε τράπεζες γενετικού υλικού. Γενικά πρόκειται για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο με υψηλή επαναληψιμότητα.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. SfaNI restriction enzyme (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) στους 37° C για 1h. (5μL SfaNI, 5μL buffer 32 μLH₂O και 8μLπροϊόν PCR.) Το ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα την κοπή του αμπλικονίου των 198bp σε (G/G) ομοζυγωτία (140/58 bp), (G/C) ετεροζυγωτία (198/140/58 bp) και (C/C) ομοζυγωτία (198 bp).

Για επιβεβαίωση:

2. NlaIII at restriction enzyme (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) στους 37° C για 15min. (1μL NlaIII , 5μL buffer 36 μLH₂O και 8μLπροϊόν PCR.) Το ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα την κοπή του αμπλικονίου των 198bp σε Fragments size of 122, 45 and 31 bp indicated the presence of a wild-type homozygous CC genotype, two 167 bp and 31 bp fragments displayed the presence of homozygous GG genotype and four fragments of 167, 122, 45 and 31 bp indicated the presence of heterozygous CG genotype.

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

10(A). Περιγραφή του δείγματος. Τα δημογραφικά στοιχεία, το ιατρικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, οι εργαστηριακές εξετάσεις των ασθενών και τα στοιχεία του τοκετού.

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 36 γυναίκες με μέση ηλικία τα 32,4 ($\pm 4,6$ έτη). Οι συμμετέχουσες διαχωρίστηκαν σε 4 ομάδες ανάλογα με την κατάσταση της υγείας τους κατά την κύηση. Οι 8 γυναίκες (22,2%) εμφάνισαν Προεκλαμψία, οι 7 (19,4%) έπασχαν από Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, οι 11 (30,6%) παρουσίασαν Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, ενώ οι υπόλοιπες 10 (27,8%) δεν είχαν κάποιο πρόβλημα στην εγκυμοσύνη και αποτελούν την ομάδα ελέγχου. Τα δημογραφικά στοιχεία των συμμετεχουσών στο σύνολό τους και ανά ομάδα, δίνονται στον Πίνακα 8 που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Δημογραφικά χαρακτηριστικά των γυναικών στο δείγμα της μελέτης συνολικά και ανά ομάδα

	Ομάδα											
	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Ηλικία, μέση τιμή (SD)	32,4 (4,6)		33,8 (4,2)		30,9 (4,4)		33,3 (3,6)		31,5 (5,9)		0,537 \pm	
Οικογενειακή κατάσταση	Άγαμη	2	5,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	20,0	0,149 $^{++}$
	Έγγαμη	34	94,4	8	100,0	7	100,0	11	100,0	8	80,0	
Υπηκοότητα	Ελληνική	35	97,2	8	100,0	6	85,7	11	100,0	10	100,0	0,194 $^{++}$
	Ρουμανική	1	2,8	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	
Φυλή	Καυκάσια	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
Επάγγελμα	ΔΗΜ. ΥΠ.	2	5,6	1	12,5	1	14,3	0	0,0	0	0,0	0,325 $^{++}$
	ΙΑΤΡΟΣ	2	5,6	0	0,0	1	14,3	0	0,0	1	10,0	
	ΙΔ.ΥΠ.	7	19,4	0	0,0	1	14,3	3	27,3	3	30,0	

	ΚΟΜΜΩΤΡΙΑ	1	2,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	
	ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ	1	2,8	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	
	ΟΙΚΙΑΚΑ	19	52,8	6	75,0	3	42,9	7	63,6	3	30,0	
	ΠΟΛΙΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ	1	2,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	
	ΦΑΡΜ. ΥΠ.	1	2,8	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ	2	5,6	0	0,0	0	0,0	1	9,1	1	10,0	
Θρήσκευμα	ΧΟ	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
Επίπεδο εκπαίδευσης	ΥΕ	8	22,2	2	25,0	0	0,0	3	27,3	3	30,0	0,520++
	ΔΕ	14	38,9	2	25,0	5	71,4	5	45,5	2	20,0	
	ΤΕ	7	19,4	2	25,0	1	14,3	1	9,1	3	30,0	
	ΠΕ	5	13,9	2	25,0	0	0,0	1	9,1	2	20,0	
	Μεταπτυχιακό/ Διδακτορικό	2	5,6	0	0,0	1	14,3	1	9,1	0	0,0	
Κάπνισμα	Όχι	18	50,0	4	50,0	4	57,1	6	54,5	4	40,0	0,937++
	Ναι	18	50,0	4	50,0	3	42,9	5	45,5	6	60,0	
Αν ναι, πόσα έτη, μέση τιμή (SD)		10,7 (4,1)		11,8 (2,4)		9 (2,6)		13 (4,5)		8,6 (5)		0,329‡
Αν ναι, πόσα τσιγάρα την ημέρα, μέση τιμή (SD)		11,7 (8,2)		16,3 (4,8)		18,3 (12,6)		5,6 (2,6)		10,3 (7,9)		0,088‡
Ηλικία πατέρα, μέση τιμή (SD)		43,8 (7,4)		45 (9,5)		42,3 (1,6)		43,7 (5,5)		45 (13,8)		0,934‡
Αλκοολισμός	Όχι	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
	Ναι	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

++Fisher's exact test ‡ANOVA

Η πλειονότητα των συμμετεχουσών ήταν έγγαμες (94,4%). Όλες οι συμμετέχουσες ήταν καυκάσιες και χριστιανές ορθόδοξοι, ενώ οι περισσότερες (97,2%) ήταν ελληνικής υπηκοότητας. Το 52,8% των συμμετεχουσών ασχολούταν με τα οικιακά. Αναφορικά με το επίπεδο εκπαίδευσης, το 38,9% των συμμετεχουσών ήταν ΔΕ και το 22,2% ήταν ΥΕ. Οι μισές από τις συμμετέχουσες κάπνιζαν, με μέσο αριθμό τσιγάρων ανά ημέρα τα 10,7 ($\pm 4,1$ τσιγάρα). Καμία από τις συμμετέχουσες δεν είχε πρόβλημα με το αλκοόλ. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 ομάδων αναφορικά με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά τους.

Το σωματικό βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) των συμμετεχουσών πριν και μετά την εγκυμοσύνη δίνονται στον Πίνακα 9, συνολικά και ανά ομάδα. Στο

σύνολο των γυναικών, το μέσο βάρος πριν την εγκυμοσύνη ήταν 78,7 ($\pm 17,5$ κιλά) και μετά την εγκυμοσύνη ήταν 89,4 ($\pm 16,7$ κιλά). Η μέση διαφορά βάρους ήταν 10,8 ($\pm 4,1$ κιλά). Αντίστοιχα, ο μέσος BMI των συμμετεχουσών πριν την εγκυμοσύνη ήταν 29 ($\pm 5,9$ kg/m²) και μετά την εγκυμοσύνη ήταν 32,9 ($\pm 5,5$ kg/m²). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αναφορικά με το σωματικό βάρος ή τον δείκτη μάζας σώματος πριν ή μετά την εγκυμοσύνη, καθώς και με τη μεταβολή του βάρους τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Πίνακας 9: Μέσο σωματικό βάρος και δείκτης μάζας σώματος στο δείγμα της μελέτης πριν και μετά την εγκυμοσύνη, συνολικά και ανά ομάδα

	Ομάδα					P‡
	Σύνολο δείγματος (N=36)	Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)	ΣΔ2 (N=7, 19,4%)	ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)	Φυσιολογική (N=10, 27,8%)	
	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	
Βάρος πριν την εγκυμοσύνη	78,7 (17,5)	81 (17,5)	88,6 (18,1)	78,2 (19,9)	70,6 (11,5)	0,209
Βάρος μετά την εγκυμοσύνη	89,4 (16,7)	91 (16,9)	98,7 (17,6)	88,3 (19,6)	82,7 (10,2)	0,277
Διαφορά βάρους	10,8 (4,1)	10 (2,9)	10,1 (2,6)	10,5 (4,8)	12,2 (5,2)	0,685
BMI πριν την εγκυμοσύνη	29 (5,9)	29 (6,7)	32,9 (6,9)	28,5 (5,8)	26,7 (3,9)	0,204
BMI μετά την εγκυμοσύνη	32,9 (5,5)	32,6 (6,2)	36,7 (6,4)	32,3 (5,5)	31,3 (3,4)	0,232

‡ANOVA

Στον Πίνακα 10 περιγράφεται το ατομικό ιστορικό των συμμετεχουσών, συνολικά και ανά ομάδα. Στο σύνολο του δείγματος, 27,8% των συμμετεχουσών έπασχε από κάποιο χρόνια νόσημα. Το 41,7% των συμμετεχουσών έπασχε από Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και το 22,2% από Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. Επίσης, 27,8% των γυναικών έπασχε από κάποια θυρεοειδοπάθεια και 8,3% από υπέρταση. Ένα μικρό ποσοστό (2,8%) των γυναικών έπασχε από νεφροπάθεια, ενώ 19,4% είχε λεύκωμα στα ούρα.

Τα ποσοστά εμφάνισης άλλων χρόνιων νοσημάτων (βρογχικό άσθμα, αιμοσφαιρινοπάθεια, θρομβοφιλία, αυτοάνοσα νοσήματα, δυσλιπιδαιμία), σακχαρώδη διαβήτη, υπέρτασης και λευκώματος στα ούρα διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων. Αναλυτικότερα, το ποσοστό άλλων χρόνιων νοσημάτων ήταν υψηλότερο στις γυναίκες με Προεκλαμψία και με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, και χαμηλότερο σε εκείνες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. Καμία από τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση δεν είχε Σακχαρώδη Διαβήτη, ενώ από τις γυναίκες με Προεκλαμψία, οι μισές (50%) είχαν Διαβήτη Κύησης και 12,5% είχαν Διαβήτη Τύπου 2. Τέλος, το ποσοστό των γυναικών με χρόνια υπέρταση και με λεύκωμα στα ούρα ήταν σημαντικά υψηλότερο στις γυναίκες με Προεκλαμψία, σε σχέση με τις άλλες ομάδες.

Πίνακας 10: Ατομικό ιστορικό του δείγματος της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Χρόνια νοσήματα	Όχι	26	72,2	3	37,5	4	57,1	11	100,0	8	80,0	0,009++
	Ναι	10	27,8	5	62,5	3	42,9	0	0,0	2	20,0	
Σακχαρώδης Διαβήτης	Όχι	13	36,1	3	37,5	0	0,0	0	0,0	10	100,0	<0,001++
	Ναι, Κύησης	15	41,7	4	50,0	0	0,0	11	100,0	0	0,0	
	Ναι, Τύπου 2	8	22,2	1	12,5	7	100,0	0	0,0	0	0,0	
Έτη από τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2	0-1 έτος	2	33,3	0	0,0	2	40,0	0	0,0	0	0,0	0,333++
	1-5 έτη	2	33,3	0	0,0	2	40,0	0	0,0	0	0,0	
	5-10 έτη	1	16,7	0	0,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	
	>10 έτη	1	16,7	1	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Θυρεοειδοπάθειες	Όχι	26	72,2	6	75,0	4	57,1	8	72,7	8	80,0	0,794++
	Ναι	10	27,8	2	25,0	3	42,9	3	27,3	2	20,0	
Νόσημα	Υποθυρεοειδισμός	6	16,7	2	25,0	3	42,9	1	9,1	0	0,0	-
	Θυρεοειδεκτομή- Όζοι	1	2,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	
	Ιστορικό υποθυρεοειδισμού, τώρα ευθυρεοειδική	1	2,8	0	0,0	0	0,0	1	9,1	0	0,0	
	Όζοι θυρεοειδούς	1	2,8	0	0,0	0	0,0	1	9,1	0	0,0	
	Υποθυρεοειδισμός (θυρεοειδεκτομή)	1	2,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	

Έτη από τη διάγνωση θυρεοειδοπάθειας	0-1 έτος	2	28,6	0	0,0	2	66,7	0	0,0	0	0,0	0,124++
	1-5 έτη	4	57,1	2	100,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	
	5-10 έτη	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	>10 έτη	1	14,3	0	0,0	1	33,3	0	0,0	0	0,0	
Τελευταία TSH, μέση τιμή (SD) (ενδ. εύρος)		6,3 (9,7)	2,4 (1,9 – 4,3)	2,2 (0)	2,2 (2,2 – 2,2)	1,9 (0)	1,9 (1,9 – 1,9)	2,6 (1,7)	2,5 (1 – 4,3)	25,9 (0)	25,9 (25,9 – 25,9)	0,471##
Χρόνια υπέρταση	Όχι	33	91,7	5	62,5	7	100,0	11	100,0	10	100,0	0,013++
	Ναι	3	8,3	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Νεφροπάθεια	Όχι	35	97,2	8	100,0	6	85,7	11	100,0	10	100,0	0,194++
	Ναι	1	2,8	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	
Λεύκωμα στα ούρα	Όχι	29	80,6	1	12,5	7	100,0	11	100,0	10	100,0	<0,001++
	Ναι	7	19,4	7	87,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

++Fisher's exact test ##Kruskal-Wallis test

Το οικογενειακό ιστορικό των συμμετεχουσών περιγράφεται στον Πίνακα 11 που ακολουθεί, συνολικά και ανά ομάδα. Καμία από τις γυναίκες δεν είχε οικογενειακό ιστορικό Προεκλαμψίας, είτε από τη δική τους την πλευρά είτε από του συντρόφου τους. Θετικό οικογενειακό ιστορικό Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης είχε το 11,1% των συμμετεχουσών από την πλευρά του συντρόφου τους, και καμία γυναίκα από τη δική της οικογένεια. Το 33,3% των συμμετεχουσών είχε μητέρα με χρόνια υπέρταση και το 47,2% είχε πατέρα με χρόνια υπέρταση. Τέλος, 5,6% των συμμετεχουσών είχε μητέρα με νεφροπάθεια ενώ καμία δεν είχε πατέρα με νεφροπάθεια. Τα στοιχεία από το οικογενειακό ιστορικό στις γυναίκες του δείγματος της μελέτης ήταν παρόμοια στις 4 ομάδες.

Πίνακας 11: Οικογενειακό ιστορικό του δείγματος της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Προεκλαμψία μητέρας (από μητέρα)	Όχι	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
	Ναι	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Προεκλαμψία μητέρας (από πατέρα)	Όχι	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
	Ναι	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
ΣΔΚ μητέρας (από μητέρα)	Όχι	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
	Ναι	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
ΣΔΚ μητέρας (από πατέρα)	Όχι	32	88,9	7	87,5	5	71,4	11	100,0	9	90,0	0,299++
	Ναι	4	11,1	1	12,5	2	28,6	0	0,0	1	10,0	
Χρόνια υπέρταση μητέρας	Όχι	24	66,7	7	87,5	3	42,9	6	54,5	8	80,0	0,224++
	Ναι	12	33,3	1	12,5	4	57,1	5	45,5	2	20,0	
Χρόνια υπέρταση πατέρα	Όχι	19	52,8	5	62,5	3	42,9	5	45,5	6	60,0	0,835++
	Ναι	17	47,2	3	37,5	4	57,1	6	54,5	4	40,0	
Νεφροπάθεια μητέρας	Όχι	34	94,4	7	87,5	7	100,0	10	90,9	10	100,0	0,825++
	Ναι	2	5,6	1	12,5	0	0,0	1	9,1	0	0,0	
Νεφροπάθεια πατέρα	Όχι	36	100,0	8	100,0	7	100,0	11	100,0	10	100,0	-
	Ναι	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

++Fisher's exact test

Στον Πίνακα 12 περιγράφεται το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών στο δείγμα της μελέτης. Στο σύνολο των γυναικών, η μέση ηλικία εμμηναρχής ήταν 12,7 ($\pm 1,1$ έτη), με το 80,6% των συμμετεχουσών να έχει σταθερό κύκλο. Αυτόματες αποβολές είχαν συμβεί σε 13,9% των γυναικών και τεχνητές διακοπές σε 16,7%. Το 44,4% των συμμετεχουσών ήταν στην πρώτη κύηση και ίδιο ποσοστό στη δεύτερη κύηση. Πολύδυμες κυήσεις είχε το 5,0% των συμμετεχουσών. Το μέσο χρονικό διάστημα που είχε μεσολαβήσει από τον τελευταίο τοκετό ήταν 3,6 ($\pm 2,2$ έτη). Δεν παρατηρήθηκαν

σημαντικές διαφορές στο γυναικολογικό ιστορικό μεταξύ των γυναικών στις 4 ομάδες.

Πίνακας 12: Γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

	Ομάδα										P	
	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Ηλικία αρχής εμμήνου ρύσεως, μέση τιμή (SD)	12,7 (1,1)		12,6 (1,2)		12,6 (1,5)		12,6 (1)		13 (0,9)		0,843‡	
Σταθερός έμμηνος κύκλος	Όχι	7	19,4	2	25,0	2	28,6	0	0,0	3	30,0	0,210++
	Ναι	29	80,6	6	75,0	5	71,4	11	100,0	7	70,0	
Αυτόματες αποβολές	Όχι	31	86,1	7	87,5	5	71,4	10	90,9	9	90,0	0,735++
	Ναι	5	13,9	1	12,5	2	28,6	1	9,1	1	10,0	
Τεχνητή διακοπή κύησης	Όχι	30	83,3	8	100,0	6	85,7	9	81,8	7	70,0	0,468++
	Ναι	6	16,7	0	0,0	1	14,3	2	18,2	3	30,0	
Αριθμός προηγούμενων κυήσεων	0	16	44,4	4	50,0	4	57,1	4	36,4	4	40,0	0,815++
	1	16	44,4	2	25,0	3	42,9	6	54,5	5	50,0	
	2	4	11,1	2	25,0	0	0,0	1	9,1	1	10,0	
Πολύδυμες κυήσεις	Όχι	19	95,0	4	100,0	3	100,0	6	85,7	6	100,0	1,000++
	Ναι	1	5,0	0	0,0	0	0,0	1	14,3	0	0,0	
Χρονικό διάστημα από τελευταίο τοκετό, μέση τιμή (SD)	3,6 (2,2)		4,3 (3,3)		4,3 (1,5)		3,9 (2,4)		2,2 (0,8)		0,441‡	

++Fisher's exact test ‡ANOVA

Οι συνήθειες των συμμετεχουσών κατά την εγκυμοσύνη δίνονται στον Πίνακα 13, στο σύνολό τους και ανά ομάδα. Το 19,4% των γυναικών κάπνιζε κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με μέσο όρο τσιγάρων ημερησίως τα 5,4 ($\pm 2,1$ τσιγάρα). Το 77,8% των συμμετεχουσών δεν εργαζόταν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις συνήθειες των γυναικών στις 4 ομάδες της μελέτης κατά τη διάρκεια της κύησης.

Πίνακας 13: Συνήθειες ζωής κατά την εγκυμοσύνη των γυναικών στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Κάπνισμα κατά τη διάρκεια της κύησης	Όχι	29	80,6	6	75,0	7	100,0	9	81,8	7	70,0	0,521 ⁺⁺
	Ναι	7	19,4	2	25,0	0	0,0	2	18,2	3	30,0	
Αν ναι, πόσα τσιγάρα την ημέρα, μέση τιμή (SD)		5,4 (2,1)		7,5 (3,5)		-		5 (0)		4,3 (1,2)		0,299 [‡]
Εργασία κατά τη διάρκεια της κύησης	Όχι	28	77,8	5	62,5	7	100,0	8	72,7	8	80,0	0,476 ⁺⁺
	Καθιστική	7	19,4	2	25,0	0	0,0	3	27,3	2	20,0	
	Ορθοστασία	1	2,8	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

⁺⁺Fisher's exact test [‡]ANOVA

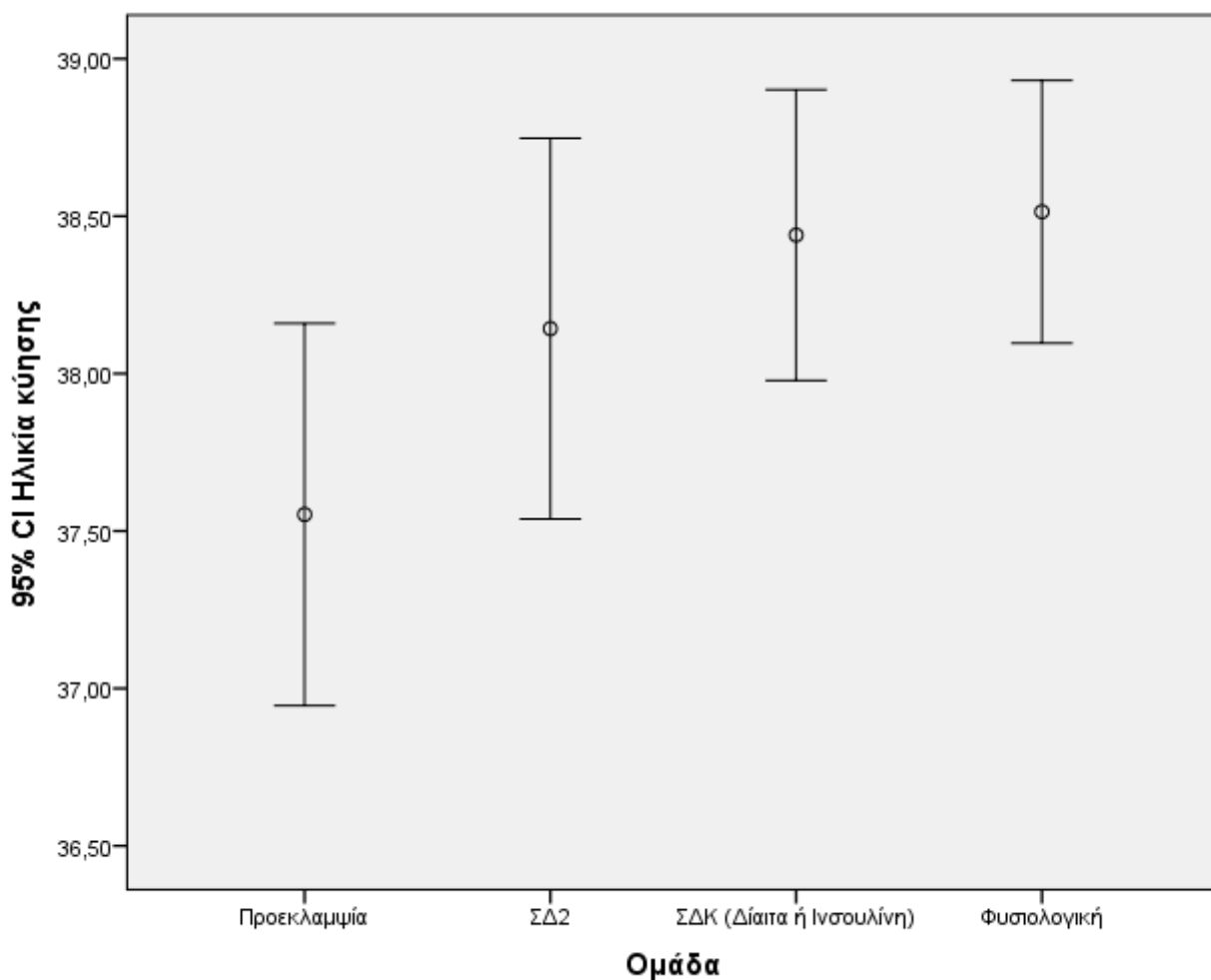
Πληροφορίες αναφορικά με τον τοκετό συνολικά στο δείγμα της μελέτης και ανά ομάδα παρατίθενται στον Πίνακα 14. Στο σύνολο το γυναικών, η μέση ηλικία κύησης ήταν 38,2 ($\pm 0,7$ εβδομάδες). Η ηλικία κύησης διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων, με τις γυναίκες με Προεκλαμψία να έχουν τη μικρότερη (37,6 $\pm 0,7$ εβδομάδες), όπως και οι γυναίκες με Σακχαρώδη διαβήτη Τύπου 2 (38,1 $\pm 0,7$ εβδομάδες) (Γράφημα 1). Η πλειονότητα των γυναικών γέννησε με καισαρική τομή, τόσο συνολικά στο δείγμα όσο και στις επιμέρους ομάδες.

Πίνακας 14: Ηλικία κύησης και τρόπος τοκετού στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Ηλικία κύησης, μέση τιμή (SD)		38,2 (0,7)		37,6 (0,7)		38,1 (0,7)		38,4 (0,7)		38,5 (0,6)		0,020‡
Τοκετός	Φυσιολογικός τοκετός	8	22,2	0	0,0	1	14,3	4	36,4	3	30,0	0,274++
	Καισαρική τομή	28	77,8	8	100,0	6	85,7	7	63,6	7	70,0	
Ανάλυση μεθόδου τοκετού	Αναρροφητική εμβρυουλκία	1	5,6	0	0,0	0	0,0	1	18,2	0	0,0	0,271++
	Καισαρική τομή	28	75,0	8	100,0	6	85,7	7	54,5	7	70,0	
	ΦΤ χωρίς εμβρυουλκία	7	19,4	0	0,0	1	14,3	3	27,3	3	30,0	

++Fisher's exact test ‡ANOVA

Γράφημα 1: Ηλικία κύησης στις γυναίκες με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και φυσιολογική κύηση



Τα εργαστηριακά ευρήματα των γυναικών της μελέτης περιγράφονται στους Πίνακες 15 και 16, τόσο στο σύνολο του δείγματος όσο και ανά ομάδα. Οι τιμές της συστολικής και διαστολικής πίεσης διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων, με υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται στις γυναίκες με Προεκλαμψία. Οι τιμές HBA1C διέφεραν επίσης σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων, με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στις γυναίκες με Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ή με Διαβήτη Κύησης. Οι τιμές της Hb ήταν χαμηλότερες στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Οι τιμές των άλλων εργαστηριακών εξετάσεων δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων.

Πίνακας 15: Τιμές των εργαστηριακών εξετάσεων στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

	Ομάδα										P‡‡
	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
CRP	3,1 (6,9)	1,1 (0,5 – 3,3)	8,2 (13,5)	4,5 (1,8 – 5,9)	1,7 (1,5)	1,4 (0,3 – 3,2)	1,9 (3,1)	0,8 (0,6 – 1,8)	1,4 (1,2)	1,1 (0,5 – 1,9)	0,197
LDH (αρχή κύησης)	207,9 (56,7)	200,5 (172,5 – 221)	210,4 (72,1)	201,5 (160 – 275,5)	217,7 (72,4)	200 (175 – 216)	199,5 (37,8)	204 (162 – 216)	208,3 (56,7)	188,5 (172 – 226)	0,989
LDH (τρίτο τρίμηνο)	211,7 (57,9)	202 (173 – 250)	210,4 (72,1)	201,5 (160 – 275,5)	217,7 (72,4)	200 (175 – 216)	199,5 (37,8)	204 (162 – 216)	223,3 (59,7)	213 (181 – 273)	0,902
GLU	83,1 (19,4)	79,5 (71,5 – 89,5)	83,4 (10,8)	80,5 (77,5 – 88,5)	76,9 (25,4)	87 (46 – 91)	88,6 (19,9)	86 (76 – 96)	81,2 (20,9)	72,5 (69 – 87)	0,553
UA	4,7 (1)	4,6 (4,1 – 5,3)	5,2 (1,1)	4,9 (4,3 – 6)	4,4 (0,7)	4,5 (4,1 – 4,8)	4,4 (1,1)	4,1 (3,6 – 5,2)	5 (1)	5 (4,1 – 5,8)	0,350
HBA1C %	5,5 (0,7)	5,6 (5,2 – 6)	5,5 (0,9)	5,3 (5 – 6,2)	5,8 (0,3)	5,8 (5,6 – 6)	5,8 (0,5)	5,8 (5,3 – 6,1)	5 (0,6)	5,3 (4,5 – 5,5)	0,021
Κρεατινίνη (αρχή κύησης)	0,69 (0,17)	0,6 (0,6 – 0,8)	0,78 (0,27)	0,7 (0,55 – 1)	0,67 (0,16)	0,7 (0,6 – 0,8)	0,67 (0,15)	0,6 (0,55 – 0,8)	0,65 (0,11)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,830
Κρεατινίνη (τρίτο τρίμηνο)	0,62 (0,18)	0,6 (0,5 – 0,7)	0,71 (0,25)	0,7 (0,55 – 0,8)	0,61 (0,29)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,6 (0,08)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,59 (0,1)	0,6 (0,5 – 0,7)	0,519
Ht	36,2 (7,1)	35,8 (33,5 – 37,9)	36,1 (2,7)	35,8 (34,7 – 38,3)	34,7 (2,2)	35,9 (32,8 – 36,4)	37,4 (2,7)	37,1 (35,4 – 39,6)	35,8 (13,2)	31,9 (29 – 37,6)	0,173
Hb	11,6 (1,5)	11,9 (10,9 – 12,5)	12 (0,8)	12,2 (11,3 – 12,8)	11,5 (0,8)	11,8 (11 – 12,1)	12,5 (1)	12,3 (11,9 – 13,3)	10,4 (1,8)	10,2 (9 – 12,3)	0,033
Αιμοπετάλια	214,4 (58,3)	192 (173 – 239,5)	206,3 (53,6)	180,5 (173 – 234,5)	192,6 (48,4)	173 (155 – 234)	222,4 (58,4)	219 (190 – 238)	227,5 (70,4)	216 (174 – 260)	0,404
Λευκά αιμοσφαίρια	10,4 (2,3)	10,1 (8,6 – 12,1)	10 (2)	9,8 (8,5 – 12,1)	10,3 (2,1)	10,5 (8 – 11,9)	10,4 (2,3)	10,1 (8,4 – 12,6)	10,8 (2,8)	9,7 (8,8 – 13,3)	0,979
Πολυμορφοπύρρηνα	75 (6,4)	74,4 (71,3 – 78,3)	75,3 (6,2)	74,2 (70,3 – 78,7)	74,6 (10,7)	74,8 (65 – 83,5)	74,1 (4,2)	73,9 (70,3 – 79,1)	75,9 (5,5)	76,4 (72,9 – 77,6)	0,969
Λεμφοκύτταρα	18,1 (5,6)	17,8 (14,9 – 21,7)	18,1 (6,1)	18,9 (15,2 – 22,7)	19,3 (8,5)	18,9 (12,4 – 25,9)	18,8 (3,8)	19,4 (14,8 – 22,8)	16,5 (5,1)	16 (15 – 19,8)	0,789
Μονοκύτταρα	6,1 (1,8)	6,2 (5 – 6,7)	5,7 (1,3)	5,4 (4,7 – 6,3)	5,4 (2)	5,4 (3,7 – 7,1)	6,2 (1)	6,5 (5,3 – 6,7)	6,7 (2,6)	5,8 (5,1 – 8,3)	0,588
Ηωσινόφιλα	0,64 (0,35)	0,6 (0,35 – 0,95)	0,71 (0,4)	0,55 (0,45 – 1,1)	0,43 (0,31)	0,3 (0,3 – 0,8)	0,74 (0,3)	0,7 (0,5 – 1)	0,61 (0,37)	0,55 (0,2 – 1)	0,267
FIB	455,5 (99,4)	446,7 (389,6 – 488)	486,2 (143,3)	455 (413,7 – 649,3)	422,6 (52,6)	416,7 (381,2 – 464)	467,2 (91,4)	446,7 (390,6 – 586,4)	422,7 (68,2)	389,6 (389,6 – 455)	0,619

Appt	30,1 (10,9)	27,3 (26,1 – 28,7)	26,7 (2,2)	27,5 (26,1 – 28,3)	26,2 (4,1)	26 (22,5 – 29)	31,8 (11,9)	27,1 (26,4 – 33)	32,6 (15,2)	27,8 (26,3 – 28,6)	0,696
INR	1,03 (0,56)	0,92 (0,9 – 0,98)	0,93 (0,06)	0,9 (0,88 – 0,99)	0,95 (0,11)	0,92 (0,91 – 0,99)	0,92 (0,04)	0,92 (0,89 – 0,93)	1,29 (1,06)	0,95 (0,92 – 1,04)	0,328

Πίνακας 16: Τιμές των μετρήσεων της αρτηριακής πίεσης στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

	Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)				
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	P
ΣΑΠ 1^ο τρίμηνο	125,1 (21,4)	120 (110 – 135)	159,4 (4,2)	160 (160 – 160)	115 (13,2)	120 (110 – 125)	119,1 (12,2)	120 (110 – 130)	111,5 (10,6)	110 (100 – 120)	<0,001
ΔΑΠ 1^ο τρίμηνο	74,4 (12,6)	70 (70 – 80)	88,1 (11,9)	90 (80 – 97,5)	72,9 (12,5)	70 (70 – 80)	70,5 (11,1)	70 (60 – 80)	69 (7)	70 (60 – 75)	0,018
Σ.Α.Π 3^ο τρίμηνο	126,3 (20,1)	120 (110 – 145)	157,8 (4,2)	160 (156 – 160)	122,9 (9,5)	120 (120 – 130)	118,2 (14)	110 (110 – 130)	112,5 (9,8)	110 (110 – 120)	<0,001
Δ.Α.Π. 3^ο τρίμηνο	74,5 (11,1)	70 (70 – 80)	87,6 (11,2)	90 (78 – 97,5)	74,3 (7,9)	70 (70 – 80)	70,5 (8,5)	70 (60 – 80)	68,5 (6,7)	70 (60 – 70)	0,005

Οι βιοχημικές εξετάσεις των συμμετεχουσών δίνονται στον Πίνακα 17, στο σύνολο των γυναικών και ανά ομάδα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 ομάδων για τις τιμές των βιοχημικών εξετάσεων.

Πίνακας 17: Τιμές των βιοχημικών εξετάσεων στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		P‡‡
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
Ουρία	22 (9)	21,2 (16,3 – 26,3)	20,5 (5,3)	22,1 (15,6 – 25)	19,3 (6,4)	21 (14,8 – 24,3)	24,1 (5)	26 (18,1 – 28)	22,7 (15)	17,5 (16 – 22)	0,166
Κρεατινίνη	0,57 (0,16)	0,5 (0,5 – 0,6)	0,56 (0,11)	0,55 (0,5 – 0,65)	0,54 (0,13)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,54 (0,08)	0,5 (0,5 – 0,6)	0,62 (0,26)	0,5 (0,5 – 0,7)	0,930
Ουρικό οξύ	4,7 (1)	4,6 (4,1 – 5,3)	5,2 (1,1)	4,9 (4,3 – 6)	4,4 (0,7)	4,4 (4,1 – 4,8)	4,4 (1,1)	4,1 (3,6 – 5,2)	5 (1)	5 (4,1 – 5,8)	0,342
K	4,3 (0,4)	4,3 (4,1 – 4,5)	4,2 (0,3)	4,3 (4,1 – 4,5)	4,3 (0,3)	4,3 (4 – 4,5)	4,4 (0,3)	4,4 (4,1 – 4,6)	4,4 (0,5)	4,2 (4,1 – 4,5)	0,823
Na	137,1 (2,6)	137 (135,5 – 139)	136,9 (2,4)	137,5 (135 – 139)	138,1 (3,1)	138 (136 – 141)	137,3 (3)	136 (136 – 139)	136,4 (2,2)	136,5 (135 – 137)	0,557
Ca	9,2 (0,7)	9,2 (8,9 – 9,6)	9,3 (0,6)	9,3 (8,8 – 9,7)	9,2 (0,8)	9,1 (9,1 – 10)	9,4 (0,7)	9,5 (8,9 – 9,7)	9 (0,5)	9,1 (8,4 – 9,3)	0,347
Ολική BIL	0,38 (0,17)	0,32 (0,3 – 0,4)	0,34 (0,24)	0,29 (0,23 – 0,32)	0,39 (0,16)	0,32 (0,3 – 0,4)	0,35 (0,14)	0,3 (0,3 – 0,4)	0,44 (0,15)	0,45 (0,32 – 0,6)	0,153
Άμεση BIL	0,15 (0,06)	0,12 (0,1 – 0,2)	0,14 (0,06)	0,11 (0,1 – 0,16)	0,15 (0,08)	0,12 (0,1 – 0,2)	0,15 (0,05)	0,14 (0,1 – 0,2)	0,16 (0,07)	0,16 (0,1 – 0,2)	0,866
SGOT	18,4 (8,6)	16 (13 – 22)	15 (5,2)	15,5 (11 – 19)	17,9 (6,6)	16 (14 – 22)	21,2 (12,6)	15 (13 – 23)	18,3 (6,4)	16,5 (13 – 22)	0,790
SGPT	17,7 (25,7)	11,5 (9 – 16)	11,3 (3,5)	10 (9 – 13,5)	13,4 (3,8)	12 (11 – 17)	32 (44,1)	15 (10 – 32)	10 (3,7)	8,5 (8 – 12)	0,066
γ-GT	10,7 (7,9)	7 (5 – 14)	10,1 (4,3)	10 (6,5 – 14)	11,6 (9,8)	6 (5 – 23)	9,4 (4,9)	8 (5 – 11)	11,9 (11,7)	6 (5 – 16)	0,864
ALP	134,6 (44,1)	132,5 (100,5 – 171)	119,5 (41,4)	114 (92,5 – 145)	118,9 (28,7)	104 (93 – 146)	141,3 (47,2)	139 (98 – 178)	150,4 (49,7)	144 (121 – 187)	0,353

Ολική πρωτεΐνη	6,1 (0,6)	6,3 (5,8 – 6,6)	6,1 (0,6)	6,3 (5,6 – 6,5)	6,2 (0,7)	6,2 (5,8 – 6,7)	6,2 (0,6)	6,2 (6,1 – 6,6)	6,1 (0,7)	6,3 (5,8 – 6,4)	0,983
Αλβουμίνη	3,4 (0,3)	3,5 (3,2 – 3,6)	3,3 (0,3)	3,3 (3,1 – 3,5)	3,3 (0,4)	3,4 (3 – 3,6)	3,5 (0,2)	3,6 (3,2 – 3,6)	3,4 (0,4)	3,5 (3,2 – 3,7)	0,789
LDH	214,3 (62,1)	204 (174 – 227,5)	195,5 (58,9)	201,5 (160 – 218)	220,3 (72)	204 (175 – 218)	199,5 (37,8)	204 (162 – 216)	241,4 (76,2)	227,5 (181 – 273)	0,515
CHOL	262,2 (37,8)	261 (247 – 283)	255,1 (60,6)	264 (253 – 279)	272,7 (38)	271 (257 – 307)	273,2 (30,8)	265 (246 – 306)	247,4 (18,6)	247 (238 – 252)	0,175
HDL	68,7 (18,6)	68 (59 – 75)	61,4 (15,3)	68 (46 – 73)	82 (33)	83,5 (60 – 89)	71,9 (12,9)	73 (63 – 81)	61,7 (8,7)	59 (56 – 68)	0,132
LDL	158,2 (40,7)	160 (132 – 175)	151,9 (56,2)	167 (100 – 174)	168 (47,8)	180 (118 – 203)	172,5 (35,2)	168 (150 – 211)	139,1 (21,8)	141 (120 – 158)	0,216
TG	265,8 (161,1)	223 (172 – 283)	306,7 (226,7)	212 (164 – 317)	227,7 (83,7)	228 (172 – 309)	231,9 (89,6)	245 (173 – 277)	300,8 (212,8)	223 (168 – 290)	0,964
Fe	76,1 (36,3)	67 (44 – 95)	77,2 (50,2)	55,5 (41 – 130)	75,2 (27,8)	74 (51 – 91)	86,1 (31,9)	79 (63 – 108)	64,9 (38,2)	50 (39 – 80)	0,373
Ferr	30,4 (23,2)	20 (15,5 – 44,5)	26 (18,4)	20 (15 – 37)	23,7 (18,6)	19,5 (14 – 22)	35,5 (23,3)	30 (12 – 55)	31 (29)	19 (16 – 41)	0,851
P	3,5 (0,6)	3,6 (3,2 – 3,8)	3,3 (0,7)	3,4 (2,7 – 3,8)	3,9 (0,6)	3,9 (3,7 – 4,3)	3,4 (0,7)	3,7 (2,8 – 3,8)	3,6 (0,5)	3,5 (3,4 – 3,6)	0,398
Mg	2,2 (2,7)	1,8 (1,7 – 1,9)	1,7 (0,1)	1,75 (1,6 – 1,8)	1,8 (0,2)	1,8 (1,7 – 2)	1,8 (0,2)	1,9 (1,7 – 1,9)	3,3 (4,8)	1,8 (1,7 – 1,9)	0,536
AMY Ορού	61 (19,9)	62 (44 – 68,5)	58,6 (13,2)	63,5 (49 – 64,5)	67,3 (24,1)	64 (58 – 75)	57,6 (25,2)	55 (40 – 66)	62,1 (16,1)	62,5 (54 – 69)	0,596

‡‡Kruskal-Wallis test

Στον Πίνακα 18, παρατίθενται οι τιμές των εξετάσεων ούρων στο δείγμα των γυναικών της μελέτης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 ομάδων, με εξαίρεση τις τιμές για την πρωτεΐνη ούρων, οι οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στις γυναίκες με Προεκλαμψία.

Πίνακας 18: Τιμές των εξετάσεων ούρων στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

Ομάδα											
	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		P ^{‡‡}
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
ΕΒ ΟΥΡΩΝ	1017,8 (7,3)	1018 (1013 – 1023)	1015,5 (3,1)	1016 (1013 – 1017,5)	1014,7 (8,2)	1012 (1008 – 1022)	1018,2 (4,9)	1018 (1015 – 1023)	1021,5 (10)	1024,5 (1017 – 1028)	0,144
ΡΗ ΟΥΡΩΝ	6,3 (0,8)	6 (5,5 – 6,8)	6,6 (1)	6,3 (6 – 7,3)	6,3 (0,6)	6,5 (5,5 – 7)	6,1 (0,9)	6 (5,5 – 7)	6,3 (0,7)	6,2 (6 – 6,5)	0,658
ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΥΡΩΝ	16 (29,6)	10 (0 – 12,5)	45 (53,5)	20 (10 – 75)	0,7 (1,9)	0 (0 – 0)	6,8 (5,1)	10 (0 – 10)	13,5 (11,1)	10 (5 – 20)	0,003
GLU ΟΥΡΩΝ	3,1 (11,7)	0 (0 – 0)	0 (0)	0 (0 – 0)	7,1 (18,9)	0 (0 – 0)	5,5 (15,1)	0 (0 – 0)	0 (0)	0 (0 – 0)	0,357
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΟΥΡΩΝ	0,06 (0,2)	0 (0 – 0,01)	0,13 (0,35)	0 (0 – 0)	0,01 (0,02)	0 (0 – 0)	0,06 (0,15)	0 (0 – 0,03)	0,05 (0,16)	0 (0 – 0)	0,434

‡‡Kruskal-Wallis test

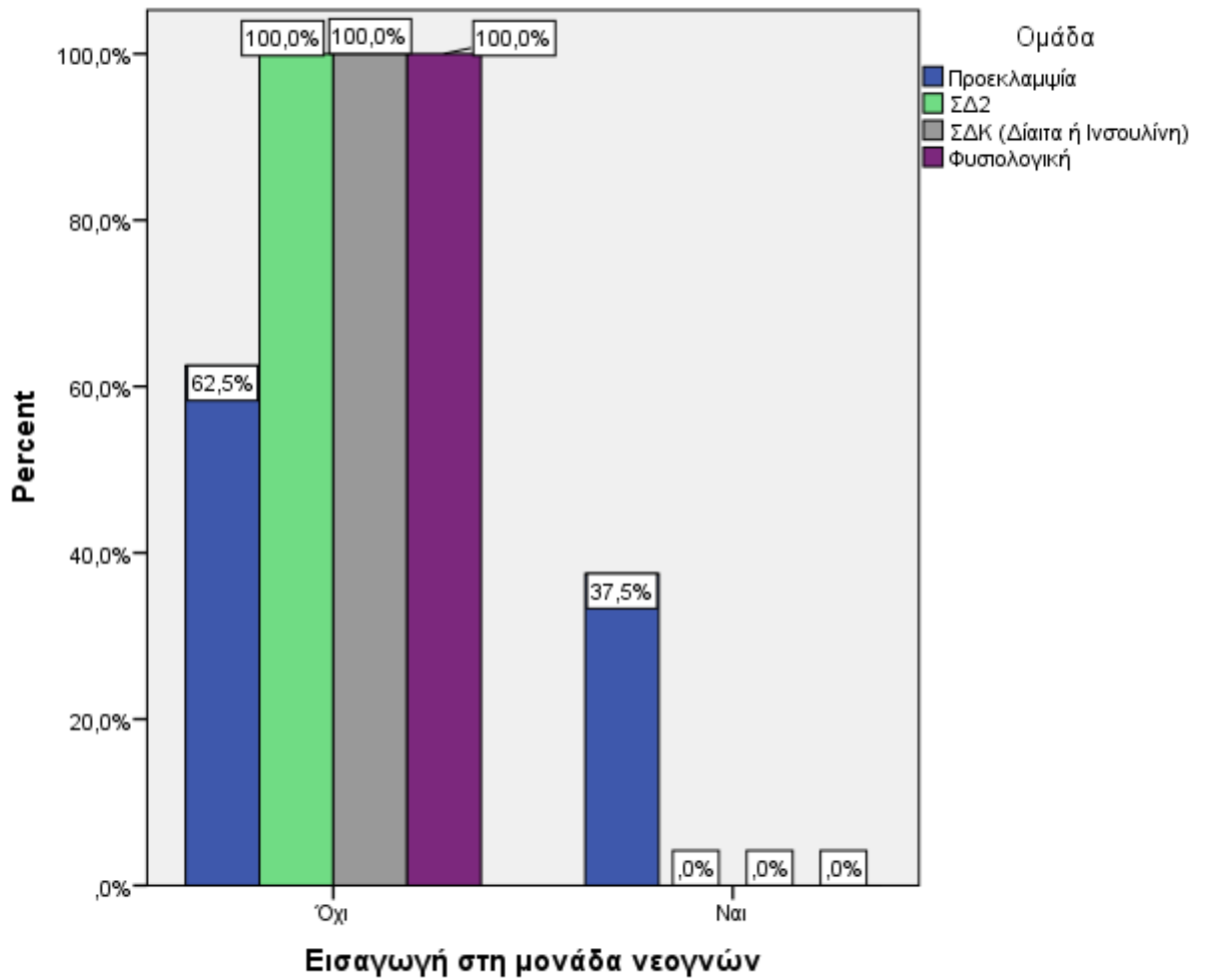
Οι παράμετροι που σχετίζονται με την κατάσταση υγείας των νεογνών περιγράφονται στον Πίνακα 19, συνολικά και στις 4 ομάδες της μελέτης. Το φύλο των νεογνών και το ποσοστό εισαγωγών στη μονάδα νεογνών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των κοριτσιών ήταν σημαντικά υψηλότερο στις γυναίκες με Προεκλαμψία και στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση. Αντίθετα, υψηλότερο ποσοστό των νεογνών που γεννήθηκαν από γυναίκες με Προεκλαμψία χρειάστηκαν εισαγωγή στη μονάδα νεογνών, σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, όπου κανένα νεογέννητο δε χρειάστηκε εισαγωγή (Γράφημα 2).

Πίνακας 19: Δεδομένα για την κατάσταση υγείας των νεογνών στο δείγμα της μελέτης, συνολικά και ανά ομάδα

		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία (N=8, 22,2%)		ΣΔ2 (N=7, 19,4%)		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη) (N=11, 30,6%)		Φυσιολογική (N=10, 27,8%)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Φύλο νεογνού	Αγόρια	15	41,7	0	0,0	4	57,1	8	72,7	3	30,0	0,007++
	Κορίτσια	21	58,3	8	100,0	3	42,9	3	27,3	7	70,0	
APGAR 1', μέση τιμή (SD)		8,6 (0,6)		8,6 (0,7)		8,6 (0,5)		8,7 (0,8)		8,6 (0,5)		0,959‡
APGAR 5', μέση τιμή (SD)		9,7 (0,5)		9,9 (0,4)		9,7 (0,5)		9,7 (0,5)		9,5 (0,5)		0,406‡
Βάρος γέννησης, μέση τιμή (SD)		3088,8 (417,9)		2953,4 (587,9)		3064,3 (469,8)		3160 (296,7)		3136 (374,3)		0,744‡
Εισαγωγή στη μονάδα νεογνών	Όχι	33	91,7	5	62,5	7	100,0	11	100,0	10	100,0	0,013++
	Ναι	3	8,3	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Αέρια αίματος νεογνού (pH), μέση τιμή (SD)		7,3 (0,1)		7,3 (0,1)		7,4 (0,1)		7,3 (0)		7,3 (0)		0,086‡
Κακό περιγεννητικό αποτέλεσμα	Όχι	31	86,1	5	62,5	7	100,0	10	90,9	9	90,0	0,193++
	Ναι	5	13,9	3	37,5	0	0,0	1	9,1	1	10,0	

++Fisher's exact test ‡Kruskal-Wallis test

Γράφημα 2: Ποσοστά εισαγωγής των νεογνών στη μονάδα, στις 4 ομάδες γυναικών με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και φυσιολογική κύηση



10(B). Επιγενετική ανάλυση της κύησης. Προφίλ μεθυλίωσης στο μητρικό αίμα ως βιοδείκτης για τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη και της Προεκλαμψίας

Δεδομένου ότι η Προεκλαμψία έχει περιγραφεί ως μία ανισορροπία της ανοσολογικής κατάστασης (153), μελετήσαμε επιγενετικούς μηχανισμούς που δυνητικά μπορεί να τροποποιήσουν τη γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της κύησης, όπως την αλλαγή της κατάστασης μεθυλίωσης του DNA στον προαγωγέα των γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή, ως αιτιολογικούς παράγοντες για την εμφάνιση Προεκλαμψίας σε έγκυες γυναίκες. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από δείγματα DNA ολικού αίματος από 18 έγκυες γυναίκες (6 με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, οι οποίες δεν έλαβαν αποτελεσματική θεραπεία και τον αντιμετώπιζαν μόνο με δίαιτα, 6 ασθενείς που εμφάνισαν Προεκλαμψία και 6 υγιείς μάρτυρες). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μεθυλίωση στα υπό ανάλυση CpGs (περιοχή συχνά μεθυλιωμένου DNA με κυτοσύνη, ακολουθούμενη από γουανίνη) μεταξύ των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, με Προεκλαμψία και με την ομάδα ελέγχου (154).

Όσον αφορά το Σακχαρώδη Διαβήτη της Κύησης, η κατάσταση μεθυλίωσης των CCL25 και IL15 σε δείγματα περιφερικού αίματος δε διέφερε σημαντικά από την κατάσταση μεθυλίωσης των υγιών μαρτύρων. Μόνο ένα γονίδιο, το ATF2, έδειξε σημαντικά υψηλότερη μεθυλίωση στο Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα υπόλοιπα από τα υπό ανάλυση γονίδια εμφάνισαν υπομεθυλίωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στις περιπτώσεις Προεκλαμψίας, η μεθυλίωση των ATF2, GATA3, IL10RA, IL12A, IL13, IL4R, IL6R και TYK2 δε διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη στις υγιείς μάρτυρες. Όπως και στις περιπτώσεις με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, όλα τα άλλα γονίδια ήταν υπομεθυλιωμένα σε σύγκριση με τις υγιείς μάρτυρες. Τα προφίλ μεθυλίωσης σε δείγματα περιφερικού αίματος επιτρέπουν τη διαφοροδιάγνωση των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και με Προεκλαμψία, καθώς παρά το σχετικά περιορισμένο αριθμό ασθενών, παρατηρήθηκαν διακριτά μοτίβα μεθυλίωσης (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, τα γονίδια ATF2, CCL25, IL12B και IL6ST ήταν υπερμεθυλιωμένα σε γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης σε σύγκριση με την Προεκλαμψία. Επιπλέον, τα γονίδια που δε

διέφεραν σημαντικά μεταξύ των εγκύων με Προεκλαμψία και των υγιών μαρτύρων, ήταν υπομεθυλιωμένα σε σύγκριση με τα γονίδια των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης.

Πίνακας 4: Γονίδια με στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη μεθυλίωση σε γυναίκες με Σακχαρώδη διαβήτη κύησης (ΣΔΚ), Προεκλαμψία (ΠΕ) και υγιείς μάρτυρες (ΥΜ).

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΣΔΚ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ	ΠΕ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ	ΣΔΚ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ
	ΥΜ	ΥΜ	ΠΕ
ATF2	υπερμεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπερμεθυλίωση
CCL25	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση	υπερμεθυλίωση
CXCL14	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση
CXCL3	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση
CXCL5	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση
CXCL6	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση
IL10RA	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση
IL12A	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση
IL12B	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπερμεθυλίωση
IL13	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση
IL13RA1	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό
IL17C	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό
IL6ST	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπερμεθυλίωση
IL17RA	υπομεθυλίωση	υπερμεθυλίωση	υπομεθυλίωση
IL4R	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση

IL6R	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό	υπομεθυλίωση
INHA	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση
IL7	υπομεθυλίωση	υπομεθυλίωση	Μη σημαντικό

+ Mann-Whitney test

Από τα γονίδια που σχετίζονται πρωτίστως με τη φλεγμονή, τα IL10RA, IL12A, IL13, IL17RA, IL4R και IL6R βρέθηκαν σημαντικά υπομεθυλωμένα μόνο στις περιπτώσεις με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. Έχει προηγουμένως παρατηρηθεί ότι οι κυτοκίνες ρυθμίζονται προς τα άνω σε γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (155). Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν πως ένας πιθανός μηχανισμός για την προς τα άνω ρύθμιση είναι η κατάσταση μεθυλίωσης των αντίστοιχων γονιδίων που κωδικοποιούν ιντερλευκίνες και τους υποδοχείς τους. Όσον αφορά τα γονίδια IL13RA1 και IL17C, βρέθηκαν σημαντικά υπομεθυλωμένα τόσο σε Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης όσο και στην Προεκλαμψία σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματά μας επίσης έδειξαν σημαντική υπερμεθυλίωση του γονιδίου IL17RA μόνο στην Προεκλαμψία, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο της οικογένειας IL-17 (που εκκρίνεται κυρίως από τα κύτταρα Th17) στην ανάπτυξη της συστηματικής φλεγμονής στην Προεκλαμψία (158).

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι αν και υπάρχει παρόμοια τάση, καταγράφονται διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και Προεκλαμψίας σε δείγματα από τη συστηματική κυκλοφορία. Παλιότερα, οι Liu και συνεργάτες (152) υποστήριξαν την ύπαρξη διαφορετικών μεθυλωμάτων DNA στον ανθρώπινο πλακούντα μεταξύ Προεκλαμψίας και Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. Ωστόσο, αν και ορισμένα γονίδια μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης στον ιστό, η δυνατότητα ανίχνευσης αυτών των διαφορών σε δείγματα περιφερικού αίματος θέτει την προοπτική για τη χρήση της μεθυλίωσης ως βιοδείκτη για τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη και της Προεκλαμψίας στην κύηση.

10(Γ). ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ

10(Γ1). Ανάλυση του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6

Έχοντας ερευνήσει σε προηγούμενη μελέτη τις επιγενετικές μεταβολές σε μεγάλο αριθμό κυτοκινών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και η ιντερλευκίνη 6, η οποία σε Προεκλαμψία και Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης επιδεικνύει ένα συγκεκριμένο προφίλ μεθυλίωσης με πιθανές κλινικές επιπτώσεις, αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε και να συγκρίνουμε τα ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων GG, GC και CC του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 στις ομάδες γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη, τόσο στο μυ όσο και στον πλακούντα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιγράφονται στους Πίνακες 20 και 21.

Αναφορικά με την έκφραση στο μυ, στο σύνολο των γυναικών, η πλειονότητα (80,6%) έφερε το γονότυπο GG. Η σύγκριση μεταξύ των 4 ομάδων έδειξε σημαντική διαφορά στα ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων (Πίνακας 20). Οι γυναίκες με Προεκλαμψία, και με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ή Κύησης εξέφραζαν κυρίως το γονότυπο GG. Αντίθετα, το ποσοστό εμφάνισης του γονότυπου CC ήταν σημαντικά υψηλότερο στον μυ των γυναικών με φυσιολογική κύηση (50%), σε σύγκριση με τις άλλες τρεις ομάδες γυναικών. Διενεργήθηκε περαιτέρω ανάλυση στις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ανάλογα με τα αν ακολουθούσαν δίαιτα ή λάμβαναν ινσουλίνη, και στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση ανάλογα με το αν είχαν φυσιολογικό ή αυξημένο BMI (Δείκτη μάζας σώματος (Πίνακας 21). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης εξέφραζαν κυρίως το γονότυπο GG ανεξάρτητα από τη λήψη διαίτας ή ινσουλίνης. Αντίθετα, ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το εύρημα πως από τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση, όσες είχαν φυσιολογικό BMI εξέφραζαν το γονότυπο CC σε ποσοστό 100%, ενώ οι παχύσαρκες έφεραν το γονότυπο GG σε ποσοστό 100%.

Αντίθετα, όσον αφορά στην έκφραση στον πλακούντα, στο σύνολο του δείγματος ο πιο συχνός γονότυπος ήταν ο GC σε ποσοστό 66,7% των γυναικών. Ο γονότυπος GC ήταν συχνότερος σε όλες τις επιμέρους ομάδες γυναικών με ποσοστά εμφάνισης που κυμαίνονται από 50% έως 80% (Πίνακας 20). Περαιτέρω ανάλυση στις 6 ομάδες γυναικών έδειξε πως ο γονότυπος GC εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στον

πλακούντα των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης είτε λαμβάνουν δίαιτα ή ινσουλίνη, στις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, και στο 50% των γυναικών με Προεκλαμψία. Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρείται στον πλακούντα των γυναικών με φυσιολογική κύηση, όπου το σύνολο των γυναικών με αυξημένο BMI εκφράζουν τον γονότυπο GC, ενώ το σύνολο των γυναικών με φυσιολογικό BMI φέρουν τον γονότυπο CC (Πίνακας 21). Οι παραπάνω διαφορές δεν φτάνουν σε στατιστική σημαντικότητα, λόγω του μικρού αριθμού του δείγματος.

Πίνακας 20: Ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων GG, GC και CC του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 στο μυ και στον πλακούντα, συνολικά και στις 4 ομάδες γυναικών της μελέτης

Πολυμορφισμός IL-6 -174 G/C		Ομάδα										P
		Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία		ΣΔ2		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη)		Φυσιολογική		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Στο μυ	CC	6	16,7	0	0,0	1	14,3	0	0,0	5	50,0	0,009++
	GC	1	2,8	0	0,0	0	0,0	1	9,1	0	0,0	
	GG	29	80,6	8	100,0	6	85,7	10	90,9	5	50,0	
Στον πλακούντα	CC	3	16,7	0	0,0	1	20,0	0	0,0	2	50,0	0,226++
	GC	12	66,7	2	50,0	4	80,0	4	80,0	2	50,0	
	GG	3	16,7	2	50,0	0	0,0	1	20,0	0	0,0	

Πίνακας 21: Ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων GG, GC και CC του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 στο μυ και στον πλακούντα, σε 6 ομάδες γυναικών

Πολυμορφισμός IL-6 -174 G/C		Ομάδα												P
		Προεκλαμψία		ΣΔ2		ΣΔΚ (Δίαιτα)		ΣΔΚ (Ινσουλίνη)		Φυσιολογική		φυσιολογική με αυξημένο BMI		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Στο μυ	CC	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	5	100,0	0	0,0	<0,001 ++
	GC	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	16,7	0	0,0	0	0,0	
	GG	8	100,0	6	85,7	5	100,0	5	83,3	0	0,0	5	100,0	
Στον πλακούντα	CC	0	0,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	0,117+ +
	GC	2	50,0	4	80,0	2	100,0	2	66,7	0	0,0	2	100,0	
	GG	2	50,0	0	0,0	0	0,0	1	33,3	0	0,0	0	0,0	

++Fisher's exact test ††Kruskal-Wallis test

10(Γ2). Συσχέτιση του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 (από το μυ) με τα χαρακτηριστικά των γυναικών της μελέτης.

Στον πίνακα 22 που ακολουθεί δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά καθώς και δεδομένα από το ιστορικό των γυναικών της μελέτης, σε σχέση με την παρουσία του γονοτύπου GG και CC του πολυμορφισμού -174 G/C της ιντερλευκίνης-6.

Οι γυναίκες με τον γονότυπο GG είχαν σημαντικά μεγαλύτερο βάρος και δείκτη μάζας σώματος τόσο πριν όσο και μετά την εγκυμοσύνη. Ωστόσο, η μεταβολή του σωματικού τους βάρους κατά τη διάρκεια της κύησης ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τις γυναίκες με τον γονότυπο CC. Οριακά στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων γυναικών καταγράφηκε και όσον αφορά στην ηλικία κύησης, η οποία δεν αξιολογείται ως κλινικά σημαντική.

Πίνακας 22: Συσχέτιση του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 με τα δημογραφικά και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των γυναικών

	Πολυμορφισμός				P
	CC		GG		Student's
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	t-test
Ηλικία	31,0	5,9	32,6	4,3	0,459
Βάρος πριν την εγκυμοσύνη	61,3	6,3	81,9	17,1	0,007
Βάρος μετά την εγκυμοσύνη	76,1	9,6	91,7	16,8	0,035
Διαφορά βάρους	14,8	4,3	9,9	3,7	0,008
Δείκτης μάζας σώματος προ εγκυμοσύνης	22,9	0,8	30,1	5,8	0,005
Δείκτης μάζας σώματος μετά την εγκυμοσύνη	28,4	2,2	33,7	5,6	0,029
Ηλικία πατέρα	40,5	8,3	44,5	7,4	0,346
Ηλικία αρχής εμμήνου ρύσεως	13,0	0,6	12,6	1,1	0,390

Χρονικό διάστημα από τελευταίο τοκετό	2,1	0,9	3,8	2,4	0,229
Ηλικία κύησης σε εβδομάδες	38,7	0,6	38,1	0,7	0,046

Στον πίνακα 23 παρατίθενται δεδομένα από το ατομικό και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό των γυναικών της μελέτης, συγκριτικά στις ομάδες με τον γονότυπο GG και CC.

Πίνακας 23: Συσχέτιση του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 με το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των γυναικών

		Πολυμορφισμός				P Fisher's exact test
		CC		GG		
		N	%	N	%	
Κάπνισμα	Όχι	4	66,7	14	48,3	0,658
	Ναι	2	33,3	15	51,7	
Χρόνια νοσήματα	Όχι	5	83,3	20	69,0	0,649
	Ναι	1	16,7	9	31,0	
Σακχαρώδης Διαβήτης	Όχι	5	83,3	8	27,6	0,017
	Ναι, Κύησης	0	0,0	14	48,3	
	Ναι, Τύπου 2	1	16,7	7	24,1	
Θυρεοειδοπάθειες	Όχι	6	100,0	19	65,5	0,152
	Ναι	0	0,0	10	34,5	
Λεύκωμα στα ούρα	Όχι	6	100,0	22	75,9	0,311
	Ναι	0	0,0	7	24,1	
Χρόνια υπέρταση μητέρας	Όχι	5	83,3	18	62,1	0,640
	Ναι	1	16,7	11	37,9	
Χρόνια υπέρταση πατέρα	Όχι	3	50,0	16	55,2	1,000
	Ναι	3	50,0	13	44,8	

Η παρουσία Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και Διαβήτη Τύπου 2 σχετίστηκε σημαντικά με το γονότυπο GG της IL-6, ενώ αντίστοιχα η απουσία Σακχαρώδη Διαβήτη σχετίστηκε με το γονότυπο CC. Δεν καταγράφηκε σημαντική συσχέτιση των γονοτύπων με το κάπνισμα, την ύπαρξη χρόνιων νοσημάτων, θυρεοειδοπάθειας, λευκώματος στα ούρα ή χρόνιας υπέρτασης της μητέρας ή του πατέρα.

Η παρουσία των γονοτύπων GG και CC της IL-6 αναλύθηκε και σε σχέση με το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη (Πίνακας 24). Δεν καταγράφηκε συσχέτιση των γονοτύπων με την ύπαρξη σταθερού κύκλου εμμήνου ρύσης, με τις αυτόματες αποβολές ή τεχνητές διακοπές της κύησης, ή με τη διενέργεια καισαρικής τομής.

Πίνακας 24: Συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών

		Πολυμορφισμός				P Fisher's exact test
		CC		GG		
		N	%	N	%	
Σταθερός έμμηνος κύκλος	Όχι	2	33,3	5	17,2	0,576
	Ναι	4	66,7	24	82,8	
Αυτόματες αποβολές	Όχι	5	83,3	25	86,2	1,000
	Ναι	1	16,7	4	13,8	
Τεχνητή διακοπή κύησης	Όχι	4	66,7	25	86,2	0,268
	Ναι	2	33,3	4	13,8	
Τρόπος τοκετού	Φυσιολογικός τοκετός	2	33,3	6	20,7	0,602
	Καισαρική τομή	4	66,7	23	79,3	

Στον πίνακα 25 δίνεται η συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τις εργαστηριακές εξετάσεις των γυναικών της μελέτης. Η μοναδική εξέταση που διέφερε σημαντικά ανάλογα με την παρουσία του γονότυπου GG ή CC ήταν η συστολική και διαστολική αρτηριακή υπέρταση. Οι υψηλές τιμές ΣΑΠ και ΔΑΠ σχετίστηκαν σημαντικά με την παρουσία του γονότυπου GG. Οι υπόλοιπες εργαστηριακές εξετάσεις δε διέφεραν σημαντικά στις 2 ομάδες γυναικών.

Πίνακας 25: Συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τις εργαστηριακές εξετάσεις των γυναικών της μελέτης

	Πολυμορφισμός				P Mann-Whitney test
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
CRP	1,11 (1,3)	0,5 (0,2 – 1,94)	3,63 (7,6)	1,2 (0,56 – 3,38)	0,105
GGT	15,4 (13,94)	7 (5 – 28)	11,11 (10,93)	7 (5 – 12)	0,840
HBA1C %	5,33 (0,73)	5,5 (5,5 – 5,6)	5,54 (0,66)	5,6 (5,1 – 5,9)	0,630
GLU	82,67 (21,58)	72,5 (69 – 109)	83,45 (19,68)	81 (76 – 89)	0,525
UA	5,02 (1,05)	5,15 (4,3 – 5,8)	4,64 (1,05)	4,6 (4,1 – 5,2)	0,325
LDH (αρχή κύησης)	217,5 (60,03)	200 (174 – 226)	206,03 (57,92)	200 (169 – 216)	0,630
LDH (τρίτο τρίμηνο)	246,4 (56,92)	226 (204 – 273)	206,03 (57,92)	200 (169 – 216)	0,098
Κρεατινίνη (αρχή κύησης)	0,63 (0,08)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,7 (0,19)	0,6 (0,6 – 0,8)	0,599
Κρεατινίνη (τρίτο τρίμηνο)	0,57 (0,12)	0,55 (0,5 – 0,7)	0,63 (0,2)	0,6 (0,55 – 0,7)	0,500
Ht	32,88 (4,47)	33,1 (29,3 – 35,9)	36,71 (7,49)	35,8 (34,2 – 37,6)	0,204
Hb	10,77 (1,93)	10,9 (9,5 – 12,3)	11,73 (1,3)	11,9 (11,1 – 12,4)	0,393
Αιμοπετάλια (αρχή κύησης)	194 (36,4)	190,5 (172 – 225)	217,55 (62,32)	190 (173 – 238)	0,511
Αιμοπετάλια (τρίτο τρίμηνο)	197,5 (49,4)	191 (172 – 243)	224,07 (55,15)	216 (185 – 266)	0,274
Λευκά αιμοσφαίρια	10,11 (3,2)	8,93 (8 – 12)	10,33 (2,04)	10,1 (8,8 – 12,04)	0,511

Πολυμορφοπύρηνα	72,43 (5,6)	73,5 (66,9 – 77,1)	75,54 (6,6)	74,4 (71,6 – 79,1)	0,274
Λεμφοκύτταρα	20,75 (4,55)	19,95 (17 – 25,9)	17,5 (5,84)	17,2 (14,5 – 20,9)	0,126
Μονοκύτταρα	5,75 (1,61)	5,15 (4,8 – 7,1)	6,16 (1,91)	6,3 (5,2 – 6,7)	0,540
Ηωσινόφιλα	0,63 (0,37)	0,7 (0,2 – 0,9)	0,64 (0,36)	0,6 (0,4 – 1)	0,913
INR	0,92 (0,08)	0,92 (0,9 – 0,96)	1,06 (0,63)	0,92 (0,91 – 0,99)	0,708
FIB	391,45 (2,62)	391,45 (389,6 – 393,3)	462,4 (104,69)	455 (390,1 – 506,85)	0,277
Arpt	26,6 (1,21)	26,3 (26 – 27,4)	31,02 (12,18)	27,85 (26,1 – 29,1)	0,248
Σ.Α.Π. (1^ο τρίμηνο)	107,5 (13,32)	105 (100 – 120)	128,97 (21,4)	120 (110 – 150)	0,025
Δ.Α.Π. (1^ο τρίμηνο)	64,17 (9,17)	65 (60 – 70)	77,07 (12,14)	75 (70 – 90)	0,026
Σ.Α.Π. (3^ο τρίμηνο)	114,17 (9,17)	115 (110 – 120)	129,38 (20,94)	120 (110 – 150)	0,129
Δ.Α.Π. (3^ο τρίμηνο)	69,17 (8,01)	70 (60 – 75)	75,72 (11,55)	70 (70 – 80)	0,239

Στη συνέχεια διενεργήθηκε ανάλυση της συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τις βιοχημικές εξετάσεις των γυναικών της μελέτης (Πίνακας 26). Με εξαίρεση τις τιμές Fe οι οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στις γυναίκες με το γονότυπο GG σε σχέση με αυτές με το γονότυπο CC, καμία άλλη βιοχημική εξέταση δε φάνηκε να συσχετίζεται με τον πολυμορφισμό της IL-6.

Πίνακας 26: Συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τις βιοχημικές εξετάσεις των γυναικών της μελέτης

	Πολυμορφισμός με περιοριστικό N				P Mann-Whitney test
	CC		GG		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
Ουρία	18 (3,59)	17,5 (16 – 22)	22,68 (9,72)	21,4 (16,4 – 27)	0,161
Κρεατινίνη	0,58 (0,1)	0,55 (0,5 – 0,7)	0,57 (0,17)	0,5 (0,5 – 0,6)	0,434
Ουρικό οξύ	5,02 (1,05)	5,15 (4,3 – 5,8)	4,63 (1,01)	4,6 (4,1 – 5,1)	0,312
K	4,2 (0,28)	4,2 (4 – 4,5)	4,33 (0,37)	4,3 (4,1 – 4,5)	0,537
Na	136,5 (2,66)	136,5 (135 – 137)	137,28 (2,7)	137 (136 – 139)	0,508
Ca	9,22 (0,54)	9,25 (8,9 – 9,5)	9,18 (0,7)	9,2 (8,9 – 9,6)	0,878
Ολική BIL	0,45 (0,13)	0,45 (0,32 – 0,6)	0,38 (0,17)	0,3 (0,3 – 0,4)	0,105
Άμεση BIL	0,18 (0,08)	0,18 (0,1 – 0,2)	0,15 (0,06)	0,12 (0,1 – 0,2)	0,383
SGOT	21,33 (7,34)	19,5 (16 – 29)	17,93 (8,91)	15 (13 – 21)	0,147
SGPT	11,17 (4,07)	10,5 (8 – 13)	19,34 (28,39)	12 (9 – 17)	0,380
γ-GT	13,67 (13,17)	6 (5 – 28)	10,24 (6,69)	8 (5 – 13)	0,808
ALP	157,67 (34,93)	158,5 (140 – 187)	128,34 (44,59)	121 (98 – 152)	0,101
Ολική πρωτεΐνη	5,98 (0,77)	5,8 (5,8 – 6,4)	6,16 (0,62)	6,3 (5,8 – 6,6)	0,482
Αλβουμίνη	3,4 (0,43)	3,3 (3,2 – 3,8)	3,4 (0,32)	3,5 (3,15 – 3,6)	0,927
LDH	243,5 (51,41)	227,5 (204 – 273)	208,59 (64,22)	201 (169 – 218)	0,069
CHOL	257,67 (31,95)	249,5 (238 – 283)	262,5 (40,05)	262 (247 – 279)	0,440
HDL	64,33 (14,5)	61,5 (56 – 71)	69,27 (19,77)	69 (59 – 75)	0,484
LDL	153,33 (39,84)	147,5 (132 – 163)	158,85 (42,28)	161,5 (123 – 184)	0,579
TG	314,83 (250,05)	240,5 (168 – 314)	255,27 (141,39)	217,5 (172 – 281)	0,754
Fe	43,5 (8,55)	41,5 (37 – 51)	81,31 (35,36)	76 (47 – 106)	0,006
Φερριτίνη	35,33 (37,14)	18,5 (16 – 41)	28,32 (19,46)	20 (15 – 41)	0,980
P	3,55 (0,24)	3,55 (3,4 – 3,7)	3,52 (0,69)	3,65 (3 – 3,8)	0,942
Mg	4,28 (6,23)	1,75 (1,7 – 2)	1,78 (0,15)	1,8 (1,7 – 1,9)	0,902
Αμυλάση Ορού	63,5 (17,48)	61 (54 – 69)	61,21 (20,52)	63 (45 – 68)	0,913

Η συσχέτιση των 2 γονοτύπων της IL-6 με τις εξετάσεις ούρων στις γυναίκες της μελέτης, δεν ανέδειξε καμία σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Συσχέτιση των 2 γονοτύπων της IL-6 με τις εξετάσεις ούρων στις γυναίκες της μελέτης

	Πολυμορφισμός				P Mann-Whitney test
	CC		GG		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
EB ΟΥΡΩΝ	1018,33 (10,44)	1021 (1008 – 1028)	1017,69 (6,87)	1018 (1013 – 1022)	0,693
PH ΟΥΡΩΝ	6,25 (0,52)	6,25 (6 – 6,5)	6,32 (0,88)	6 (5,5 – 7)	0,858
ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΥΡΩΝ	10,83 (12,01)	7,5 (0 – 20)	17,41 (32,56)	10 (0 – 10)	0,982
GLU ΟΥΡΩΝ	0 (0)	0 (0 – 0)	3,79 (12,93)	0 (0 – 0)	0,417
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΟΥΡΩΝ	0 (0,01)	0 (0 – 0)	0,08 (0,22)	0 (0 – 0,02)	0,512

Στη συνέχεια, η παρουσία των γονοτύπων GG και CC της IL-6 αναλύθηκε σε σχέση με δεδομένα υγείας των νεογνών (Πίνακας 28). Ο πολυμορφισμός της IL-6 δεν σχετίστηκε με το APGAR score, το βάρος γέννησης ή τα αέρια αίματος.

Πίνακας 28: Συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 αναλύθηκε σε σχέση με δεδομένα υγείας των νεογνών

	Πολυμορφισμός				P Student's t-test
	CC		GG		
	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
APGAR 1'	8,50	0,55	8,66	0,67	0,600
APGAR 5'	9,50	0,55	9,72	0,45	0,295
Βάρος γέννησης	3274,2	347,1	3057,0	432,6	0,258
Αέρια αίματος νεογνού (pH)	7,32	0,04	7,34	0,06	0,425

Στον πίνακα 29 καταγράφονται οι συσχετίσεις των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τα χαρακτηριστικά των νεογνών και της εγκυμοσύνης. Ο πολυμορφισμός της IL-6 δε σχετίστηκε με το φύλο των νεογνών, την ανάγκη για εισαγωγή στη μονάδα, το κακό περιγεννητικό αποτέλεσμα ή το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της κύησης.

Πίνακας 29: Συσχέτιση των γονοτύπων GG και CC της IL-6 με τα χαρακτηριστικά των νεογνών και της εγκυμοσύνης

		Πολυμορφισμός				P Fisher's exact test
		CC		GG		
		N	%	N	%	
Φύλο νεογνού	Αγόρια	3	50,0	11	37,9	0,456
	Κορίτσια	3	50,0	18	62,1	
Εισαγωγή στη μονάδα νεογνών	Όχι	6	100,0	26	89,7	1,000
	Ναι	0	0,0	3	10,3	
Κακό περιγεννητικό αποτέλεσμα	Όχι	6	100,0	24	82,8	0,561
	Ναι	0	0,0	5	17,2	
Κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης	Όχι	6	100,0	23	79,3	0,561
	Ναι	0	0,0	6	20,7	

10(Γ3). Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων του VEGF και VEGF-R

Η έκφραση των γονιδίων του VEGF και του υποδοχέα VEGF-R ποσοτικοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε στο μυϊκό ιστό των γυναικών, που ελήφθηκε κατά τη διάρκεια του τοκετού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιγράφονται στους Πίνακες 30 και 31.

Η έκφραση τόσο του γονιδίου VEGF όσο και του υποδοχέα VEGF-R διέφερε σημαντικά μεταξύ των 4 ομάδων της μελέτης (Πίνακας 30). Σύμφωνα με τη σύγκριση της έκφρασης του VEGF στις ομάδες γυναικών της μελέτης ανά ζεύγη, τα επίπεδα έκφρασης ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με τις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ($p=0,001$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ($p<0,001$), καθώς και με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση ($p<0,001$). Επιπλέον, οι γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 είχαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF σε σύγκριση με αυτές με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ($p=0,012$) και με φυσιολογική κύηση ($p=0,015$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF μεταξύ των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και εκείνων με φυσιολογική κύηση (Γράφημα 3).

Περαιτέρω σύγκριση ανάμεσα στις 6 ομάδες ασθενών της μελέτης έδειξε σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF στις γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με αυτές με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ($p=0,001$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης που έκαναν δίαιτα ($p=0,003$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης που έπαιρναν ινσουλίνη ($p=0,002$), καθώς και με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση ($p=0,003$) και με φυσιολογική κύηση και αυξημένο BMI ($p=0,003$) (Πίνακας 31, Γράφημα 4). Επιπρόσθετα, οι γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του VEGF σε σύγκριση με τις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης που έκαναν δίαιτα ($p=0,027$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης που έπαιρναν ινσουλίνη ($p=0,043$), καθώς και με αυτές με φυσιολογική κύηση ($p=0,012$). Η έκφραση του VEGF δεν είχε σημαντική διαφορά μεταξύ των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπό δίαιτα και υπό ινσουλίνη. Αντίθετα, οι γυναίκες με φυσιολογική κύηση και αυξημένο BMI είχαν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση VEGF

σε σύγκριση με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση που δεν ήταν παχύσαρκες (p=0,047).

Πίνακας 30. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF και VEGF-R στο μυϊκό ιστό, συνολικά και στις 4 ομάδες γυναικών της μελέτης.

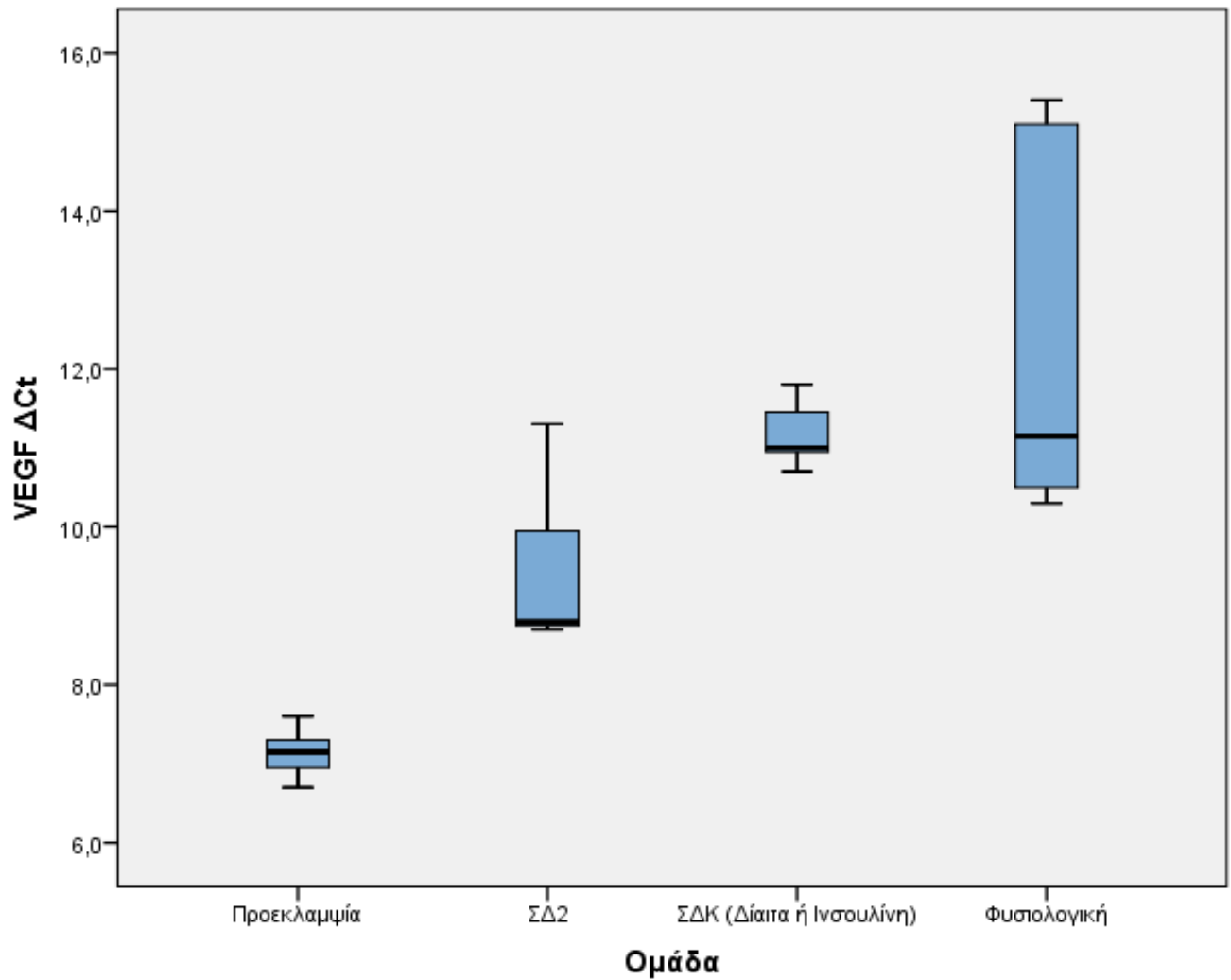
	Ομάδα										P
	Σύνολο δείγματος (N=36)		Προεκλαμψία		ΣΔ2		ΣΔΚ (Δίαιτα ή Ινσουλίνη)		Φυσιολογική		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
VEGF	10,2 (2,3)	10,7 (8,7 - 11,4)	7,1 (0,3)	7,2 (7 - 7,3)	9,5 (1,2)	8,8 (8,7 - 11)	11,2 (0,3)	11 (10,9 - 11,5)	12,2 (2,2)	11,2 (10,5 - 15,1)	<0,001##
VEGF-R	12,0 (2,2)	12,3 (11,3 - 13,6)	14,4 (0,4)	14,3 (14,1 - 14,9)	12,6 (1,2)	13,1 (11,3 - 13,4)	11,6 (0,4)	11,4 (11,3 - 12,1)	10,1 (2,7)	11,2 (6,5 - 12,3)	<0,001##

Πίνακας 31: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF και VEGF-R στο μυϊκό ιστό στις 6 ομάδες γυναικών της μελέτης.

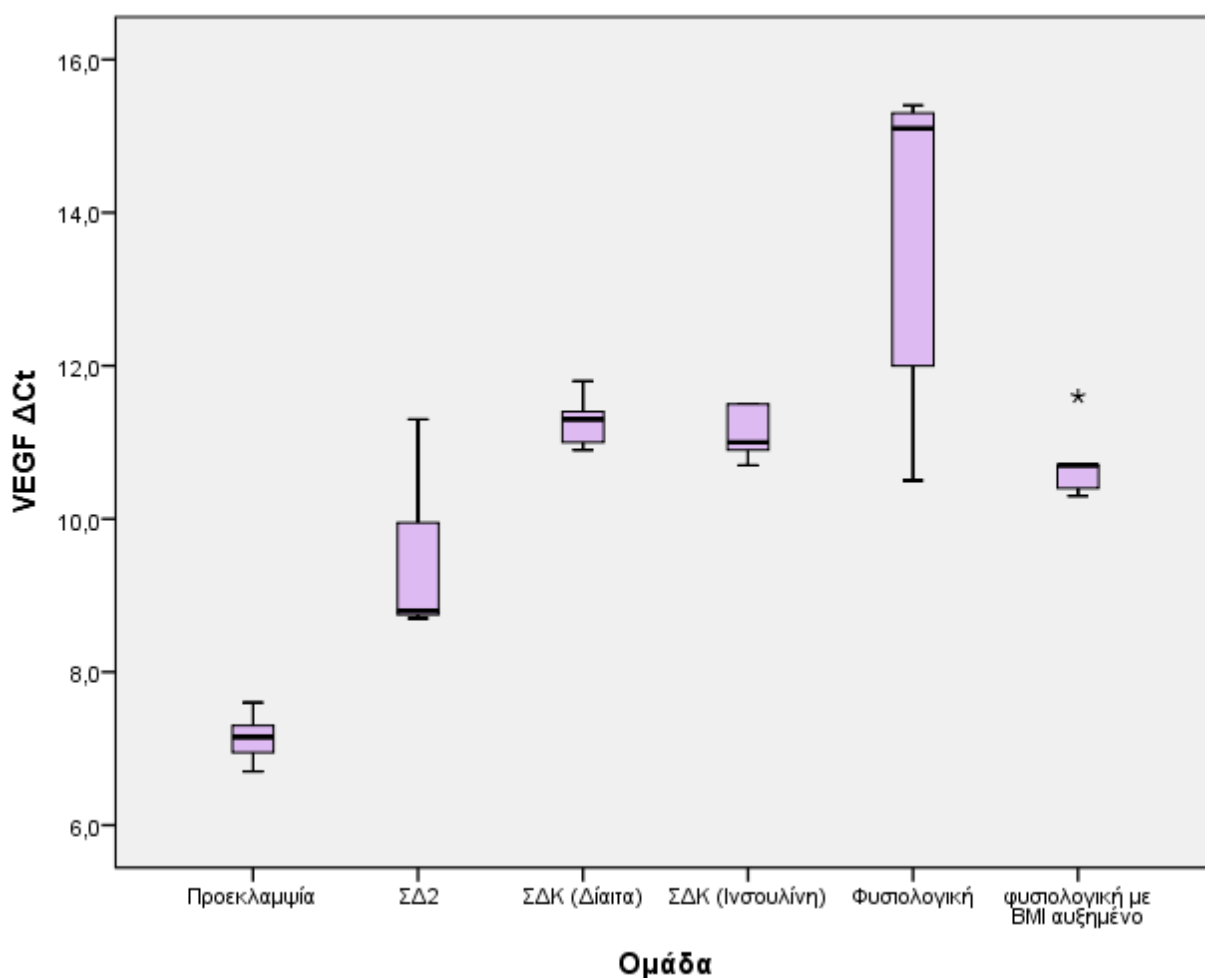
	Ομάδα												P
	Προεκλαμψία		ΣΔ2		ΣΔΚ (Δίαιτα)		ΣΔΚ (Ινσουλίνη)		Φυσιολογική		Φυσιολογική με αυξημένο BMI		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
VEGF	7,1 (0,3)	7,2 (7 - 7,3)	9,5 (1,2)	8,8 (8,7 - 11)	11,3 (0,4)	11,3 (11 - 11,4)	11,1 (0,3)	11 (10,9 - 11,5)	13,7 (2,3)	15,1 (12 - 15,3)	10,7 (0,5)	10,7 (10,4 - 10,7)	<0,001 ##
VEGF-R	14,4 (0,4)	14,3 (14,1 - 14,9)	12,6 (1,2)	13,1 (11,3 - 13,4)	11,4 (0,4)	11,3 (11,3 - 11,5)	11,8 (0,5)	11,7 (11,4 - 12,1)	8,3 (2,7)	6,5 (6,4 - 10,1)	11,9 (1,1)	12,3 (12,2 - 12,4)	<0,001 ##

++Fisher's exact test ##Kruskal-Wallis test

Γράφημα 3: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF στις 4 ομάδες γυναικών με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και φυσιολογική κύηση.



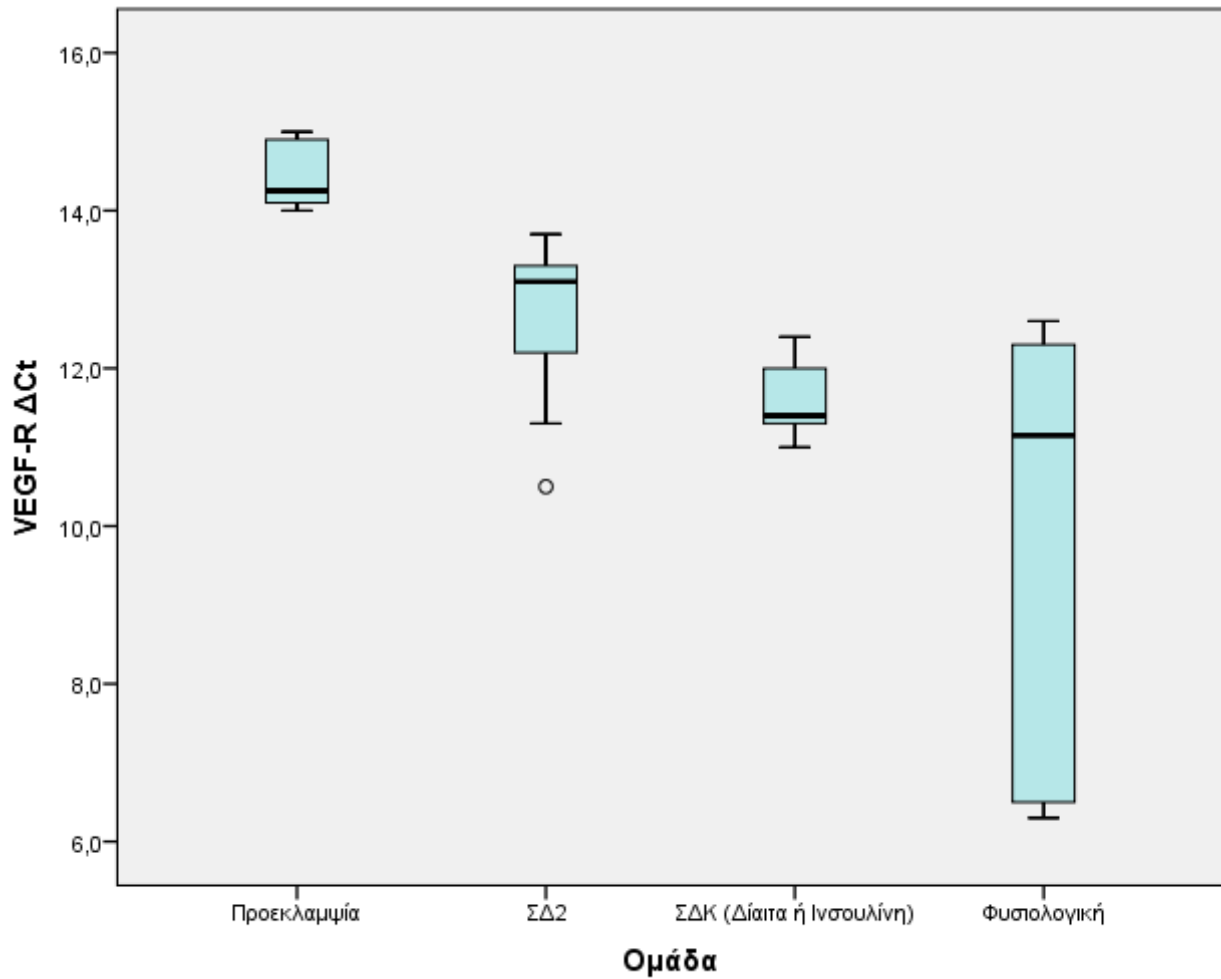
Γράφημα 4: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF στις 6 ομάδες γυναικών με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπό δίαιτα και υπό ινσουλίνη, και σε γυναίκες με φυσιολογική κύηση με ή χωρίς υψηλό BMI.



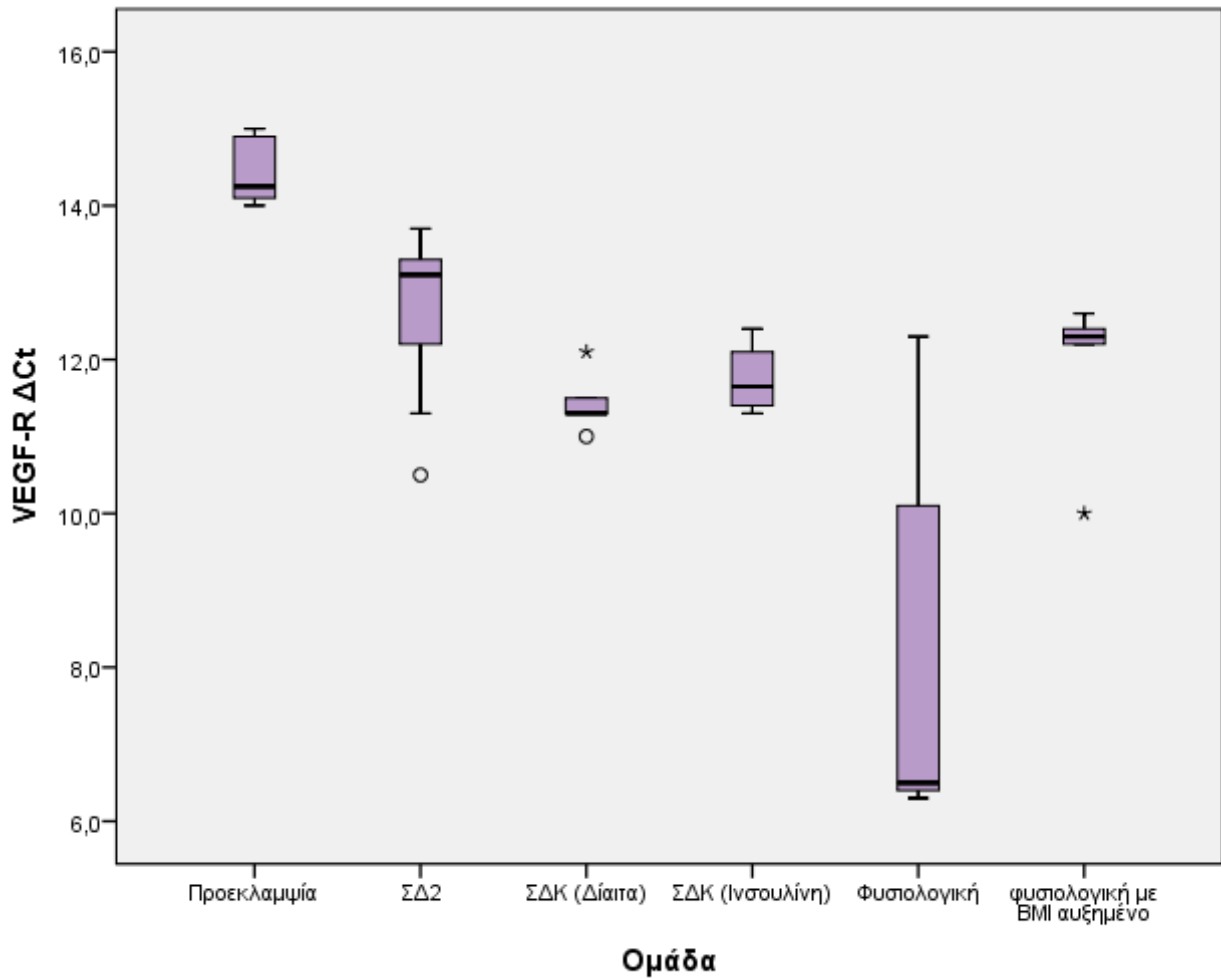
Όσον αφορά στην έκφραση του υποδοχέα VEGF-R, σημαντικά υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στις γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με τις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ($p=0,001$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ($p<0,001$), και με φυσιολογική κύηση ($p<0,001$). Επιπλέον, οι γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του VEGF-R σε σύγκριση με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση ($p=0,015$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF-R μεταξύ των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης και εκείνων με φυσιολογική κύηση (Πίνακας 30, Γράφημα 5).

Σύμφωνα με την ανάλυση στις 6 ομάδες των γυναικών της μελέτης, σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του VEGF-R καταγράφηκαν στις γυναίκες με Προεκλαμψία σε σύγκριση με τις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ($p=0,001$), με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπό δίαιτα ($p=0,003$) και υπό ινσουλίνη ($p=0,002$), καθώς και με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση και κανονικό BMI ($p=0,003$), αλλά και με φυσιολογική κύηση και αυξημένο BMI ($p=0,003$). Οι γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 είχαν σημαντικά υψηλότερη έκφραση του VEGF-R σε σχέση με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση ($p=0,012$). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση πως η έκφραση του VEGF-R είναι παρόμοια στις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπό δίαιτα και υπό ινσουλίνη. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης διαφέρουν δραματικά στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση σε σχέση με την παχυσαρκία, με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε αυτές με υψηλό BMI (Πίνακας 30, Γράφημα 6).

Γράφημα 5: Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του γονιδίου VEGF-R στις 4 ομάδες γυναικών με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και φυσιολογική κύηση.



Γράφημα 6: Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του γονιδίου VEGF-R στις 6 ομάδες γυναικών με Προεκλαμψία, Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπό διαίτα και υπό ινσουλίνη, και σε γυναίκες με φυσιολογική κύηση με ή χωρίς υψηλό BMI.



10(Γ4). Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων του VEGF και VEGF-R με τα χαρακτηριστικά των γυναικών της μελέτης

Η έκφραση των γονιδίων του VEGF και του υποδοχέα VEGF-R συσχετίστηκαν με τα δημογραφικά και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στην μελέτη, με στοιχεία από το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους, καθώς και με δεδομένα για τον τοκετό, για την ανάδειξη πιθανών σημαντικών συσχετίσεων.

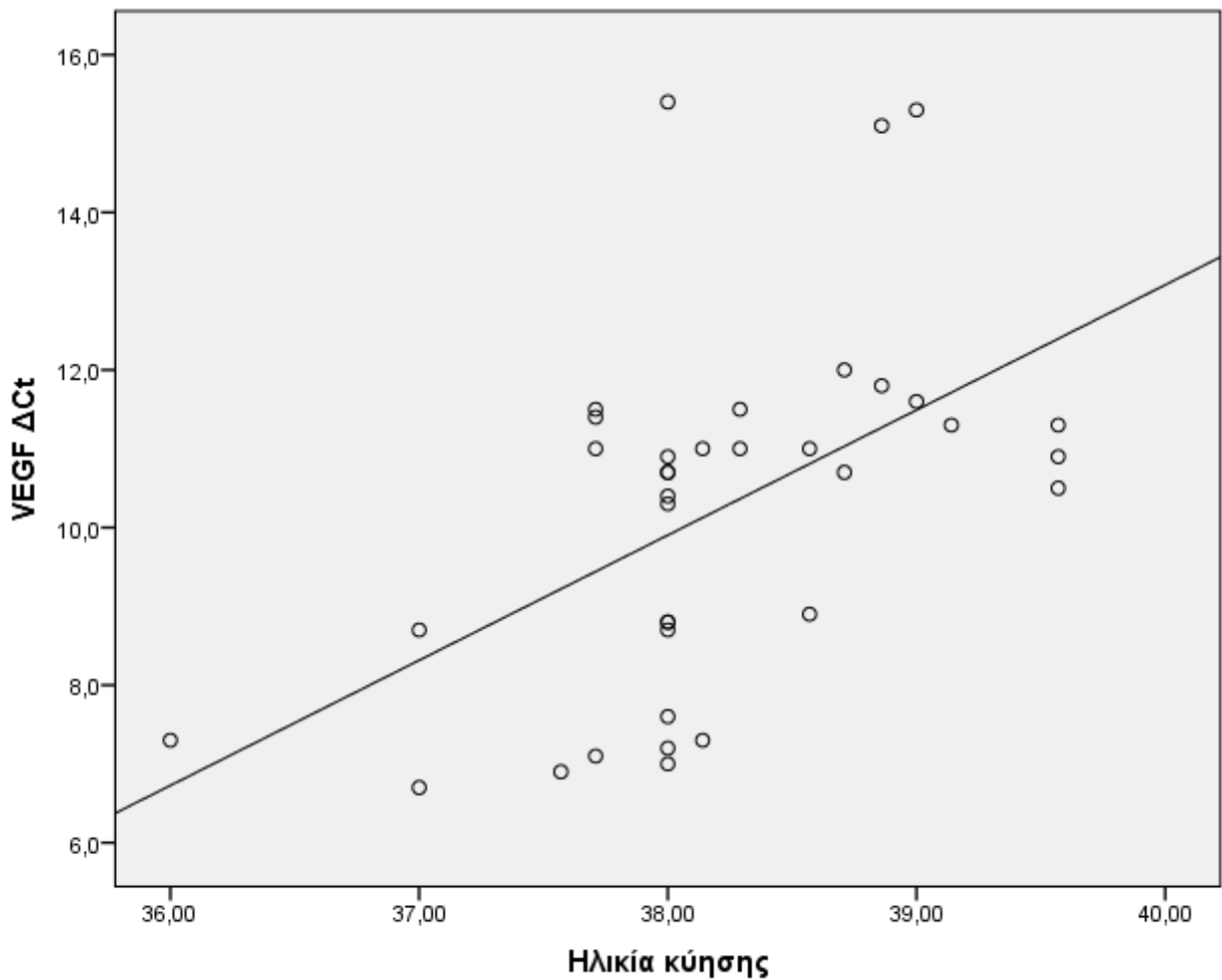
Όσον αφορά στα δημογραφικά και σωματομετρικά χαρακτηριστικά, τόσο η έκφραση του VEGF όσο και του υποδοχέα VEGF-R δε σχετίστηκαν με την ηλικία των γυναικών κατά την κύηση, την ηλικία εμμηναρχής, τον χρόνο από τον τελευταίο τοκετό ή την ηλικία του πατέρα. Ωστόσο, η έκφραση του VEGF σχετίστηκε αρνητικά με το βάρος των γυναικών πριν την εγκυμοσύνη, ενώ η έκφραση του VEGF-R σχετίστηκε θετικά με το βάρος των γυναικών πριν και μετά την εγκυμοσύνη, καθώς και με τη μεταβολή του βάρους κατά την κύηση. Έτσι φαίνεται πως το υψηλότερο βάρος πριν την εγκυμοσύνη σχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF και υψηλότερη έκφραση του VEGF-R. Επιπλέον το υψηλότερο βάρος μετά την κύηση σχετίστηκε με υψηλότερη έκφραση του VEGF-R, ενώ όσο λιγότερα κιλά πήραν οι γυναίκες κατά την εγκυμοσύνη τόσο υψηλότερη ήταν η έκφραση του VEGF-R. Επίσης, η μεγαλύτερη ηλικία κύησης σχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερη έκφραση του VEGF και σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF-R (Γραφήματα 7 και 8). Η έκφραση των γονιδίων δεν σχετίστηκε με το BMI των γυναικών πριν ή μετά την κύηση (Πίνακας 32).

Πίνακας 32: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με τα χαρακτηριστικά των γυναικών στο δείγμα της μελέτης.

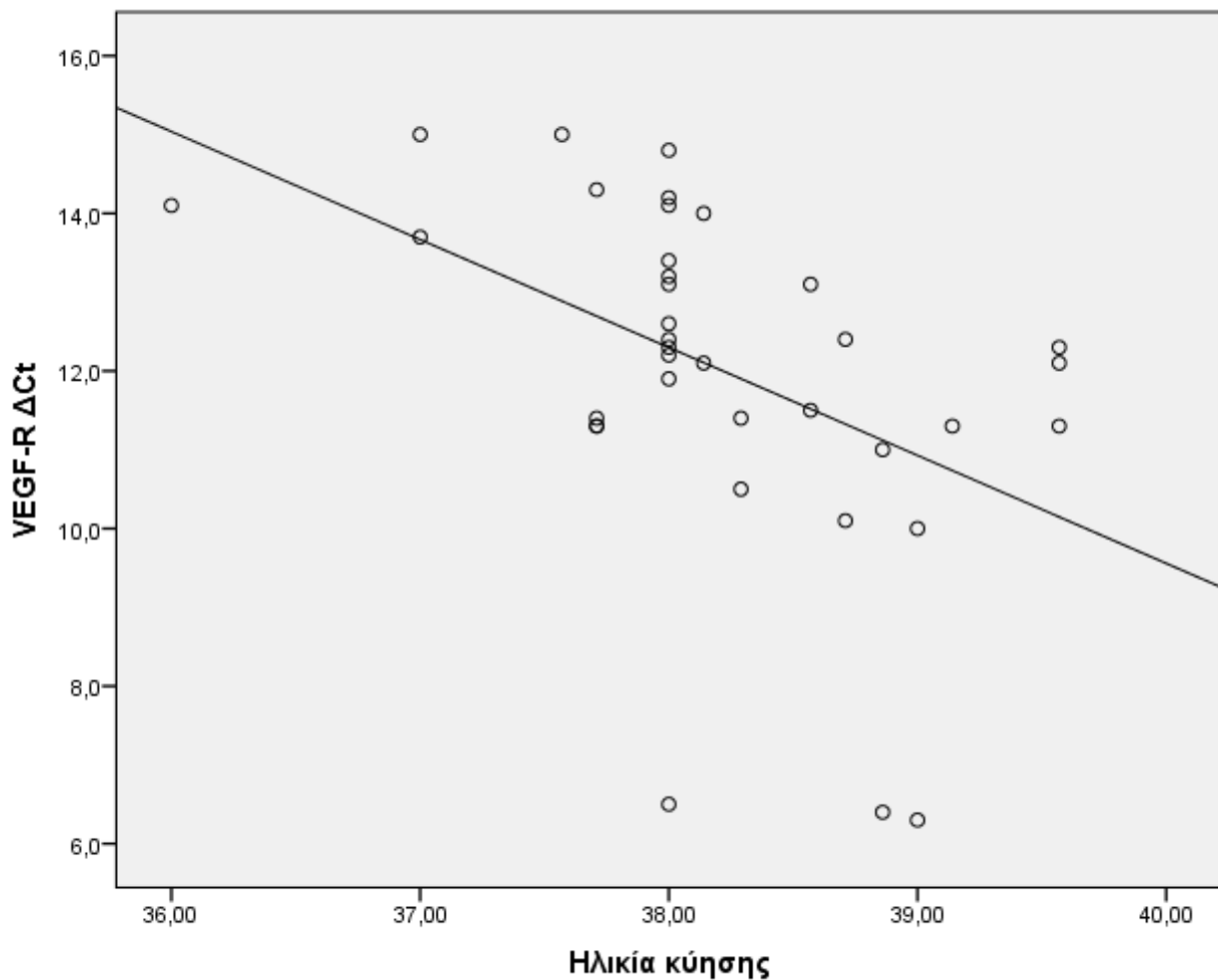
	VEGF		VEGF-R	
	rho	P	rho	P
Ηλικία μητέρας	-0,04	0,823	0,06	0,729
Βάρος πριν την εγκυμοσύνη	-0,36	0,029	0,41	0,012
Βάρος μετά την εγκυμοσύνη	-0,30	0,071	0,36	0,033

Διαφορά βάρους	0,32	0,056	-0,35	0,039
BMI πριν την εγκυμοσύνη	-0,25	0,136	0,31	0,070
BMI μετά την εγκυμοσύνη	-0,27	0,106	0,32	0,057
Ηλικία πατέρα	-0,17	0,410	0,15	0,473
Ηλικία αρχής εμμήνου ρύσεως	0,12	0,483	-0,15	0,378
Χρονικό διάστημα από τελευταίο τοκετό	-0,33	0,166	0,36	0,127
Ηλικία κύησης	0,54	0,001	-0,56	<0,001

Γράφημα 7: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF με την ηλικία κύησης στις γυναίκες στο δείγμα της μελέτης.



Γράφημα 8: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα του γονιδίου VEGF-R με την ηλικία κύησης στις γυναίκες στο δείγμα της μελέτης.



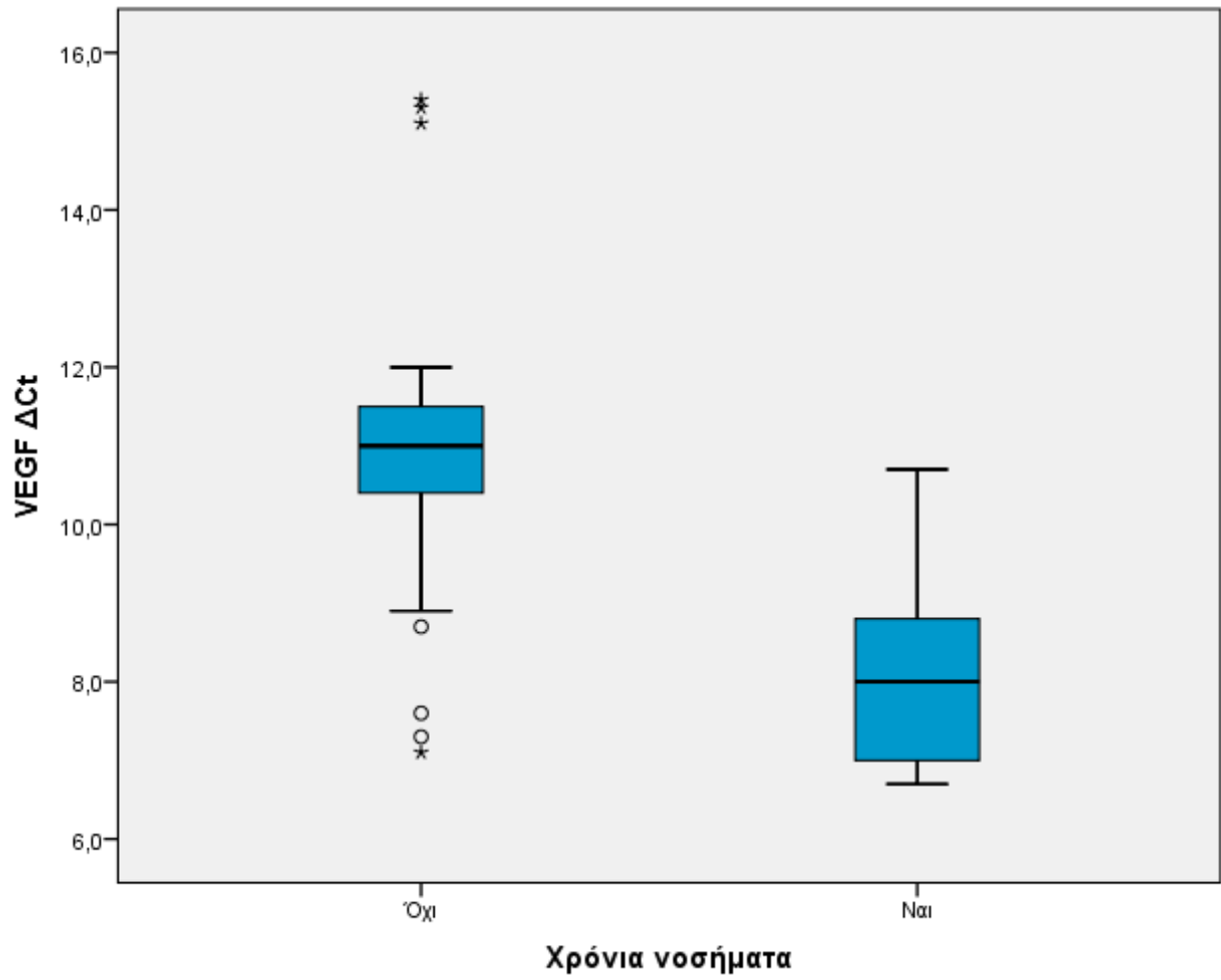
Στον Πίνακα 33, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις της έκφρασης των γονιδίων VEGF και VEGF-R με το κάπνισμα και τα χρόνια νοσήματα. Η έκφραση και των 2 γονιδίων σχετίστηκε με την παρουσία χρονίων νοσημάτων και με το λεύκωμα στα ούρα των γυναικών. Αναλυτικότερα, τόσο τα χρόνια νοσήματα όσο και οι υψηλές τιμές λευκώματος στα ούρα σχετίστηκαν με μειωμένη έκφραση του VEGF και αυξημένη έκφραση του VEGF-R (Γραφήματα 9 και 10). Η έκφραση των γονιδίων δε σχετίστηκε με το κάπνισμα, το Σακχαρώδη Διαβήτη, τη θυρεοειδοπάθεια, και τη χρόνια υπέρταση είτε της μητέρας είτε του πατέρα.

Πίνακας 33: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό στο δείγμα της μελέτης.

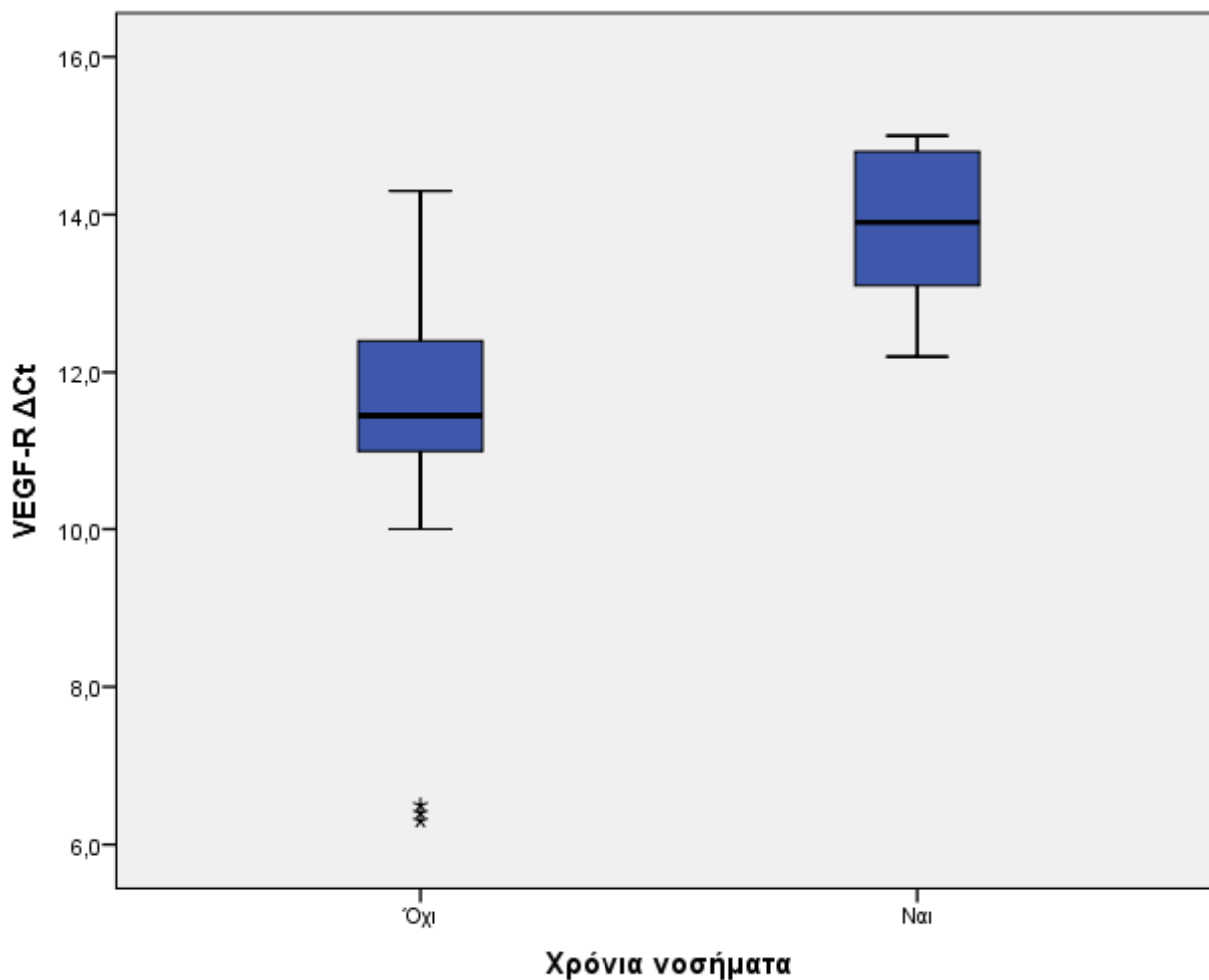
		VEGF		P Mann-Whitney test	VEGF-R		P Mann-Whitney test
		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
Κάπνισμα	Όχι	10,61 (2,7)	11 (8,7 – 11,3)	0,547	11,57 (2,72)	11,8 (11,3 – 13,7)	0,447
	Ναι	9,85 (1,77)	10,6 (8,8 – 11,4)		12,46 (1,4)	12,35 (11,4 – 13,4)	
Χρόνια νοσήματα	Όχι	10,99 (2,09)	11 (10,4 – 11,5)	<0,001	11,34 (2,13)	11,45 (11 – 12,4)	<0,001
	Ναι	8,26 (1,48)	8 (7 – 8,8)		13,78 (1,03)	13,9 (13,1 – 14,8)	
Σακχαρώδης Διαβήτης	Όχι	11,03 (2,92)	10,7 (10,3 – 12)	0,292+	11,1 (3,02)	12,3 (10 – 12,6)	0,418+
	Ναι, Κύησης	10,12 (1,85)	11 (7,6 – 11,4)		12,33 (1,32)	11,9 (11,3 – 14)	
	Ναι, Τύπου 2	9,14 (1,41)	8,8 (8,7 – 9,95)		12,91 (1,4)	13,15 (12,2 – 13,55)	
Θυρεοειδοπάθειες	Όχι	10,38 (2,45)	10,8 (8,7 – 11,4)	0,671	11,78 (2,41)	12,2 (11,3 – 13,4)	0,524
	Ναι	9,84 (1,84)	10,7 (8,7 – 11,3)		12,63 (1,33)	12,25 (11,4 – 13,7)	
Λεύκωμα στα ούρα	Όχι	10,98 (1,86)	11 (10,4 – 11,5)	<0,001	11,42 (2)	11,9 (11,3 – 12,4)	<0,001
	Ναι	7,11 (0,29)	7,1 (6,9 – 7,3)		14,5 (0,42)	14,3 (14,1 – 15)	
Χρόνια υπέρταση μητέρας	Όχι	10,18 (2,6)	10,7 (7,45 – 11,15)	0,401	11,98 (2,55)	12,3 (11,35 – 14,05)	0,460
	Ναι	10,33 (1,54)	10,95 (8,85 – 11,45)		12,08 (1,23)	11,75 (11,3 – 13,1)	
Χρόνια υπέρταση πατέρα	Όχι	10,25 (2,52)	10,7 (7,6 – 11,4)	0,937	12,04 (2,4)	12,2 (11,3 – 14,1)	0,692
	Ναι	10,21 (2,05)	10,7 (8,8 – 11,3)		11,99 (1,97)	12,3 (11,3 – 13,2)	

+Kruskal-Wallis test

Γράφημα 9: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF σε σχέση με την παρουσία χρόνιων νοσημάτων στις γυναίκες της μελέτης.



Γράφημα 10: Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του γονιδίου VEGF-R σε σχέση με την παρουσία χρόνιων νοσημάτων στις γυναίκες της μελέτης.

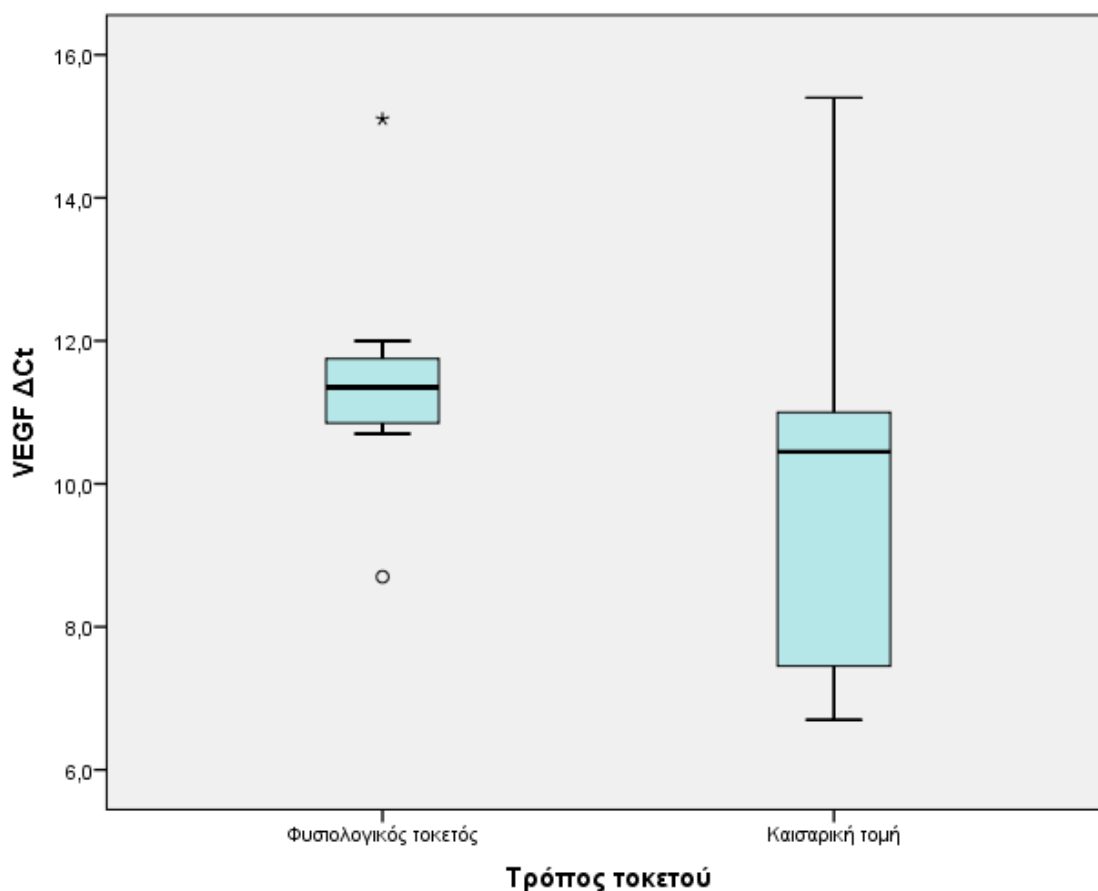


Η έκφραση των γονιδίων VEGF και VEGF-R ελέγχθηκε και σε σχέση με στοιχεία από το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών της μελέτης (Πίνακας 34). Κανένα από τα γονίδια δεν σχετίστηκε με την σταθερότητα του έμμηνου κύκλου των γυναικών. Η έκφραση και των 2 γονιδίων σχετίστηκε με την τεχνητή διακοπή της κύησης, με τις γυναίκες που είχαν κάνει τεχνητή διακοπή στο παρελθόν να έχουν αυξημένη έκφραση του VEGF και μειωμένη έκφραση του VEGF-R. Ωστόσο, δεν υπήρχε συσχέτιση με το αν οι γυναίκες είχαν κάνει αυτόματες αποβολές στο παρελθόν. Επιπλέον ο VEGF σχετίστηκε και με τον τρόπο τοκετού, με υψηλότερη έκφραση στις γυναίκες που γέννησαν με φυσιολογικό τοκετό, σε σύγκριση με τις γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή (Γράφημα 11).

Πίνακας 34: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με το γυναικολογικό ιστορικό των γυναικών της μελέτης.

		VEGF		P Mann-Whitney test	VEGF-R		P Mann-Whitney test
		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
Σταθερός έμμηνος κύκλος	Όχι	9,66 (2,76)	8,8 (7,3 – 10,5)	0,150	12,49 (2,83)	13,4 (12,3 – 14)	0,167
	Ναι	10,37 (2,19)	10,9 (8,8 – 11,4)		11,9 (2,04)	12,1 (11,3 – 13,1)	
Αυτόματες αποβολές	Όχι	10,34 (2,32)	10,7 (8,7 – 11,3)	0,749	11,91 (2,23)	12,2 (11,3 – 13,4)	0,552
	Ναι	9,58 (2,13)	8,8 (8,7 – 11,5)		12,66 (1,93)	13,1 (11,4 – 13,7)	
Τεχνητή διακοπή κύησης	Όχι	9,93 (2,22)	10,6 (7,6 – 11)	0,030	12,33 (2,06)	12,35 (11,4 – 14)	0,030
	Ναι	11,73 (2,16)	11,7 (10,9 – 12)		10,45 (2,28)	10,55 (10 – 11,9)	
Τρόπος τοκετού	Φυσιολογικός τοκετός	11,46 (1,77)	11,35 (10,85 – 11,75)	0,040	11,01 (2,07)	11,35 (10,7 – 12,2)	0,070
	Καισαρική τομή	9,88 (2,31)	10,45 (7,45 – 11)		12,3 (2,16)	12,4 (11,35 – 14,05)	

Γράφημα 11: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF σε σχέση με τον τρόπο τοκετού στις γυναίκες της μελέτης.



Στους Πίνακες 35 και 36, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων VEGF και VEGF-R με τα εργαστηριακά ευρήματα και τις βιοχημικές εξετάσεις στις γυναίκες της μελέτης. Υψηλότερες τιμές της πρωτεΐνης CRP σχετίστηκαν με σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF και υψηλότερη έκφραση του VEGF-R. Επίσης η υψηλή συστολική και διαστολική πίεση των γυναικών τόσο γενικά αλλά και της ΣΑΠ στο τρίτο τρίμηνο της κύησης σχετίστηκαν με σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF και υψηλότερη έκφραση του VEGF-R. Η έκφραση των 2 γονιδίων δε φάνηκε να σχετίζεται με τα άλλα εργαστηριακά ευρήματα. Από τις βιοχημικές εξετάσεις, το μόνο σημαντικό εύρημα ήταν για το μαγνήσιο, όπου οι υψηλές τιμές σχετίστηκαν με σημαντικά μειωμένη έκφραση του VEGF-R.

Όσον αφορά στις εξετάσεις ούρων των γυναικών, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των VEGF και VEGF-R με καμία από τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν (Πίνακας 37).

Πίνακας 35: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με τις εργαστηριακές μετρήσεις στις γυναίκες της μελέτης.

	VEGF		VEGF-R	
	rho	P	rho	P
CRP	-0,35	0,036	0,40	0,014
Ουρικό οξύ	-0,08	0,651	0,09	0,608
γ-GT	0,04	0,809	-0,09	0,611
LDH (αρχή εγκυμοσύνης)	-0,06	0,721	0,07	0,664
LDH (τρίτο τρίμηνο)	0,08	0,644	-0,06	0,732
Κρεατινίνη (αρχή εγκυμοσύνης)	-0,16	0,360	0,18	0,288
Κρεατινίνη (τρίτο τρίμηνο)	-0,21	0,210	0,25	0,139
Ht	0,10	0,578	-0,10	0,576
Hb	0,13	0,444	-0,13	0,448
INSULIN	-0,42	0,301	0,42	0,301
GLU	-0,09	0,600	0,08	0,643
HBA1C %	0,09	-0,11	0,527	0,09
Αιμοπετάλια	-0,06	0,734	0,11	0,539
Λευκά αιμοσφαίρια	-0,04	0,838	0,08	0,638
Πολυμορφοπύρρηνα	-0,08	0,643	0,14	0,400
Λεμφοκύτταρα	0,09	0,611	-0,14	0,428
Μονοκύτταρα	0,09	0,587	-0,16	0,351
Ηωσινόφιλα	0,05	0,792	-0,04	0,802
ΤΚΕ	-0,45	0,553	0,45	0,553
Σ.Α.Π (3^ο τρίμηνο)				
Σ.Α.Π (3 ^ο τρίμηνο)	-0,51	0,002	0,50	0,002
Δ.Α.Π. (3^ο τρίμηνο)				
Δ.Α.Π. (3 ^ο τρίμηνο)	-0,31	0,062	0,32	0,060
ΣΑΠ (1^ο τρίμηνο)				
ΣΑΠ (1 ^ο τρίμηνο)	-0,46	0,005	0,51	0,002
ΔΑΠ (1^ο τρίμηνο)				
ΔΑΠ (1 ^ο τρίμηνο)	-0,38	0,024	0,43	0,009

Πίνακας 36: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με τις βιοχημικές εξετάσεις στις γυναίκες της μελέτης.

	VEGF		VEGF-R	
	rho	P	rho	P
Ουρία	0,08	0,639	-0,08	0,634
Κρεατινίνη	0,04	0,809	-0,08	0,626
Ουρικό οξύ	-0,08	0,640	0,09	0,591
Ολική πρωτεΐνη	-0,01	0,962	-0,04	0,810
Αλβουμίνη	0,12	0,501	-0,15	0,401
Αμυλάση ορού	-0,14	0,428	0,12	0,472
Ολική BIL	0,29	0,091	-0,28	0,103
Άμεση BIL	-0,05	0,779	0,04	0,839
SGOT	0,21	0,224	-0,23	0,179
SGPT	0,14	0,403	-0,14	0,424
γ-GT	-0,04	0,838	-0,01	0,959
ALP	0,29	0,086	-0,30	0,075
Fe	-0,14	0,446	0,19	0,285
Φερριτίνη	0,20	0,266	-0,19	0,306
LDH	0,14	0,416	-0,12	0,478
CHOL	-0,32	0,069	0,32	0,069
HDL	0,09	0,609	-0,08	0,660
LDL	-0,10	0,587	0,12	0,511
TG	-0,06	0,733	-0,01	0,961
K	0,00	0,986	-0,03	0,852
Na	-0,06	0,738	0,10	0,577
P	-0,04	0,840	0,03	0,867
Mg	0,31	0,083	-0,36	0,041
Ca	0,03	0,882	-0,04	0,820

Πίνακας 37: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με τις εξετάσεις ούρων στις γυναίκες της μελέτης.

	VEGF		VEGF-R	
	rho	P	rho	P
ΕΒ ΟΥΡΩΝ	0,27	0,106	-0,26	0,120
ΡΗ ΟΥΡΩΝ	-0,25	0,143	0,21	0,216
ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΥΡΩΝ	-0,16	0,355	0,17	0,316
GLU ΟΥΡΩΝ	0,11	0,536	-0,07	0,696
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ ΟΥΡΩΝ	0,07	0,698	-0,10	0,545

Η έκφραση των γονιδίων VEGF και VEGF-R αξιολογήθηκε σε σχέση με επιλεγμένα χαρακτηριστικά των νεογνών, καθώς και σε σχέση με την εγκυμοσύνη. Η έκφραση και των 2 γονιδίων δεν σχετίστηκαν με χαρακτηριστικά των νεογνών όπως το Apgar score, το βάρος γέννησης ή τα αέρια αίματος, με εξαίρεση μία οριακά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-R με το υψηλό Apgar score 5' (Πίνακας 38). Το θήλυ φύλο όπως και η ανάγκη εισαγωγής σε μονάδα σχετίστηκαν με χαμηλή έκφραση του VEGF και υψηλή έκφραση του VEGF-R (Γραφήματα 12 και 13). Η έκφραση και των 2 γονιδίων δεν σχετίστηκε με το κακό περιγεννητικό αποτέλεσμα ή το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της κύησης (Πίνακας 39).

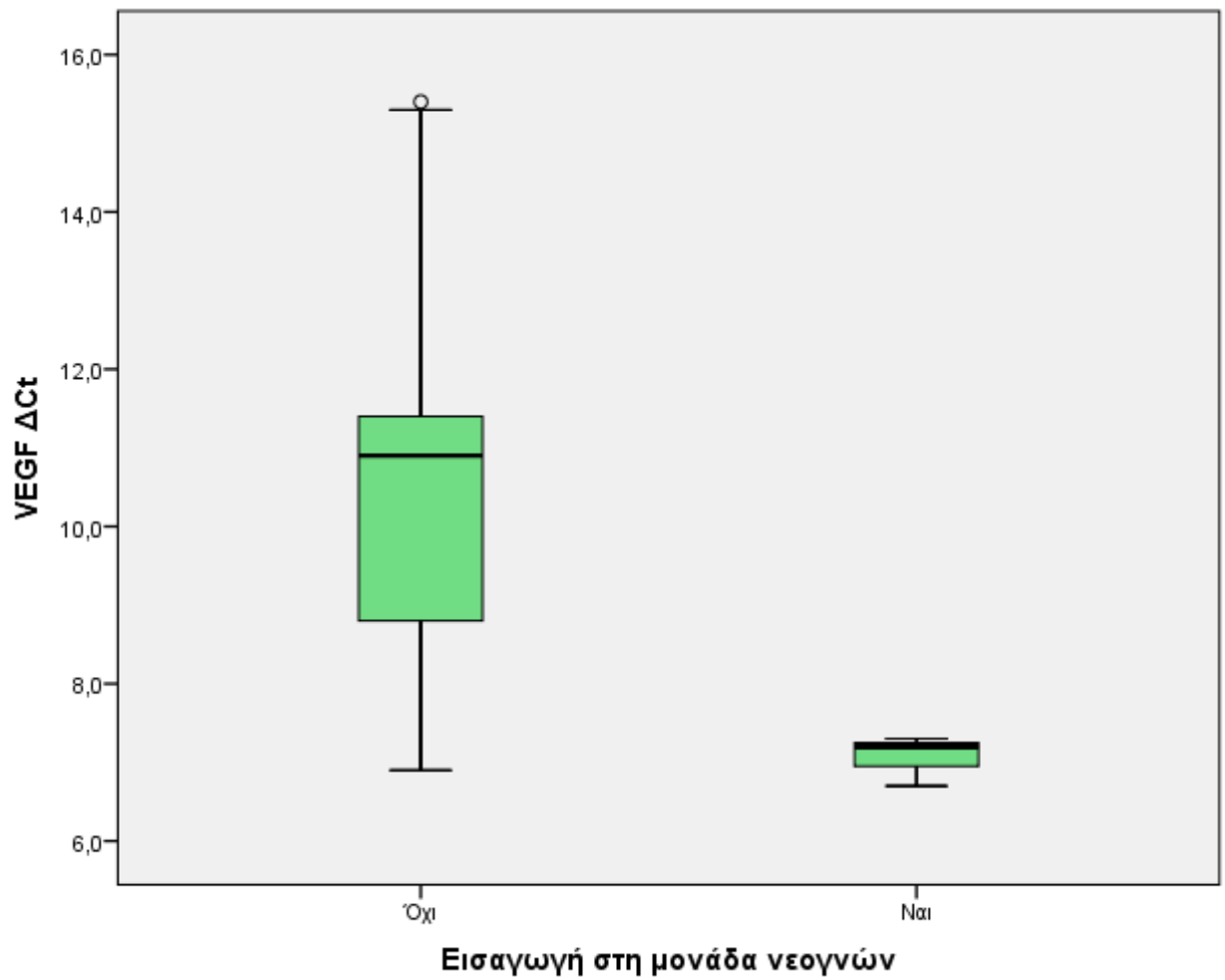
Πίνακας 38: Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R με χαρακτηριστικά των νεογνών.

	VEGF		VEGF-R	
	rho	P	rho	P
APGAR 1'	-0,05	0,782	0,13	0,451
APGAR 5'	-0,24	0,156	0,33	0,050
Βάρος γέννησης	0,24	0,159	-0,21	0,209
Αέρια αίματος νεογνού (pH)	0,14	0,432	-0,11	0,541

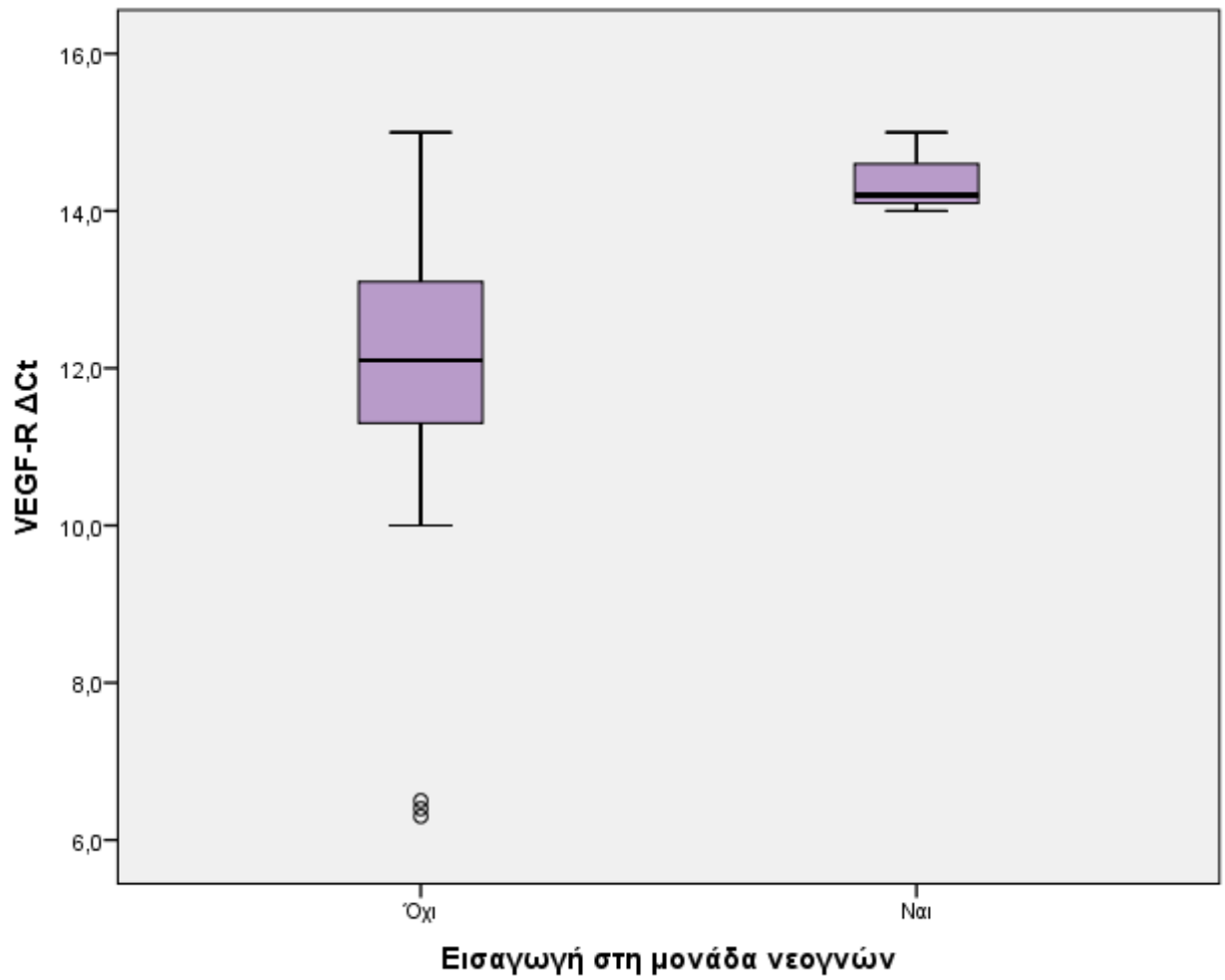
Πίνακας 39: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF και του υποδοχέα VEGF-R σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των νεογνών και της εγκυμοσύνης.

		VEGF		P Mann-Whitney test	VEGF-R		P Mann-Whitney test
		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)		Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
Φύλο νεογνού	Αγόρια	11,06 (1,49)	11 (10,5 – 11,5)	0,034	11,5 (1,6)	11,4 (11,3 – 12,4)	0,050
	Κορίτσια	9,64 (2,58)	8,9 (7,3 – 11)		12,39 (2,49)	13,1 (11,5 – 14,1)	
Εισαγωγή στη μονάδα νεογνών	Όχι	10,52 (2,16)	10,9 (8,8 – 11,4)	0,014	11,8 (2,14)	12,1 (11,3 – 13,1)	0,019
	Ναι	7,07 (0,32)	7,2 (6,7 – 7,3)		14,4 (0,53)	14,2 (14 – 15)	
Κακό περιγεννητικό αποτέλεσμα	Όχι	10,44 (2,21)	10,7 (8,8 – 11,3)	0,436	11,88 (2,18)	12,2 (11,3 – 13,2)	0,492
	Ναι	8,92 (2,55)	7,3 (7,2 – 11,6)		12,84 (2,2)	14 (11 – 14,2)	
Κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης	Όχι	10,34 (2,39)	10,9 (8,7 – 11,4)	0,459	11,89 (2,3)	12,1 (11,3 – 13,4)	0,548
	Ναι	9,79 (1,87)	10,7 (7,3 – 10,9)		12,56 (1,59)	12,4 (11,9 – 14)	

Γράφημα 12: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου VEGF σε σχέση με την εισαγωγή του νεογνού σε μονάδα.



Γράφημα 13: Επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα VEGF-R σε σχέση με την εισαγωγή του νεογνού σε μονάδα.



11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου επιπολασμού της παχυσαρκίας και της υπερβολικής αύξησης βάρους κατά την κύηση, οι γυναίκες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν επιπλοκές εγκυμοσύνης όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης της Κύησης, που μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης με τη μορφή της Προεκλαμψίας (161, 162). Οι επιπλοκές της εγκυμοσύνης χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νηστείας ινσουλίνης ορού. Εκτός από την αντίσταση στην ινσουλίνη, οι έγκυες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και Προεκλαμψία μοιράζονται ένα κοινό αιμοδυναμικό προφίλ, με υπερτροφία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς και μειωμένη διαστολική καρδιακή λειτουργία (163, 164). Αρκετές μελέτες σχετικά με το Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υποστηρίζουν ότι ένα προφλεγμονώδες ενδοθηλιακό περιβάλλον κυριαρχεί στις διαβητικές εγκυμοσύνες, με χαρακτηριστικά υψηλά επίπεδα των ενδοθηλιακών φλεγμονωδών δεικτών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι δείκτες της μητρικής φλεγμονής ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα στην προεκλαμψία (165, 166).

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι αλλαγές στο επιγονιδιωματικό τοπίο που εμπλέκεται στην παθογένεια του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (167), καθώς και ο μη θεραπευμένος Διαβήτης Κύησης, μπορούν να προκαλέσουν επιγενετικές τροποποιήσεις που διαμορφώνουν τη γονιδιακή ρύθμιση (168). Επιπλέον, θεωρείται ότι η επιγενετική αλλοίωση μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στη διαμεσολάβηση επιπλοκών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη όπως η Προεκλαμψία (150).

Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας περιλαμβάνει τόσο μητρικούς όσο και εμβρυϊκούς/πλακουντιακούς παράγοντες. Ανωμαλίες στην ανάπτυξη της αγγείωσης του πλακούντα νωρίς στην κύηση μπορεί να οδηγήσει σε πλακουντιακή υποξία και ισχαιμία, τα οποία οδηγούν στην απελευθέρωση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων εντός της μητρικής κυκλοφορίας που μεταβάλλουν τη μητρική συστηματική ενδοθηλιακή λειτουργία και προκαλούν υπέρταση και άλλες εκδηλώσεις της νόσου. Μια ποικιλία προ-αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, PlGF) και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (sFlt-1) δρουν στον αναπτυσσόμενο πλακούντα, και η μεταξύ τους ισορροπία είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική πλακουντιακή ανάπτυξη.

Σε ότι αφορά τις γενετικές μεταβολές στις επιπλεγμένες κυήσεις, περισσότεροι από 30 διαφορετικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του VEGF έχουν αναγνωρισθεί έως σήμερα, και από τα μέσα της δεκαετίας του 2000 πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αξιολογήσουν τη συσχέτισή τους με αυξημένο κίνδυνο και προδιάθεση για προεκλαμψία. Ταυτόχρονα, μελέτες προσπαθούν να προσδιορίσουν την έκφραση του VEGF τόσο στη συστηματική κυκλοφορία όσο και τοπικά στον πλακούντα σε γυναίκες με προεκλαμψία, προκειμένου να αποφασηθούν καλύτερα το ρόλο του στις επιπλοκές της κύησης. Επιπλέον, η ιντερλευκίνη-6 έχει ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή της σε διάφορες δυσμενείς καταστάσεις κατά την κύηση, και πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αποσαφηνίσουν το ρόλο των κυκλοφορούντων επιπέδων της αλλά και την παρουσία πολυμορφισμών του γονιδίου της στην προεκλαμψία, σε μία προσπάθεια να διεξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τον πιθανό ρόλο της ως προδιαθεσικό παράγοντα για εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που πραγματοποιείται στον ελληνικό πληθυσμό για την ανάλυση της έκφρασης του VEGF και του υποδοχέα του VEGF-R (με ποσοτική μέτρηση των παραγόντων), καθώς και της παρουσίας επιλεγμένων πολυμορφισμών της IL-6 σε γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και Προεκλαμψία, με σκοπό την αναζήτηση της πιθανής συσχέτισής τους με την εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση.

Το δείγμα της μελέτης μας αποτελείται από 36 γυναίκες που χωρίστηκαν σε 4 ομάδες (8 γυναίκες που εμφάνισαν Προεκλαμψία, 7 που έπασχαν από Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, 11 που παρουσίασαν Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης και 10 που δεν είχαν κάποιο πρόβλημα στην εγκυμοσύνη και αποτελούν την ομάδα ελέγχου).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης προκύπτουν τα παρακάτω ευρήματα: Η Προεκλαμψία σχετίζεται με χαμηλότερη ηλικία περάτωσης της κύησης και με υψηλότερο ποσοστό εισαγωγής στη μονάδα νεογνών, το οποίο αποδίδεται και στην προκαλούμενη ιατρογενή προωρότητα. Όπως είναι αναμενόμενο, η προεκλαμψία συνοδεύεται από υψηλότερη συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ) και διαστολική αρτηριακή πίεση (ΔΑΠ), και εμφάνιση λευκωματουρίας στις μητέρες, τα οποία αποτελούν και βασικά κριτήρια για τη διάγνωση. Αντίθετα, ο Σακχαρώδης Διαβήτης της Κύησης και ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 σχετίζονται με υψηλότερες τιμές HBA1C στις μητέρες, ενώ στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση

εμφανίζεται χαμηλότερη τιμή Hb (αιμοσφαιρίνη) σε σχέση με τις άλλες ομάδες (στην Προεκλαμψία η συνοδή ολιγουρία λόγω διαταραγμένης νεφρικής λειτουργίας, οδηγεί σε αιμοσυμπύκνωση και χαμηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης).

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του παράγοντα VEGF και του υποδοχέα του VEGF-R στις ομάδες των γυναικών οδηγεί στα παρακάτω ευρήματα: Σε συμφωνία με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, η έκφραση του VEGF και του VEGF-R είναι αντιστρόφως ανάλογη. Οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν πως σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στις κήσεις που έχουν επιπλεχθεί από Προεκλαμψία και Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, παρατηρείται χαμηλή έκφραση του VEGF και υψηλή έκφραση του υποδοχέα VEGF-R. Και η μελέτη μας υποστηρίζει πως η έκφραση του VEGF είναι πιο υψηλή ενώ του VEGF-R πιο χαμηλή κυρίως σε έγκυες με Προεκλαμψία αλλά και σε αυτές με Σακχαρώδη Διαβήτη, σε σχέση με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση. Να σημειωθεί ότι δεν ανευρίσκεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των γυναικών που αντιμετωπίζουν το διαβήτη κύησης με ινσουλίνη ή με δίαιτα. Τα ανωτέρω δεδομένα στηρίζουν τη θεωρία πως ο παράγοντας VEGF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη φυσιολογική αγγειογένεση στον πλακούντα, ενώ σε καταστάσεις υποξίας και υποαιμάτωσης, όπως στην Προεκλαμψία, μειώνεται η παραγωγή του και αυξάνονται αντιδραστικά τα επίπεδα του VEGF-R.

Τεράστια προκύπτει και επίδραση της παχυσαρκίας, με τις γυναίκες που δεν είναι παχύσαρκες να έχουν πολύ υψηλή έκφραση του παράγοντα VEGF και πολύ χαμηλή έκφραση του υποδοχέα του VEGF-R. Σημαντική αντίστοιχα διαφορά στην έκφραση των παραγόντων προκύπτει και από τη σύγκριση μεταξύ εγκύων με φυσιολογικό BMI και αυτών με υψηλό BMI, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του VEGF-R στις παχύσαρκες γυναίκες, όπου πλησιάζει τα επίπεδα του VEGF-R στις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη της Εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα πως η παχυσαρκία στην εγκυμοσύνη αποτελεί κατάσταση διαταραγμένης αγγειογένεσης και πως το γονιδιακό προφίλ της παχύσαρκης εγκύου παραπέμπει σε αυτό της διαβητικής εγκύου, δημιουργώντας υπόβαθρο για εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση της μελέτης μας πως η μεγαλύτερη ηλικία κύησης σε εβδομάδες σχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερη έκφραση του VEGF και σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF-R. Αν και η έκφραση και των δύο γονιδίων δε σχετίστηκε με κακό περιγεννητικό

αποτέλεσμα, καταγράφηκε συσχέτιση ανάμεσα στην ανάγκη εισαγωγής σε μονάδα νεογνών στις ασθενείς με χαμηλή έκφραση του VEGF και υψηλή έκφραση του VEGF-R.

Σε ό,τι αφορά τη συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων VEGF και VEGF-R με τα εργαστηριακά ευρήματα και τις βιοχημικές εξετάσεις στις γυναίκες της μελέτης, ενδιαφέροντα είναι τα εξής ευρήματα: Υψηλότερες τιμές της πρωτεΐνης CRP σχετίστηκαν με σημαντικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF και υψηλότερη έκφραση του VEGF-R, ενώ οι υψηλές τιμές του μαγνησίου σχετίστηκαν με σημαντικά μειωμένη έκφραση του VEGF-R. Τέλος, τόσο η συνύπαρξη χρόνιων νοσημάτων (αιμοσφαιρινοπάθεια, θρομβοφιλία, δυσλιπιδαιμία, άσθμα, αυτοάνοσα νοσήματα), όσο και οι υψηλές τιμές λευκώματος στα ούρα σχετίστηκαν με μειωμένη έκφραση του VEGF και αυξημένη έκφραση του VEGF-R στο υπό εξέταση δείγμα.

Ενδιαφέροντα ευρήματα προκύπτουν και από την ανάλυση για την παρουσία του πολυμορφισμού -174 G/C του γονιδίου της IL-6 στο δείγμα της μελέτης: Σε ό,τι αφορά στην παρουσία του πολυμορφισμού στο μυϊκό ιστό, ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο GG σε όλες τις ομάδες γυναικών, με εξαίρεση τις γυναίκες που έχουν φυσιολογική κύηση και φυσιολογικό BMI, οι οποίες εκφράζουν το γονότυπο CC σε ποσοστό 100%. Αυτό ενισχύει τη θεωρία ότι το αλλήλιο C πιθανώς λειτουργεί προστατευτικά, ενώ αντίθετα το αλλήλιο G (και κυρίως στην ομόζυγη μορφή του) σχετίζεται με εμφάνιση προβλημάτων στην κύηση.

Επιπρόσθετα, στον πλακούντα, η έκφραση του πολυμορφισμού είναι διαφορετική με τον γονότυπο GC να εμφανίζεται πιο συχνά σε όλες τις ομάδες γυναικών, εκτός από τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση και φυσιολογικό BMI οι οποίες εκφράζουν τον γονότυπο CC σε ποσοστό 100%. Η απουσία του «κακού» πολυμορφισμού της IL-6 από τον πλακούντα ακόμα και στις προεκλαμπτικές κυήσεις υποστηρίζει ότι η αγγειοπάθεια και η υποξία λαμβάνει χώρα στη μητρική επιφάνεια χωρίς να επηρεάζεται άμεσα το έμβρυο, αν και περισσότερες έρευνες πρέπει να πραγματοποιηθούν σε αυτή την κατεύθυνση.

Ο γονότυπος GG σχετίστηκε σημαντικά με μεγαλύτερο βάρος και BMI πριν και μετά την εγκυμοσύνη. Επίσης οι έγκυες που έφεραν τον γονότυπο GG πραγματοποίησαν τοκετό νωρίτερα, σε σχέση με αυτές που έφεραν τον γονότυπο CC. Επιπλέον, το

ποσοστό Διαβήτη Κύησης ήταν σημαντικά υψηλότερο στις συμμετέχουσες με τον GG γονότυπο, ενώ και η ΣΑΠ και η ΔΑΠ ήταν σημαντικά υψηλότερες.

Αξίζει να σημειωθεί πως η παχυσαρκία, ακόμα και σε γυναίκες που ολοκληρώνουν μια φυσιολογική κύηση, φαίνεται να σχετίζεται με ένα δυσμενές γονιδιακό προφίλ της IL-6 με αυξημένη συχνότητα του αλληλίου G, που απαντάται στις γυναίκες που εμφανίζουν προβλήματα στην κύηση, όπως διαπιστώσαμε και στη μελέτη μας.

Τα ανωτέρω ευρήματα είναι σε συμφωνία με τους Pacheco-Romero et al, 2021, που έδειξαν πως ο γονότυπος GG και το αλληλίο G φάνηκε να σχετίζονται με τον κίνδυνο για εμφάνιση Προεκλαμψίας. Επίσης, η μελέτη των Sowmya et al, 2015 έδειξε ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού με την Προεκλαμψία, και πρότειναν πως μπορεί να αποτελεί σημαντικό γενετικό ρυθμιστή στην αιτιολογία της πρόωρης Προεκλαμψίας. Η μετα-ανάλυση των Veisian et al, 2020 έδειξε έδειξε πως ο πολυμορφισμός ιντερλευκίνης-6 -174 G/C σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση Προεκλαμψίας στους Ασιάτες, αλλά όχι στους Καυκάσιους και στους μικτούς πληθυσμούς. Αυτή η παρατήρηση ενδεχομένως να αντικατοπτρίζει διαφορές στο γενετικό προφίλ των πληθυσμών. Εντούτοις, τα δεδομένα για τους Καυκάσιους είναι περιορισμένα για εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων. Επίσης, δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα για τον ελληνικό πληθυσμό, καθώς αυτή είναι η πρώτη μελέτη.

Όπως στις περισσότερες αντίστοιχες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε γυναίκες με επιπλοκές της εγκυμοσύνης, έτσι και η παρούσα μελέτη έχει ως κύριο περιορισμό το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μελέτη διεξήχθη σε ομοιογενή πληθυσμό ευρωπαϊκής καταγωγής, χαρακτηριστικό που αποτελεί βασικό πλεονέκτημα στις μελέτες γενετικής.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παράλληλη συλλογή και ανάλυση δειγμάτων από το μυ και το περιφερικό αίμα των εγκύων γυναικών, που μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών των επιπλοκών της κύησης. Επιπλέον, έγινε αναλυτική καταγραφή και διεξοδική ανάλυση με βάση πλήθος παραμέτρων που σχετίζονται τόσο με την υγεία της μητέρας και του νεογνού, όσο και με την πορεία και το αποτέλεσμα των κυήσεων, παρέχοντας ενδιαφέρουσες και χρήσιμες παρατηρήσεις με πιθανή μελλοντική κλινική χρησιμότητα. Ταυτόχρονα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή, τόσο στη συλλογή και φύλαξη των δειγμάτων, όσο και

στην επεξεργασία και ανάλυσή τους με εγκεκριμένες τεχνικές και αντιδραστήρια που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα των αποτελεσμάτων. Αναμφισβήτητα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερους πληθυσμούς για την αποσαφήνιση του ρόλου των VEGF και IL-6 ως προδιαθεσικών παραγόντων για πρόκληση επιπλοκών στην κύηση.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει πως ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας VEGF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη φυσιολογική πλακουντιακή ανάπτυξη, καθώς η έκφρασή του είναι μειωμένη, με ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα VEGF-R, στις επιπλεγμένες κυήσεις όπως στην Προεκλαμψία και στις κυήσεις με προϋπάρχοντα Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με το γεγονός πως και οι δύο καταστάσεις χαρακτηρίζονται από αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη και μοιράζονται κοινό αιμοδυναμικό προφίλ. Επιπλέον, ανάλογα ευρήματα παρατούνται στις έγκυες με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως το γονιδιακό προφίλ της παχύσαρκης εγύκου έχει κοινό υπόβαθρο με αυτό της διαβητικής.

Σε ό,τι αφορά την ανάλυση των πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης 6, προκύπτει ότι το αλληλίο G σχετίζεται με την εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση, είτε με τη μορφή Σακχαρώδη Διαβήτη είτε με τη μορφή Προεκλαμψίας. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως οι παχύσαρκες έγκυες φέρουν επίσης τον ίδιο πολυμορφισμό, υποστηρίζοντας την πιθανή συμβολή του στην προδιάθεση για την εμφάνιση προβλημάτων στην κύηση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνάδουν με τη θεωρία πως οι επιπλεγμένες κυήσεις χαρακτηρίζονται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, και από ένα φλεγμονώδες περιβάλλον με αποτέλεσμα την πρόκληση συστηματικής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας με πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις. Γονιδιακές τροποποιήσεις, είτε με την παρουσία κληρονομούμενων πολυμορφισμών είτε σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, καθώς και επιγενετικές μεταβολές που σχετίζονται με τις επιπλεγμένες κυήσεις, μπορεί να αποτελούν πιθανούς παράγοντες κινδύνου ή προδιαθετικούς παράγοντες για την εμφάνιση Προεκλαμψίας και διαταραχών της κύησης. Δεδομένου της σχετικά υψηλής επίπτωσης του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και της Προεκλαμψίας στο γενικό πληθυσμό και των ενδεχόμενων δυσμενών συνεπειών στην έκβαση της

κύησης, η αποσαφήνιση των υποκείμενων μηχανισμών και η ανάδειξη πιθανών βιοδεικτών για αυξημένο κίνδυνο και εμφάνιση διαταραχών της κύησης είναι βαρύνουσας σημασίας και χρήζει περαιτέρω έρευνας.

12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. American Diabetes A 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 -suppl 1: S62-S69
2. Task Force on Hypertension in Pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2013;122(5):1122-1131
3. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL etc 2013. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 170 (1): 1-7
4. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. National Institute of Child H, Human Development Maternal – Fetal Medicine Units N. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol* 2003; 27(3):239-246
5. Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS 2011. Epidemiology of preeclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best practice and research. Clin Obstet Gynaecol* 25(4):391-403
6. Holmes VA, Young IS, Patterson CC et al 2011. Optimal glycemic control, preeclampsia and gestational hypertension in women with type 1 diabetes in the diabetes and preeclampsia intervention trial. *Diabetes Care* 34(8):1683-1688
7. Innes KE, Wimsatt JH, McDuffie R 2001. Relative glucose tolerance and subsequent development of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 97(6):905-910
8. Joffie GM, Esterlitz JR, Levine RJ et al 1998. The relationship between abnormal glucose tolerance and hypertensive disorders of pregnancy in healthy nulliparous women. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 179(4):1032-1037
9. Savvidou MD, Geerts L, Nicolaides KH 2002. Impaired vascular reactivity in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 186(1):84-88

10. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL 1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180 (2 Pt1): 499-506
11. Benirschke K, Kaufman P, Baergen RN. *The Pathology of the Human Placenta*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2006
12. Hiden U. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J Anat* 2009; 215: 60-68
13. Desoye G, Shafrir E. The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes Rev* 1996; 4: 70-89
14. Madazli R. The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondi-aldehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls. *Gynecol Obstet Invest*. 2008; 65(4): 227-232
15. Osmond DT. Placental glucose transport and utilization is altered at term in insulin-treated, gestational-diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44(1): 1133-1139
16. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2019; 133:e1-e25
17. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 2002;287:3183
18. Vascular endothelial factor gene polymorphism in preeclampsia, [clinicaltrials.gov identifier:nct03500588](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/nct03500588), March 26 2021
19. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia:an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:499
20. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens* 1991;4:700
21. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368

22. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4
23. Moore-Maxwell CA, Robboy SJ. Placental site trophoblastic tumor arising from antecedent molar pregnancy. *Gynecol Oncol* 2004;92:708
24. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111:649
25. Zhou Y, McMaster M, Woo K, 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. *Am J Pathol* 2002;160:1405
26. Vuorela P, Helske S, Hornig C, et al. Amniotic fluid--soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 95:353
27. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2348
28. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1541
29. McKeeman GC, Ardill JE, Caldwell CM, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1240
30. Eremina V, Sood M, Haigh J, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111:707
31. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350:672
32. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5555

33. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004; 95:884.
34. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, et al. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:177
35. Tjoa ML, van Vugt JM, Mulders MA, et al. Plasma placenta growth factor levels in midtrimester pregnancies. *Obstet Gynecol* 2001; 98:600
36. Su YN, Lee CN, Cheng WF, et al. Decreased maternal serum placenta growth factor in early second trimester and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001; 97:898
37. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, et al. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1267
38. Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, et al. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 101:1266
39. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:770
40. Kim MY, Buyon JP, Guerra MM, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: results of the PROMISSE study. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214:108.e1
41. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation* 2012; 125:911
42. Moore AG, Young H, Keller JM, et al. Angiogenic biomarkers for prediction of maternal and neonatal complications in suspected preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:2651
43. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. Plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors have prognostic value in women presenting with suspected preeclampsia to the obstetrical triage area: a prospective study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27:132

44. March MI, Geahchan C, Wenger J, et al. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Adverse Outcomes among Haitian Women with Preeclampsia. *PLoS One* 2015; 10:e0126815
45. Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, et al. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:428.e1
46. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation* 2011; 124:940
47. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:1451
48. Rana S, Rajakumar A, Geahchan C, et al. Ouabain inhibits placental sFlt1 production by repressing HSP27-dependent HIF-1 α pathway. *FASEB J* 2014; 28:4324
49. Thadhani R, Hagmann H, Schaarschmidt W, et al. Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 by Dextran Sulfate Apheresis in Preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27:903
50. Matin M, Mörgelin M, Stetefeld J, et al. Affinity-Enhanced Multimeric VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and PlGF (Placental Growth Factor) Variants for Specific Adsorption of sFlt-1 to Restore Angiogenic Balance in Preeclampsia. *Hypertension* 2020; 76:1176
51. Rolnik DL, Wright D, Poon LCY, et al. ASPRE trial: performance of screening for preterm preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50:492
52. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000; 12:1232–35
53. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, Maltezos E. 2004. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10:321–24
54. Kim YJ, Park BH, Park H, Jung S-C, Pang M-G, Ryu H-M, Lee K-S, Eom S-M, Park H-Y. No association of the genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide

- synthase, dimethylarginine dimethylaminohydrolase, and vascular endothelial growth factor with preeclampsia in Korean populations. *Twin Res Hum Genet.* 2008; 11:77–83
55. Garza - Veloz I, Castruita - De la Rosa C, Cortes - Flores R, Martinez - Gaytan V, Rivera - Muñoz JE, Garcia - Mayorga EA, Meza - Lamas E, Rojas - Martinez A, Ortiz-Lopez R, Martinez - Fierro ML. No association between polymorphisms / haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011; 11(1):35
56. Silva VR, Soardi FC, Tanaka SC, Da Silva-Grecco RL, Paschoini MC, Balarin MAS. Investigation of polymorphisms in preeclampsia related genes VEGF and IL1A. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 291:1029–35
57. Amosco MD, Villar VAM, Naniong JMA, David-Bustamante LMG, Jose PA, Palmes-Saloma CP. VEGF-A and VEGFR1 SNPs associate with preeclampsia in a Philippine population. *Clin Exp Hypertens.* 2016;38(7):578-585
58. Ilona Bányász, Géza Bokodi, Barna Vásárhelyi, András Treszl, László Derzbach, András Szabó, Tivadar Tulassay, Adám Vannay. Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications. *Eur Cytokine Netw,* 2006 Dec;17(4):266-70
59. Salimi S, Yaghmaei M, Tabatabaei E, Mokhtari M, Naghavi A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – 634G/C polymorphism was associated with severe preeclampsia and lower serum VEGF level. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015; 41:1877–83
60. Sandrim VC, Palei ACT, Cavalli RC, Araújo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with preeclampsia but not with gestational hypertension. *Mol Hum Reprod.* 2009 Feb;15(2):115-20
61. Song GG, Kim JH, Lee YH. Associations between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia susceptibility: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2013; 42:749–62
62. Cheng DY, Hao YW, Zhou WL, Ma Y, Szecsi PB. Vascular endothelial growth factor +936C/T, –634G/C, –2578C/A, and –1154G/A polymorphisms with risk of preeclampsia: a metaanalysis. *PLoS One.* 2013; 8:e78173

63. Wang X, Sun T, Chen G, Gao H. Association between Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Preeclampsia Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Immunol Invest*. 2020 Feb;49(1-2):120-133
64. Duan W, Xia C, Wang K, Duan Y, Cheng P, Xiong B. A meta-analysis of the vascular endothelial growth factor polymorphisms associated with the risk of preeclampsia. *Biosci Rep*. 2020 May 29;40(5):BSR20190209
65. Hu YF, Luscher B, Admon A, Mermod N, Tjian R. Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev*. 1990; 4:1741–52
66. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37:443–48
67. Jae-Yoon Shim, Jong Kwan Jun, Bok-Kyung Jung, Sung Hoon Kim, Hye-Sung Won, Pil Ryang Lee, Ahm Kim. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Sep;197(3):271.e1-4
68. Chen BL, Wang YY, Li GR, Song HC, Zuo JL. 2011. Analysis on gene polymorphism of vascular endothelial growth factor and susceptibility of severe preeclampsia. *Maternal Child Health Care China*. 2011; 26:5052–55
69. Hamid HM, Abdalla SE, Sidig M, Adam I, Hamdan HZ. Association of VEGFA and IL1 β gene polymorphisms with preeclampsia in Sudanese women. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Mar;8(3):e1119
70. Cunha VM, Grecco RL, Paschoini MC, Silva SRD, Ruiz MT, Balarin MAS. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in pre-eclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011; 33:158–63
71. Andraweera PH, Dekker GA, Dissanayake VH, et al. Vascular endothelial growth factor family gene polymorphisms in preeclampsia in Sinhalese women in Sri-Lanka. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:532–536
72. Pacheco-Romero J, Acosta O, Huerta D, Cabrera S, Vargas M, Mascaro P, Huamán M, Sandoval J, López R, Mateus J, Gil E, Guevara E, Butrica N, Catari

- D, Bellido D, Custodio G, Naranjo A. Genetic markers for preeclampsia in Peruvian women. *Colomb Med (Cali)*. 2021; 52(1):e2014437
73. Chedraui P, Solis EJ, Bocci G, Gopal S, Russo E, Escobar GS, Hidalgo L, Pérez-López FR, Genazzani AR, Mannella P, Simoncini T. Feto-placental nitric oxide, asymmetric dimethylarginine and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and VEGF gene polymorphisms in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013 Feb;26(3):226-32
74. Gannoun MBA, Al-Madhi SA, Zitouni H, Raguema N, Meddeb S, Ali FHB, Mahjoub T, Almawi WY. Vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and haplotypes in preeclampsia: A case-control study. *Cytokine*. 2017 Sep;97:175-180
75. Keshavarzi F, Shahrakipoor M, Teimoori B, Yaghmaei M, Narooei-Nejad M, Rasooli A, Salimi S. Association of the placental VEGF promoter polymorphisms and VEGF mRNA expression with preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2019;41(3):274-279
76. Keshavarzi F, Mohammadpour-Gharehbagh A, Shahrakipoor M, Teimoori B, Yazdi A, Yaghmaei M, Narooei-Nejad M, Salimi S. The placental vascular endothelial growth factor polymorphisms and preeclampsia/preeclampsia severity. *Clin Exp Hypertens*. 2017; 39(7):606-611
77. Atis A, Oruc O, Aydin Y, Cetincelik U, Goker N. Vascular endothelial growth factor gene +813CC polymorphism of foetus is associated with preterm labour but not with preeclampsia in Turkish pregnant women. *Int J Immunogenet*. 2012 Jun;39(3):241-6
78. Chen XZ, Yu SJ, Wei MH, Li CY, Yan WR. Effects of maternal and fetal vascular endothelial growth factor a single nucleotide polymorphisms on preeclampsia: A hybrid design study. *Cytokine*. 2020 Mar;127:154995
79. Procopciuc LM, Caracostea G, Zaharie G, Stamatian F. Maternal/newborn VEGF-C936T interaction and its influence on the risk, severity and prognosis of preeclampsia, as well as on the maternal angiogenic profile. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Nov;27(17):1754-60

80. Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, Kolios G. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 May;22(5):371-8
81. Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis D F, Wang Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 2005; 26:210-217
82. Gu Y, Lewis D F, Wang Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:260-266
83. Ong S, Lash G, Baker PN. Baillieres. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Best prct Res Clin Onstes Gynecol* 2000; 14:969-980
84. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension.* 2000;36:965–969
85. Celik H, Avci B, Isik Y. Vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in normal pregnant women and pregnant women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol.* 2013;33:355–358
86. Masoura S, Kalogiannidis I, Makedou K, Theodoridis T, Koiou K, Gerou S, Athanasiadis A, Agorastos T. Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;175:119–123
87. Tang Y, Ye W, Liu X, Lv Y, Yao C, Wei J. VEGF and sFLT-1 in serum of PIH patients and effects on the foetus. *Exp Ther Med* 2019;17:2123-2128
88. Cheng M, He P, Fu J. The relationship between circulating tissue transglutaminase, soluble fms-like tyrosine kinase-1, soluble endoglin and vascular endothelial growth factor in preeclampsia. *J Hum Hypertens* 2016; 30:788-793
89. Fan X, Rai A, Kambham N, Sung J, Singh N, Petitt M, Dhal S, Agrawal R, Sutton R, Druzin M, Gambhir S, Ambati B, Cross J, Nayak N. Endometrial VEGF induces

- placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *J Clin Invest* 2014; 124:4941-4952
90. Bates D. An unexpected tail of VEGF and PlGF in preeclampsia. *Biochem Soc Trans* 2011 Dec;3. 9(6):1576-82
91. Sahay AS, Jadhav AT, Sundrani DP, Wagh GN, Mehendale SS, Chavan-Gautam P, Joshi SR. VEGF and VEGFR1 levels in different regions of the normal and preeclampsia placentae. *Mol Cell Biochem* 2018; 438:141-152
92. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the Placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta* 2003; 24: S21-7
93. Vargas-Rojas M, Solleiro-Villavicencio E, Soto-Vega E. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(10):1642-5
94. Yuan T, Zhang T, Han Z. Placental vascularization alterations in hypertensive disorders complicating pregnancy (HDCP) and small for gestational age with HDCP using three-dimensional power doppler in a prospective case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, volume 15, Article number: 240 (2015)
95. Roland L, Gagné A, Bélanger MC, Boutet M, Berthiaume L, Fraser WD, Julien P, Bilodeau JF. Existence of compensatory defense mechanisms against oxidative stress and hypertension in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2010 Jan;29(1):21-37
96. Laresgoiti-Servitje E, Gomez-Lopez N, Olson DM. An immunological insight into the origins of preeclampsia. *Hum Reprod Update* 2010;16:510-24
97. Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, Oleszczuk J. T helper 1 - and T helper 2 -type cytokine imbalance in pregnant women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;86:165-70
98. Daher S, de Arruda Geraldine Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004; 62:151-7
99. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens* 1991;4:700–8

100. Clark P, Boswell F, Greer IA. The neutrophil and preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:57–64
101. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1582–8
102. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:240–9
103. Takacs P, Green KL, Nikaeo A, Kauma SW. Increased vascular endothelial cell production of interleukin-6 in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:740–4
104. Kocyigit Y, Atamer Y, Atamer A, Tuzcu A, Akkus Z. Changes in serum levels of leptin, cytokines and lipoprotein in preeclamptic and normotensive pregnant women. *Gynecol Endocrinol* 2004;19:267–73
105. Akira S, Tanga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1
106. Avci AB, Feist E, Burmester GR. Targeting IL-6 or IL-6 Receptor in Rheumatoid Arthritis: What’s the difference? *BioDrugs* 2018;32:531
107. Choy EH, De Benedetti F, Takeuchi T, et al. Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:335
108. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 1998;16:249
109. Okuda Y. Review of tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics* 2008;2:75
110. Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, et al. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia* 2005;48:251–60
111. Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, et al. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003;112:409–13
112. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5053–8

113. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275:18138-18144
114. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376
115. Saarela T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M. Polymorphisms of interleukin-6, hepatic lipase and calpain-10 genes, and preeclampsia. *Eur J Obstr Gynecol Reprod Biol* 2006; 128:175-179
116. Stonek F, Hafner E, Metzenbauer M, Katharina S, Stümpflen, Schneeberger, Zeisler H, Husslein P, Philipp K. Absence of an association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha G308A, interleukin-6 (IL-6) G174C and interleukin-10 (IL-10) G1082A polymorphism in women with preeclampsia. *Journal Reprod Immunol*. 2008; 77:85-90
117. Freeman DJ, McManus F, Brown EA, Cherry L, Norrie J, Ramsay JE, Clark P, Walker ID, Sattar N, Greer IA. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension*. 2004 Nov;44(5):708-14
118. Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, Philipp K, Tempfer C. Interleukin 6 -174 G/C promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1626 pregnant women. *Am J Rep Immunol*. 2008; 59:347-351
119. Daher S, Sass N, Oliverira LG, Mattar R. Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55:130-135
120. De Lima THB, Sass N, Mattar R, Moron AF, Torloni MR, Franchim CS, Daher S. Cytokine gene polymorphisms in preeclampsia and eclampsia. *Hypertension Res* 2009; 32:565-569
121. Vural P, Degirmencioglu S, Saral NY, Dermikan A, Akgul C, Yildirim G, Issever H, Eroglu H. Tumor necrosis factor α , interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol res* 2010; 36:64-71

122. Xie C, Yao MZ, Liu JB, Xiong K. A meta-analysis of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-10 in preeclampsia. *Cytokine*. 2011; 56:550-559
123. Villalvazo EYV, Canto-Cetina T, Arauz JFR, Coral-Vázquez RM, Canizales-Quinteros S, Coronel A, Falcón JC, Rivera JH, Ibarra R, Reyes LP, Canto P. Analysis of polymorphisms in interleukin-10, interleukin-6, and interleukin-1 receptor antagonist in Mexican-Mestizo women with pre-eclampsia. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2012; 1263-1269
124. Harmon QE, Engel SM, Wu MC, Moran TM, Luo J, Stuebe AM, Avery CL, Olshan AF. Polymorphisms in inflammatory genes are associated with term small for gestational age and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(5):472-84
125. Pinheiro MB, Gomes KB, Ronda CR, Guimarães GG, Freitas LG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Dusse LM. Severe preeclampsia: association of genes polymorphisms and maternal cytokines production in Brazilian population. *Cytokine*. 2015 Feb;71(2):232-7
126. Fan DM, Wang Y, Liu XL, Zhang A, Xu Q. Polymorphisms in interleukin-6 and interleukin-10 may be associated with risk of preeclampsia. *Genet Mol Res*. 2017 Feb 23;16(1)
127. Wu W, Yang H, Feng Y, Zhang P, Li S, Wang X, Peng T, Wang F, Xie B, Guo P, Li M, Wang Y, Zhao N, Wang S, Zhang Y. Polymorphisms in inflammatory mediator genes and risk of preeclampsia in Taiyuan, China. *Reprod Sci*. 2017 Apr;24(4):539-547
128. Sowmya S, Ramaiah A, Nallari P, Jyothy A, Venkateshwari A. Role of IL-6-174(G/C) promoter polymorphism in the etiology of early-onset preeclampsia. *Inflamm Res*. 2015 Jun;64(6):433-9
129. Konwar C, Del Gobbo GF, Terry J, Robinson WP. Association of a placental interleukin-6 genetic variant (rs1800796) with DNA methylation, gene expression and risk of acute chorioamnionitis. *BMC Med Genet*. 2019; 20:36
130. Veisian M, Javaheri A, Amjadi N, Tabatabaei RS, Zanbagh L, Hadadan A, Abbasi H, Salimi E, Dastgheib SA, Neamatzadeh H. Association of IL-6 -176G >

- C polymorphism with susceptibility to preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Fetal Pediatr Pathol.* 2020 Dec;39(6):491-502
131. Mahua Choudhury and Jacob E. Friedman. Epigenetics and microRNAs in Preeclampsia. *Clin Exp Hypertens.* 2012 ; 34(5): 334–341
 132. Pozharny Y, Lambertini L, Clunie G, Ferrara L, Lee MJ. Epigenetics in women's health care. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77:225–235
 133. Ainsworth HF, Unwin J, Jamison DL, Cordell HJ. Investigation of maternal effects, maternal- fetal interactions and parent-of-origin effects (imprinting), using mothers and their offspring. *Genet Epidemiol.* 2011; 35:19–45
 134. Ahmed F. Epigenetics: tales of adversity. *Nature.* 2010; 468:S20
 135. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition.* 2004; 20:63–68
 136. Choudhury M, Friedman JE. Obesity: childhood obesity methylate now, pay later? *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7:439–440
 137. Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 62:78–89
 138. Wilkins-Haug L. Epigenetics and assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21:201–206
 139. Nelissen EC, van Montfoort AP, Dumoulin JC, Evers JL. Epigenetics and the placenta. *Hum Reprod Update.* 2011; 17:397–417
 140. Henikoff, S.; Greally, J.M. Epigenetics, cellular memory and gene regulation. *Curr. Biol.* 2016, 26, R644–R648
 141. Zhang, G.; Pradhan, S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* 2014, 66, 240–256
 142. Apicella C, Ruano C S, Mehals C, Miralles F, Vaiman D. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 11;20(11)2837
 143. White, W.M.; Brost, B.; Sun, Z.; Rose, C.; Craici, I.; Wagner, S.J.; Turner, S.T.; Garovic, V.D. Genome-wide methylation profiling demonstrates

- hypermethylation in maternal leukocyte DNA in preeclamptic compared to normotensive pregnancies. *Hypertens. Pregnancy* 2013, 32, 257–269
144. White, W.M.; Sun, Z.; Borowski, K.S.; Brost, B.C.; Davies, N.P.; Rose, C.H.; Garovic, V.D. Preeclampsia/Eclampsia candidate genes show altered methylation in maternal leukocytes of preeclamptic women at the time of delivery. *Hypertens. Pregnancy* 2016, 35, 394–404
145. Taglauer, E.S.; Wilkins-Haug, L.; Bianchi, D.W. Review: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 2014, 35 (Suppl.), S64–S68
146. Chim, S.S.; Tong, Y.K.; Chiu, R.W.; Lau, T.K.; Leung, T.N.; Chan, L.Y.; Oudejans, C.B.; Ding, C.; Lo, Y.M. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 14753–14758
147. Tsui, D.W.; Chan, K.C.; Chim, S.S.; Chan, L.W.; Leung, T.Y.; Lau, T.K.; Lo, Y.M.; Chiu, R.W. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in preeclampsia. *Prenat. Diagn.* 2007, 27, 1212–1218
148. Salvianti, F.; Inversetti, A.; Smid, M.; Valsecchi, L.; Candiani, M.; Pazzagli, M.; Cremonesi, L.; Ferrari, M.; Pinzani, P.; Galbiati, S. Prospective evaluation of RASSF1A cell-free DNA as a biomarker of preeclampsia. *Placenta* 2015, 36, 996–1001
149. Bellido, M.L.; Radpour, R.; Lapaire, O.; DeBie, I.; Hosli, I.; Bitzer, J.; Hmadcha, A.; Zhong, X.Y.; Holzgreve, W. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol. Reprod.* 2010, 82, 745–750
150. Ching T, Song M, Tiirikainen M, Molnar J, Berry M, Towner D, Garmire L. Genome-wide hypermethylation coupled with promoter hypomethylation in the chorioamniotic membranes of early onset preeclampsia. *Mol Human Reprod* 2014;20;885-904
151. G E Lash 1, G J Burton, L W Chamley, V L Clifton, M Constancia, I P Crocker, V Dantzer, G Desoye, S Drewlo, D G Hemmings, S Hiendleder, B Kalionis, J A Keelan, Y Kudo, R M Lewis, U Manuelpillai, P Murthi, D Natale, C

- Pfarrer, S Robertson, R Saffery, S Saito, A Sferruzzi-Perri, L Sobrevia, B J Waddell, C T Roberts. IFPA Meeting 2009 workshops report. *Placenta* 2010; 31:S4-S20
152. Lan Liu 1, Xiang Zhang, Can Rong, Can Rui, Hui Ji, Yu-jia Qian, Ruizhe Jia, Lizhou Sun. Distinct DNA methylomes of human placentas between pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:1877-1889
153. Alejandra Perez-Sepulveda, Maria Jose Torres, Maroun Khoury, Sebastian E Illanes 1. Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol.* 2014; 5: 244
154. Halvatsiotis P, Tsokaki T, Chrelias C, Kassanos D, Domali E, Gazouli M, Dimitriadis G, Kalantaridou S. Methylation profile of genes involved in inflammation, in the blood from pregnancies with maternal preeclampsia due to untreated gestational diabetes mellitus. *Hormones (Athens).* 2019 Jun;18(2):173-178
155. Sally K Abell, Barbora De Courten, Jacqueline A Boyle, Helena J Teede. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2015 Jun; 16(6): 13442–13473
156. Milan Savic, Suzana Cvjeticanin, Milica Lazovic, Ljubica Nikcevic, Dejan Nikolic. Morphogenetic Variability and Hypertension in Ischemic Stroke Patients-Preliminary Study. *J Clin Med.* 2018 Jun; 7(6): 120
157. Caio Perez Gomes, Maria Regina Torloni, Bárbara Yasmin Gueuvoghlanian-Silva, Sandra Maria Alexandre, Rosiane Mattar, Silvia Daher. Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. *Am J Reprod Immunol* 2013 Jun;69(6):545-57
158. Haiyan Wang, Mingzhen Guo, Fenghua Liu, Jingli Wang, Zheng Zhou, Jing Ji, Yuanhua Ye, Weiqing Song, Shiguo Liu, Bo Sun. Role of IL-17 Variants in Preeclampsia in Chinese Han Women. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140118)
159. Cha, R.S, Tilly W.G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 1993 Dec;3(3):S18-29

160. Reavill CA, Plummer DT. Purification of acetylcholinesterase from pig cerebral cortex by affinity chromatography. *J Chromatogr* 1978 Sep 21;157:141-51
161. Chu SY, Kim SY, Bish CL. Prepregnancy obesity prevalence in the United States, 2004-2005. *Matern Child Health J* 2009; 13:614-20; PMID:18618231
162. Gibson KS, Waters TP, Catalano PM. Maternal weight gain in women who develop gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2012; 119:560- 5; PMID:22353954
163. E. Conti, L. Zezza, E. Ralli, D. Caserta, M.B. Musumeci, M. Moscarini, C. Autore, M. Volpe. Growth factors in preeclampsia: A vascular disease model. A failed vasodilation and angiogenic challenge from pregnancy onwards? *Cytocine and growth factors reviews*; October 2013, Volume 24, Issue 5, Pages 411–425
164. Oren S, Golzman B, Reitblatt T, et al. Gestational diabetes mellitus and hypertension in pregnancy: Hemodynamics and diurnal arterial pressure profile. *J Hum Hypertens* 1996; 10: 505–9
165. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308:1592
166. Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, et al. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol* 2007; 178:5949
167. Lehnen H, Zechner U, Haaf T. Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Molecular Human Reproduction* 2013; 19:415-22
168. Stephanie-May Ruchat , Andrée-Anne Houde, Grégory Voisin, Julie St-Pierre, Patrice Perron, Jean-Patrice Baillargeon, Daniel Gaudet, Marie-France Hivert, Diane Brisson, Luigi Bouchard. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 2013 Sep 1; 8(9): 935-943

13. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΔΙΟΙΚΗΣΗ 2^{ης} ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΙΩΣ ΚΑΙ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
«ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΑΠΟΣΠΑΣΜΑ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

8^{ης} Συνεδρίασης

στις 29-8-2013

ΑΠΟΦΑΣΗ

Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου με τίτλο: «Μοριακές και Βιοχημικές διαταραχές στην επιπλεγμένη ή μη διαβητική κύηση» το οποίο θα αποτελέσει διδακτορική διατριβή της κ.Θεοδώρας Τσοκάκη (Β' ΠΠΚ, ΕΒΔ 770/29-8-13)

Το Επιστημονικό Συμβούλιο (**παρόντες:** Καθηγητής Χρήστος Λιάπης, Καθηγητής Πέτρος Καρακίτσος, Επιμ. Α' Φώτης Κολοκάθης, Επικ.Καθηγητής Χρήστος Κρούπης, Επικ.Καθηγητής Ευστάθιος Ευσταθόπουλος, Λέκτορας Νικόλαος Ζάβρας, Τομέαρχης Ε' Παιδ/κού Τομέα Ιωάννα Τασιοπούλου)

- 1) την αριθμ. 8/29-8-13 απόφαση της Επιτροπής Βιοηθικής Δεοντολογίας (θέμα 9^ο), (**παρόντες:** Δ/ντής ΕΣΥ Άγγελος Παπαδόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Χρήστος Κρούπης, Α' Επιμ. Φώτιος Κολοκάθης, Λέκτορας Νικόλαος Ζάβρας)
- 2) τις διαδικασίες και τους κανονισμούς υποβολής πρωτοκόλλων για διενέργεια κλινικής δοκιμής στο Νοσοκομείο
- 3) το γεγονός ότι οι φάκελοι είναι πλήρεις και καλύπτουν όλες τις προϋποθέσεις για τη διεξαγωγή της μελέτης
- 4) ότι από τη διενέργεια της μελέτης δεν προκύπτει οικονομική επιβάρυνση για το Νοσοκομείο

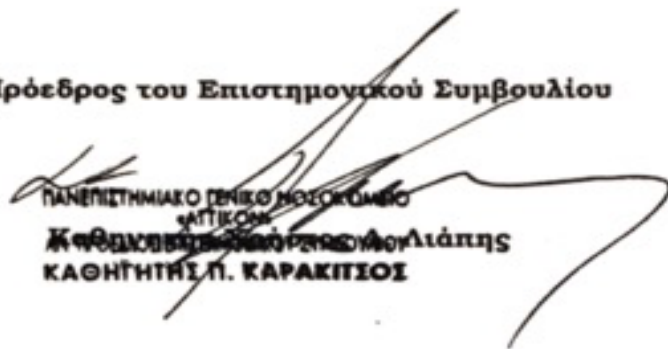
Ομόφωνα

Εγκρίνει τη διεξαγωγή ερευνητικού πρωτοκόλλου με τίτλο: «Μοριακές και Βιοχημικές διαταραχές στην επιλεγμένη ή μη διαβητική κύηση» το οποίο θα αποτελέσει διδακτορική διατριβή της κ. Θεοδώρας Τσοκάκη και θα διεξαχθεί στη Β' ΠΠΚ.

Διευθυντής: Καθηγητής Γ. Δημητριάδης

Υποβάλλει το θέμα στις αρμόδιες Υπηρεσίες για περαιτέρω ενέργειες.

Ο Πρόεδρος του Επιστημονικού Συμβουλίου


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΑΤΤΙΚΩΝ
Καθηγητής Διατροφολογίας
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π. ΚΑΡΑΚΙΤΣΟΣ

Ακριβές αντίγραφο
εκ του πρωτοτύπου
Μαΐδαρι... 6-9-13...





Methylation profile of genes involved in inflammation, in the blood from pregnancies with maternal preeclampsia due to untreated gestational diabetes mellitus

Panagiotis Halvatsiotis¹ · Theodora Tsokaki² · Charalambos Chrelias² · Dimitrios Kassanos² · Ekaterini Domali³ · Maria Gazouli⁴ · Georgios Dimitriadis¹ · Sophia Kalantaridou²

Received: 26 January 2019 / Accepted: 21 May 2019 / Published online: 1 June 2019
© Hellenic Endocrine Society 2019

Abstract

Purpose To investigate DNA methylation changes in peripheral blood from patients with gestational diabetes mellitus (GDM) and preeclampsia (PE) due to poorly treated GDM.

Methods Eighteen pregnant women participated in the study: 6 with GDM, 6 with PE, and 6 healthy controls. The promoter methylation status of genes was profiled using the Human Inflammatory Response and Autoimmunity EpiTect Methyl II Signature PCR Array profiles. The results were validated with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results Fewer inflammation-related genes were significantly hypomethylated in PE cases compared to healthy subjects than in GDM cases. Some of the examined genes show different methylation patterns between GDM and PE.

Conclusions The epigenetic changes observed in this study indicate that GDM and PE exhibit specific DNA methylation profiles, with possible clinical applications.

Keywords Gestational diabetes mellitus · Preeclampsia · Methylation · Inflammation · Diagnosis · Prognosis

Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a state of glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy [1]. GDM, when poorly treated, increases the risk of adverse pregnancy outcomes, such as preeclampsia (PE), a multisystem disorder characterized by new onset of hypertension and proteinuria or end-organ dysfunction [2, 3]. Although most affected pregnancies proceed to term or near term with good

maternal and fetal outcomes, these pregnancies are nevertheless at increased risk for maternal and/or fetal mortality or serious morbidity [4, 5]. The incidences of hypertension and PE are increased in pregnant women with diabetes [6]. However, it has been observed that insulin resistance appears to augment the risk of developing PE [7, 8], while impaired endothelium-dependent vasodilation seems to be related to the duration of diabetes [9].

Hence, insulin resistance is the main component in the pathophysiology of PE, with enough evidence suggesting inflammation as the central feature. Overexpression of this inflammatory response leads to vascular disease which is the basis in immunobiology of PE [10]. Additionally, many investigators [11, 12] have pointed to the role of the maternal immune system in the pathogenesis of PE. Proinflammatory cytokines, neutrophil activation, and endothelial dysfunction are related to the pathophysiology of PE [13]. Perez-Sepulveda et al. [14] reported that Th1/Th2/Th17 and regulatory T cells and the dendritic cells could play a basic role in PE pathogenesis.

Given the numerous processes through which methylation plays a part in the development of this condition, researchers have also linked DNA methylation errors to a number of significant consequences, including several diseases. Regarding

✉ Maria Gazouli
mgazouli@med.uoa.gr

¹ 2nd Department of Int. Med Propaedeutic “Attikon” University Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
² 3rd Department of Obstetrics and Gynecology, “Attikon” University Hospital, Athens, Greece
³ 1st Department of Obstetrics & Gynecology, “Alexandra” Hospital, University of Athens, Medical School, Athens, Greece
⁴ Laboratory of Biology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Michalakopoulou 176, 11527 Athens, Greece

PE and GDM, Ching et al. [15] reported that the patterns of genome-wide hypermethylation in promoters are common in the chorioamniotic membranes of early onset PE, while Lash et al. [16], performing DNA methylome profiling of maternal peripheral blood and placentas, revealed potential fetal DNA markers. Liu et al. [17] suggested that DNA methylation patterns in human placentas are significantly associated with PE and GDM.

Since PE has been described as an immune imbalance promoting an inflammatory state [14], we decided to investigate epigenetic mechanisms, including alteration of promoter DNA methylation status of genes involved in inflammation and thus modulation of gene expression during gestation, as causative factors for PE progression in pregnant women with poorly treated GDM.

Materials and methods

Human samples

After being informed and having given their written consent, 18 pregnant women participated in the study: 6 with GDM, 6 with GDM who developed PE, and 6 healthy volunteers/controls (HV), with similar BMI (pre-pregnancy) levels and age. All 18 women participating in the study were below 40 years old and had no positive history of alcohol and/or drug abuse during the current pregnancy. Finally, pregnant women suffering from malignancies or infectious or chronic diseases were excluded so as to exclude or control potential confounding factors. Diagnosis of preeclampsia was based on the following criteria: systolic blood pressure (SBP) ≥ 40 or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 on two occasions at least 4 h apart, and proteinuria on dipstick ≥ 1 or ≥ 30 mg/24 h after 20 gestational weeks. Healthy controls were selected among pregnant women without any history of autoimmunity, malignancy, or family history for GDM and PE. Homeostatic model assessment (HOMA) index was calculated as glucose multiplied by insulin divided by 405 [18]. The study was approved by the Institutional Ethic Committee, and all participants signed informed consent to their participation in the study. All procedures were conducted in accordance with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Methylation PCR analysis

DNA from whole blood samples was isolated using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). The restriction digestions were performed using the EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit provided by Qiagen (Chatsworth, CA, USA) as previously described [19]. The digested DNA samples were then analyzed using the Human Inflammatory Response and Autoimmunity EpiTect

Methyl II Signature PCR Array Profiles (Qiagen), as previously described [19]. The Human Inflammatory Response and Autoimmunity EpiTect Methyl II Signature PCR Array profile the promoter methylation status of a panel of 22 genes. The real-time PCR assay was performed in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The data were analyzed using the EpiTect Methyl II PCR Array System. The minimum level of hypermethylation considered to be positive is set at 20%. All experiments were performed in duplicates.

Validation of the microarray finding by qRT-PCR

mRNA expression levels of selected methylated genes were analyzed by qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) using the Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. RNA was extracted from whole blood using TRIzol, and RNA was converted to cDNA using a high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed in three independent experiments performed in triplicate. Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula, relative to the housekeeping gene GAPDH.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Methylation was considered to be hypermethylated if $> 20\%$, according to the instructions of the manufacturer. Kruskal-Wallis using Bonferroni corrections for multiple comparisons test analyses was used to detect the existence of any possible statistical significant difference among the groups. Differences in methylation levels between two groups were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney test. The p values were two tailed and $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

The clinical characteristics of the women with GDM and PE, and the HV are presented in Table 1. HOMA index and blood pressure were different, indicating case-control status: specifically, higher HOMA index and blood pressure, both systolic (SBP) and diastolic (DBP), in women with GDM and in women who had developed PE due to poor treatment of GDM as compared with HV pregnant women.

Clustering results on paired differences of our sample set showed significant methylation changes between GDM, PE, and HV ($p < 0.001$) for the CpGs analyzed. The differential gene methylation for each of the above comparisons is shown in Table 2.

Table 1 Clinical characteristics of preeclampsia (PE), gestational diabetes mellitus (GDM) cases, and healthy controls (HV)

	HV median (min–max)	GDM median (min–max)	<i>p</i> value vs HV	PE median (min–max)	<i>p</i> value vs HV
Age (year)	31.5 (25–38)	32 (25–38)	0.952	33 (27–39)	0.830
BMI	31.54 (28.6–34.2)	29.3 (25.5–31)	0.085	29 (25–31)	0.033
HOMA	0.97 (0.87–1.10)	2.78 (2.69–3.23)	< 0.001	2.54 (2.16–3.12)	< 0.001
gHbA1c	4.93 (4.16–5.40)%	5.25 (4.75–6.4)%	0.379	5.55 (4.96–7.30)%	0.209
SBP (mmHg)	110 (90–130)	115 (95–149)	0.191	165 (150–250)	< 0.001
DBP (mmHg)	70 (50–80)	70 (56–90)	0.074	100 (70–150)	< 0.001

The statistical test was Mann-Whitney

Regarding GDM, only the ATF2 showed significantly higher methylation compared to HV ($p < 0.001$). All the other genes examined demonstrated no methylation or hypomethylation as compared to controls (Table 2). As concerns PE, genes IL15 and IL17RA were found to be significantly hypermethylated in PE compared to HV ($p < 0.001$). Similarly to the GDM cases, all the other genes showed lower methylation in the PE cases. Despite the relatively limited number of cases, based on these results, it was possible to identify distinctive methylation patterns for GDM vs PE (Table 3). Specifically, the ATF2, CCL25, IL12B, and IL6ST genes were hypermethylated in GDM compared to PE. In addition, the genes which did not differ significantly between PE and controls appeared hypomethylated compared to GDM.

Having obtained indications of the presence of differential methylation between the GDM and PE cases, and HV, crucial questions are raised concerning the functional impact of such

signals on gene transcription. This issue was addressed by undertaking qRT-PCR for selected gene targets that have shown evidence of noticeable differential methylation on the array experiment. IL13 as a highly methylated gene in all cases, IL6ST as a hypomethylated gene in GDM and PE cases, and GATA3 as a non-affected gene were selected from the above-mentioned genes and studied, with relative quantification data revealing changes between cases and controls. As illustrated in Fig. 1, increased expression of mRNA levels was observed in cases with reduced methylation.

Discussion

Due to the increasing prevalence of obesity and excess gestational weight gain, women are more likely to develop pregnancy complications such as GDM, leading to adverse

Table 2 Gene methylation status as median of the percentage methylated (M) fraction of input genomic DNA containing two or more methylated CpG sites in the targeted region of a gene. Only genes that reached in at least one group the threshold of 20% are presented

Genes	GDM median (min–max)	PE median (min–max)	HV median (min–max)	<i>p</i> values*
ATF2	52.16 (46.32–53.29)	10.41 (8.18–12.10)	7.17 (6.8–8.4)	< 0.001
CCL25	44.8 (37.16–48.80)	0.07 (0.06–0.08)	50.25 (46.56–52.12)	< 0.001
CXCL14	3.14 (2.88–3.99)	17.08 (15.88–17.12)	35.64 (33.96–37.25)	< 0.001
CXCL3	0.4 (0.36–0.55)	3.14 (2.45–3.43)	22.08 (21.38–22.98)	< 0.001
CXCL5	3.4 (2.99–4.20)	8.6 (8.04–9.08)	26.66 (24.71–28.70)	< 0.001
CXCL6	0.88 (0.73–1.92)	5.86 (4.87–6.80)	27.53 (25.71–28.70)	< 0.001
IL10RA	22.93 (21.38–24.23)	50.50 (45.10–56.10)	50.25 (46.50–51.32)	< 0.001
IL12A	26.49 (24.32–27.38)	47.49 (43.0–50)	49.01 (42.0–50)	< 0.001
IL12B	33.58 (29.76–35.25)	5.72 (4.58–6.89)	51.13 (47.99–54.60)	< 0.001
IL13	59.09 (56.68–62)	79.70 (74.22–83.10)	71.55 (68.72–73.20)	0.001
IL13RA1	49.24 (47.2–52)	50.6 (48.22–51.14)	75.8 (65.35–80.10)	< 0.001
IL17C	48.72 (465.0–57.19)	55.21 (51.2–58.62)	71.3 (67.12–73.28)	< 0.001
IL6ST	4.79 (3.45–6.20)	1.23 (0.89–1.40)	25.22 (24.86–26.30)	< 0.001
IL17RA	13.5 (13.2–15.88)	33.26 (29.85–34.72)	18.84 (16.62–20.78)	< 0.001
IL4R	14.42 (13.62–16.20)	51.14 (46.88–53.29)	50.23 (47.52–52)	< 0.001
TYK2	18.61 (17.65–19.2)	41.21 (35.24–45.10)	40.25 (33.24–44.10)	< 0.001
IL7	0.57 (0.46–0.64)	0.44 (0.36–0.51)	20.24 (18.77–22.69)	< 0.001

*The statistical test was Kruskal-Wallis using Bonferroni corrections for multiple comparisons

Table 3 Genes showing statistically significant evidence of hypermethylation, hypomethylation, and differential methylation among GDM, PE, and HV

Genes	GDM vs HV	PE vs HV	GDM vs PE
ATF2	HyperM	NS	HyperM
CCL25	NS	HypoM	HyperM
CXCL14	HypoM	HypoM	HypoM
CXCL3	HypoM	HypoM	HypoM
CXCL5	HypoM	HypoM	HypoM
CXCL6	HypoM	HypoM	HypoM
IL10RA	HypoM	NS	HypoM
IL12A	HypoM	NS	HypoM
IL12B	HypoM	HypoM	HyperM
IL13	HypoM	NS	HypoM
IL13RA1	HypoM	HypoM	NS
IL17C	HypoM	HypoM	NS
IL6ST	HypoM	HypoM	HyperM
IL17RA	HypoM	HyperM	HypoM
IL4R	HypoM	NS	HypoM
IL6R	HypoM	NS	HypoM
INHA	HypoM	HypoM	HypoM
IL7	HypoM	HypoM	NS

HyperM, hypermethylation; *HypoM*, hypomethylation; *NS*, not significant

pregnancy outcomes, such as PE [20, 21]. Besides insulin resistance, pregnant women with GDM and PE share a common hemodynamic profile [22, 23]. Several studies on GDM have demonstrated that a proinflammatory endothelial environment is induced in diabetic pregnancies, which present high levels of endothelial inflammatory markers. As mentioned before, since PE is characterized by exaggerated maternal inflammatory response, placental DNA released into the maternal circulation could play a role in driving the systemic inflammatory response of PE via placental necrosis and apoptosis [24–26]. Recent evidence suggests that changes to the epigenomic landscape involved in the pathogenesis of GDM [27], as well as untreated GDM, can induce epigenetic modifications modulating gene regulation [28]. Additionally, it is hypothesized that epigenetic alteration may play a role in mediating pregnancy-related complications such as PE [15]. White et al. [29] compared methylation profiles between normotensive and pregnant women with PE at delivery and proposed that differential methylation of certain neuronal genes may explain the risk for eclampsia.

Our results show that fewer inflammation-related genes were significantly hypomethylated in PE cases compared to healthy subjects than in GDM cases. Out of 22 genes studied, ATF2, GATA3, IL0RA, IL12A, IL13, IL4R, IL6R, and TYK2 displayed no statistically significant differences among PE and HV, whereas only CCL25 and IL15 showed no statistically significant differences among GDM and HV.

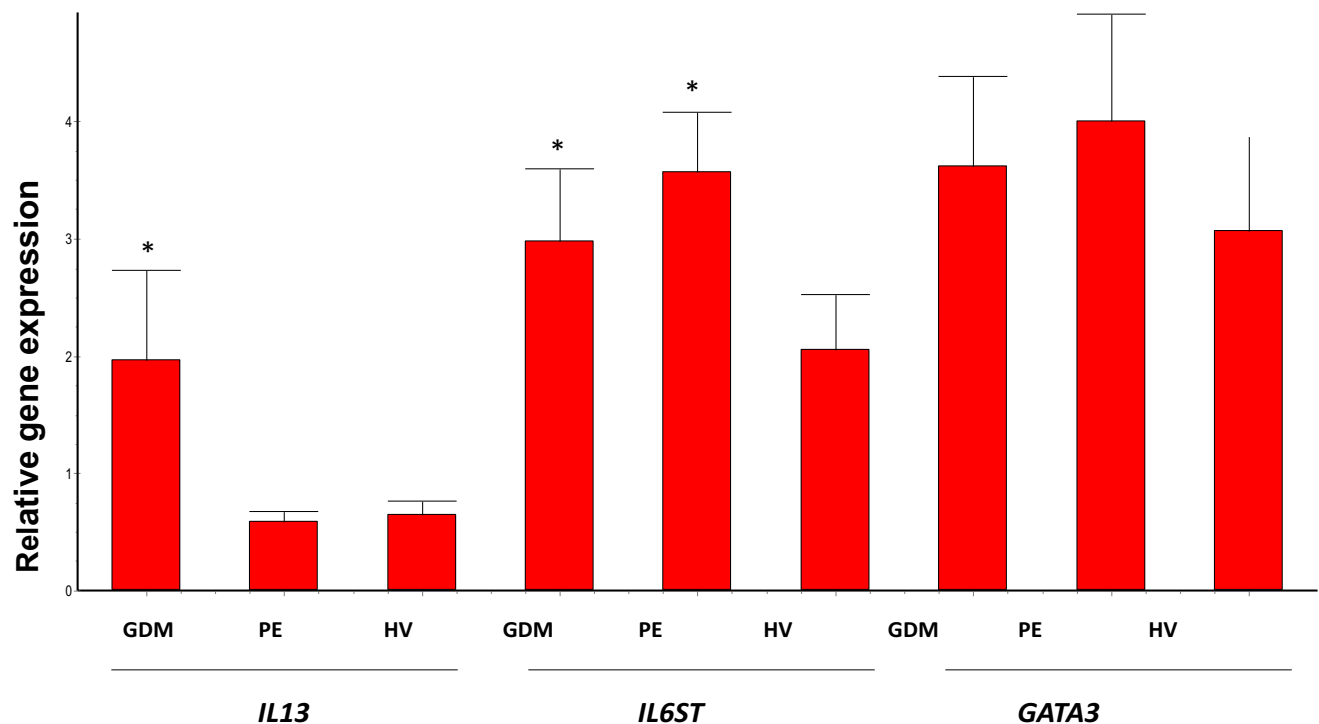


Fig. 1 Quantitative RT-PCR data. Comparison of mRNA expression levels between GDM, PE, and HV samples. Data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments performed in triplicate.

Asterisk represents statistically significant changes in expression compared with HV. The differences between groups were compared with the Mann-Whitney test

Regarding GDM, only one gene, ATF2, demonstrated statistically higher methylation than PE and healthy controls. It is known that ATF2 responds to stress-related stimuli and has been characterized as the promoter of key genes involved in a variety of cellular processes, such as inflammatory signaling, cell cycle control, and glycosylation [30].

The CXCL14, CXCL3, CXCL5, and CXCL6 genes were found to be hypomethylated in both GDM and PE, though they are not hypomethylated according to the 20% threshold set for the specific experiment. However, chemokines are known to be basic mediators of angiogenesis and immunity, and are involved in the pathogenesis of various conditions, including chronic inflammation, myocardial ischemia, and atherosclerosis. Additionally, it has been suggested that women with a history of GDM and PE are at increased risk of cardiovascular disease because they had a dysregulated CXC chemokine ligand 16 during pregnancy [31]. Thus, our results agree with previous studies indicating that CXC chemokine expression levels are altered in GDM and PE cases [32].

GATA3 and FADD, in both GDM and PE cases as compared to controls, did not reach the threshold to be classified as hypomethylated, a finding that is verified for GATA3 by examining its expression by real-time PCR.

IL10RA, IL12A, IL13, IL17RA, IL4R, and IL6R were found to be significantly hypomethylated only in GDM cases. It is well accepted that cytokines are upregulated in women with GDM [33–35]. Our findings indicated that one possible mechanism of these alterations could be the methylation status of the corresponding interleukin genes. Interestingly, even though IL13 was observed as significantly hypomethylated in GDM cases, in PE cases, we did not find any difference in methylation levels compared to controls. Our results were confirmed by measuring the IL13 mRNA levels and agree with the findings by Jonsson et al. [36], who reported that they did not note any difference in IL13 levels between PE and normal pregnancies.

Regarding IL13RA1 and IL17C, they were found to be significantly hypomethylated in GDM and PE compared to HV. Although the role of IL13RA1 is not well known in these conditions, partially in agreement with our findings, Molvarec et al. [37] reported increased circulating IL17 levels in preeclampsia, while the IL17 family has been associated with the development of type 2 diabetes [38].

Our results reveal a significant hypermethylation of the IL17RA gene only in PE cases, which accords with previous studies that have suggested an important role for the IL-17 family, mainly secreted by Th17 cells, in the development of systemic inflammation in PE [39].

As regards INHA, TYK2, IL7, and IL15, which were differentially methylated in the healthy controls, their levels did not reach the 20% threshold set for the specific experiment.

Another interesting observation was that despite the existence of a similar trend, there is a different level of methylation of specific genes between GDM and PE. Liu et al. [17] have

also proposed that there are distinct DNA methylomes of human placentas between PE and GDM. It thus appears likely that some genes show significantly different levels of methylation; however, the fact that these differences can be identified in peripheral blood samples opens up the perspective for the use of methylation as a biomarker, and especially as a tool to diagnose GDM and PE.

While the sample size of the present study is a potential limitation, it is important to note that the study was conducted in a homogeneous population of European descent, which is an asset to epigenetic studies, although additional work is needed to understand the significance of DNA methylation in GDM and PE.

In conclusion, since a significant number of genes in maternal blood with GDM were differentially methylated between samples, exposed or not to PE, it is suggested that GDM has epigenetic effects on genes that are preferentially involved in the inflammatory pathway, thereby providing supportive evidence that DNA methylation is involved in the condition by exerting effects that contribute to progression to PE.

Compliance with ethical standards The study was approved by the Institutional Ethic Committee, and all participants signed informed consent to their participation in the study. All procedures were conducted in accordance with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

1. American Diabetes A (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34(Suppl 1):S62–S69
2. American College of O, Gynecologists, Task Force on Hypertension in P. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122(5):1122–1131
3. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL et al (2013) Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 170(1):1–7
4. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. National Institute of Child H, Human Development Maternal-Fetal Medicine Units N. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol* 2003;27(3):239–246
5. Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS (2011) Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best practice & research. Clin Obstet Gynaecol* 25(4):391–403
6. Holmes VA, Young IS, Patterson CC et al (2011) Optimal glycemic control, pre-eclampsia, and gestational hypertension in women with type 1 diabetes in the diabetes and pre-eclampsia intervention trial. *Diabetes Care* 34(8):1683–1688
7. Innes KE, Wimsatt JH, McDuffie R (2001) Relative glucose tolerance and subsequent development of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 97(6):905–910
8. Joffe GM, Esterlitz JR, Levine RJ et al (1998) The relationship between abnormal glucose tolerance and hypertensive disorders of pregnancy in healthy nulliparous women. Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 179(4):1032–1037

9. Savvidou MD, Geerts L, Nicolaides KH (2002) Impaired vascular reactivity in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 186(1):84–88
10. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL (1999) Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180(2 Pt 1):499–506
11. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW (2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 11(5):309–316
12. Redman CW, Sargent IL (2007) Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 76(1–2):61–67
13. Laresgoiti-Servitje E (2013) A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol* 94(2):247–257
14. Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Khoury M et al (2014) Innate immune system and preeclampsia. *Front Immunol* 5:244
15. Ching T, Song MA, Tiirikainen M et al (2014) Genome-wide hypermethylation coupled with promoter hypomethylation in the chorioamniotic membranes of early onset pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 20(9):885–904
16. Lash GE, Robson SC, Bulmer JN (2010) Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidual. *Placenta*. (31 Suppl):S87–S92
17. Liu L, Zhang X, Rong C et al (2014) Distinct DNA methylomes of human placentas between pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus. *Cell Physiol Biochem : Int J Exp Cell Physiol, Biochem Pharmacol* 34(6):1877–1889
18. Paltoglou G, Tavernarakis G, Christopoulos P et al (2013) PON1-108 TT and PON1-192 RR genotypes are more frequently encountered in Greek PCOS than non-PCOS women, and are associated with hyperandrogenaemia. *Clin Endocrinol* 79(2):259–266
19. Karatzas PS, Mantzaris GJ, Safioleas M et al (2014) DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autoimmunity in inflammatory bowel disease. *Medicine*. 93(28):e309
20. Chu SY, Kim SY, Bish CL (2009) Prepregnancy obesity prevalence in the United States, 2004–2005. *Matern Child Health J* 13(5):614–620
21. Gibson KS, Waters TP, Catalano PM (2012) Maternal weight gain in women who develop gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 119(3):560–565
22. Conti E, Zezza L, Ralli E et al (2013) Growth factors in preeclampsia: a vascular disease model. A failed vasodilation and angiogenic challenge from pregnancy onwards? *Cytokine Growth Factor Rev* 24(5):411–425
23. Oren S, Golzman B, Reitblatt T et al (1996) Gestational diabetes mellitus and hypertension in pregnancy: hemodynamics and diurnal arterial pressure profile. *J Hum Hypertens* 10(8):505–509
24. Redman CW, Sargent IL (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 308(5728):1592–1594
25. Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, et al. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol* 2007;178(9): 5949–5956
26. Hartley JD, Ferguson BJ, Moffett A (2015) The role of shed placental DNA in the systemic inflammatory syndrome of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 213(3):268–277
27. Lehnen H, Zechner U, Haaf T (2013) Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Mol Hum Reprod* 19(7):415–422
28. Ruchat SM, Houde AA, Voisin G et al (2013) Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 8(9):935–943
29. White WM, Brost B, Sun Z et al (2013) Genome-wide methylation profiling demonstrates hypermethylation in maternal leukocyte DNA in preeclamptic compared to normotensive pregnancies. *Hypertens Pregnancy* 32(3):257–269
30. Watson G, Ronai ZA, Lau E (2017) ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease. *Pharmacol Res* 119:347–357
31. Lekva T, Michelsen AE, Aukrust P et al (2017) CXC chemokine ligand 16 is increased in gestational diabetes mellitus and preeclampsia and associated with lipoproteins in gestational diabetes mellitus at 5 years follow-up. *Diab Vasc Dis Res* 14(6):525–533
32. Liu X, Dai LI, Zhou R (2015) Association between preeclampsia and the CXC chemokine family (review). *Exp Ther Med* 9(5): 1572–1576
33. Abell SK, De Courten B, Boyle JA et al (2015) Inflammatory and other biomarkers: role in pathophysiology and prediction of gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci* 16(6):13442–13473
34. Rodrigo N, Glastras SJ (2018) The emerging role of biomarkers in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *J Clin Med* 7(6)
35. Gomes CP, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY et al (2013) Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. *Am J Reprod Immunol* 69(6):545–557
36. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L et al (2006) Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 70(1–2):83–91
37. Molvarec A, Czeglé I, Szijarto et al. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2015;112:53–57
38. Brahimaj A, Ligthart S, Ghanbari M et al (2017) Novel inflammatory markers for incident pre-diabetes and type 2 diabetes: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol* 32(3):217–226
39. Wang H, Guo M, Liu F et al (2015) Role of IL-17 variants in preeclampsia in Chinese Han women. *PLoS One* 10(10):e0140118

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

15. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Τσοκάκη Θεοδώρα

Ημερομηνία γεννήσεως: 3/9/1982

Τόπος γεννήσεως: Βόλος Μαγνησίας

Οικογενειακή κατάσταση: έγγαμη, 2 παιδιά

Διεύθυνση κατοικίας: Λαστέικα, Πύργος Ηλείας

Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6948488565

E-mail: ttsokaki@yahoo.gr



ΣΠΟΥΔΕΣ

- 6/2018: Λήψη διπλώματος στην Εμβρυϊκή Ιατρική από Fetal Medicine Foundation (Diploma in Fetal Medicine)
- 2016-2018: Εξειδίκευση στην Εμβρυϊκή Ιατρική στο Kings College Hospital London, υπό τη διεύθυνση του καθηγητή Κου Κύπρου Νικολαΐδη
- 2016: Λήψη τίτλου ιατρικής ειδικότητας της Μαιευτικής & Γυναικολογίας
- 2013: Υποψήφια Διδάκτωρ ΕΚΠΑ (Θέμα: «Γενετικές και επιγενετικές μεταβολές στην επιπλεγμένη ή μη επιπλεγμένη με προεκλαμψία Διαβητική Κύηση»)
- 2010-2013: Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του ΕΚΠΑ «Παθολογία της Κύησης», Βαθμός 8,26
- 2000-2006: Τμήμα Ιατρικής ΑΠΘ, βαθμός πτυχίου «Λίαν Καλώς» 8
- 1997-2000: 6^ο Ενιαίο Γενικό Λύκειο Βόλου, Βαθμός απολυτηρίου 19,7

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Ιδιώτης ιατρός στον Πύργο Ηλείας παρέχουσα εξειδικευμένες επεμβατικές και μη επεμβατικές υπηρεσίες στον προγεννητικό έλεγχο εμβρύου (2018 έως σήμερα)
- Ειδικευόμενη ιατρός στη Γ' Μαιευτική – Γυναικολογική κλινική ΠΓΝ «Αττικόν» (1/2012 έως 5/2016)
- Ειδικευόμενη ιατρός στη Μαιευτική – Γυναικολογική κλινική στο Γ.Ν.Πύργου (8/2009 έως 1/2011)
- Ειδικευόμενη ιατρός στη Χειρουργική κλινική στο Γ.Ν.Αμαλιάδος (1/2009 έως 7/2009)
- Αγροτική ιατρός στο άγονο Περιφερειακό Ιατρείο Αγαθονησίου (9/2007 έως 9/2008)
- Τρίμηνη εκπαίδευση στα πλαίσια της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Θ. – Κ.Υ. Λέρου (6/2007 έως 9/2007)

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ/ ΒΡΑΒΕΙΑ

- **5/2022:** 2^ο Βραβείο εργασιών στο 20^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο: «Συσχέτιση των γονιδιακών πολυμορφισμών τωου γονιδίου της SIRT1 και του αντιοξειδωτικού φορτίου στην κύηση με σακχαρώδη διαβήτη», Αθήνα 2022
- **12/2015:** Βραβείο καλύτερης ανακοίνωσης στο 13^ο Παγκόσμιο Συνέδριο Ινσουλινοαντίστασης, Σακχαρώδους Διαβήτη και Καρδιαγγειακής νόσου, Λος Άντζελες 2015: “Preeclampsia related to untreated Gestational Diabetes Mellitus. Epigenetically affected genes involved in inflammation”
- **2000-2006:** Υποτροφία «Κληροδότημα Στρεφτάρη» του Δήμου Βόλου για εισαγωγή στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης ως αριστούχου
- **2000-2006:** Υποτροφία του ιδρύματος «Ιωάννη Σπ. Λάτση» για υψηλές επιδόσεις σε κάθε έτος σπουδών

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- **Αγγλικά:** Άριστο επίπεδο (IELTS, Cambridge Proficiency Certificate, Michigan Proficiency Certificate).
- **Γερμανικά:** Άριστο επίπεδο (Kleines Deutches Sprachdiplom, München Universität)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Prediction of pre-eclampsia in twin pregnancy by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks' gestation: data from EVENTS trial. Benkő Z, Wright A, Rehal A, Cimpoa B, Syngelaki A, Delgado JL, **Tsokaki T**, De Alvarado M, Vojtassakova D, Malligiannis Ntalianis K, Chaveeva P, Del Campo A, De Ganzo T, Resta C, Atanasova V, Accurti V, Villalain C, Aguilera J, Dojcinovska D, O'Gorman N, Plasencia W, Zingler E, Dutemeyer V, Alvar B, Casanova MC, Nicolaides KH. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021 Feb;57(2):257-265.
- Methylation profile of genes involved in inflammation, in the blood from pregnancies with maternal preeclampsia due to untreated gestational diabetes mellitus. Halvatsiotis P, **Tsokaki T**, Chrelias C, Kassanos D, Domali E, Gazouli M, Dimitriadis G, Kalantaridou S. *Hormones (Athens)*. 2019 Jun;18(2):173-178.
- ASPRE trial: incidence of preterm pre-eclampsia in patients fulfilling ACOG and NICE criteria according to risk by FMF algorithm. Poon LC, Rolnik DL, Tan MY, Delgado JL, **Tsokaki T**, Akolekar R, Singh M, Andrade W, Efeturk T, Jani JC, Plasencia W, Papaioannou G, Blazquez AR, Carbone IF, Wright D, Nicolaides KH. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018 Jun;51(6):738-742.
- Low-Grade Appendiceal Mucinous Neoplasm Presenting as an Adnexal Mass. Panagopoulos P, **Tsokaki T**, Misiakos E, Domi V, Christodoulaki C, Sioutis D, Papantoniou N. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2017;2017:7165321.
- Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention trial: effect of aspirin in prevention of preterm preeclampsia in subgroups of women according to their characteristics and medical and obstetrical history. Poon LC, Wright D, Rolnik DL, Syngelaki A, Delgado JL, **Tsokaki T**, Leipold G, Akolekar R, Shearing S, De

Stefani L, Jani JC, Plasencia W, Evangelinakis N, Gonzalez-Vanegas O, Persico N, Nicolaides KH. Am J Obstet Gynecol. 2017 Nov;217(5):585.e1-585.e5.

- Διαγνωστικά όρια του γυναικολογικού υπερηχογραφήματος στην εν τω βάθει ενδομητρίωση. Υπερηχογραφία, τόμος 13, τεύχος 1, Ιανουάριος - Απρίλιος 2016. Δερδελής Γ., **Τσοκάκη Θ.**, Περγιαλιώτης Β., Παπαϊωάννου Γ., Παπαντωνίου Ν.
- Αδενομύωση μήτρας και υπερηχογράφημα. Υπερηχογραφία, τόμος 13, τεύχος 1, Ιανουάριος - Απρίλιος 2016. Δερδελής Γ., **Τσοκάκη Θ.**, Περγιαλιώτης Β., Σίμου Μ., Παπαντωνίου Ν.
- Αιμολυτική αναιμία αγνώστου αιτιολογίας στην κύηση. Υπερηχογραφία, τόμος 13, τεύχος 2, Μάιος - Αύγουστος 2016. **Τσοκάκη Θ.**, Περγιαλιώτης Β., Χρέλιας Χ., Θεοδώρου Σ., Παπαντωνίου Ν.
- Εντεροκολίτιδα από κυτταρομεγαλοϊό σε ασθενή με νεφρική μεταμόσχευση. Ελληνική Νεφρολογία 2006:18(4);284-289. Γ. Ευστρατιάδης, Π. Πατεινάκης, Γ. Φλάρης, Μ. Στάγκου, Π. Κιόρτεδε, Δ. Οικονομίδου, Μ. Νικολαΐδης, **Θ. Τσοκάκη**, Σ. Προβατοπούλου, Δ. Μέμμος.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Η συμβολή των υπερηχογραφικών δεικτών κατά το 2^ο τρίμηνο της κύησης για τη διάγνωση της τρισωμίας 21. Μαρίτσα Α., **Τσοκάκη Θ.**, Γεωργιάδου Μ., Βλαχοπούλου Σ., Κομιώτης Ι., Νικολάου Β., Τσιτσής Β. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Ιωάννινα 2-4/09/2022
2. Εμβρυϊκή υπεζωκοτική συλλογή τρίτου τριμήνου. Αλχαζίδου Ε., **Τσοκάκη Θ.**, Πετράκος Γ., Χριστακόπουλος Δ., Γιαλελής Ν., Σιώρη Μ., Βλαχάδης Ν. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία, 1-3 /10/2021
3. Υπερηχογραφική διάγνωση συγγενούς διαφραγματοκήλης. Αλχαζίδου Ε., **Τσοκάκη Θ.**, Πετράκος Γ., Χριστακόπουλος Δ., Γιαλελής Ν., Σιώρη Μ., Βλαχάδης Ν. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία, 1-3 /10/2021

4. Συσχέτιση των γονιδιακών πολυμορφισμών του γονιδίου της SIRT1 και του αντιοξειδωτικού φορτίου στην κύηση με σακχαρώδη διαβήτη. Ε. Προύντζου, Δ. Χούχουλα, Μ. Τράπαλη, Α. Τσαντές, Ρ. Σώκου, Κ. Τσαντέ, Π. Κουλουβάρης, **Θ. Τσοκάκη**, Β. Τσιτσής, Π. Χαλβατσιώτης. 20^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα 18/5 – 21/5/2022
5. Διπλασιασμός εμβρυϊκής νεφρικής πυέλου και το περιγεννητικό αποτέλεσμα. Παρουσίαση περιστατικού. Β. Τσιτσής, **Θ. Τσοκάκη**, Ι. Κομιώτης, Σ. Γαλανοπούλου. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 16/10 – 18/10/2015
6. Περίπτωση κύησης επιπλεγμένη με αιμολυτική αναιμία άγνωστης αιτιολογίας. **Θεοδώρα Τσοκάκη**, Σπυριδούλα Θεοδώρου, Ηλέκτρα Πολύζου, Περικλής Παναγόπουλος, Χαράλαμπος Χρέλιας. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Βόλος 28/5 – 31/5/2015
7. Ρήξη δικέρου μήτρας σε κύηση δευτέρου τριμήνου. **Θεοδώρα Τσοκάκη**, Παρασκευή Στεφάνου, Ευύχιος Τρακάκης, Νικόλαος Παπαντωνίου. 13^ο 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Βόλος 28/5 -31/5/2015
8. Επίπεδα αντιπονεκτίνης, ρεζιστίνης και λεπτίνης στο Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. **Θ.Τσοκάκη**, Π.Χαλβατσιώτης, Β.Τσιτσής, Κ.Τζιάρου, Α.Σπυριδάκη, Θ.Τσίπη, Π.Παναγόπουλος, Χ.Χρέλιας, Π.Καρακίτσος, Δ.Κασσάνος, Γ.Δημητριάδης. 24^η Σύνοδος Μαιευτικής και Γυναικολογικής Εταιρείας, Κυλλήνη 29/5 – 31/5/2014
9. Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία και Κύηση. Παρουσίαση Περιστατικού. **Τσοκάκη Θ.**, Γεωργίου Α., Τσιτσής Β., Βαγγόπουλος Β., Σιούλας Β., Χρέλιας Γ., Χρέλια Κ., Παναγόπουλος Π., Χρέλιας Χ. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 1/11 – 3/11/2013
10. Υπέρβαρα νεογνά και τρόπος τοκετού. Ο ρόλος του Σακχαρώδη Διαβήτη. Παντατοσάκης Ε., Γραμματικάκης Ι., **Τσοκάκη Θ.**, Παπαδημητρίου Γ., Κασσάνος Δ. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα 2/2 – 3/2/2013
11. Μελέτη και σύγκριση της τοκολυτικής δράσης του atosiban και της ριτοδρίνης στην πρόληψη του πρόωρου τοκετού. Κολιαντζάκη Σ., Παναγιώτου Ε.,

Δημητρακόπουλος Σ., Ανδριώτης Α., **Τσοκάκη Θ.** 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Θεσσαλονίκη 17/5 – 20/5/2012

12. Παρουσίαση περιστατικού έκτοπης κύησης σε ουλή καισαρικής τομής και τρόποι διαχείρισής της. Τσιτσής Β., **Τσοκάκη Θ.**, Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Αθήνα 10-12 Δεκεμβρίου 2010
13. Ιστορική αναδρομή της γυναικολογικής επέμβασης της κοιλιακής υστερεκτομής στους νεότερους χρόνους. **Τσοκάκη Θ.**, Δημητρακόπουλος Σ., Ανδριώτης Α., Κολιαντζάκη Σ., Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010
14. Η ιστορία της γυναικολογικής επέμβασης της κοιλιακής υστερεκτομής από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. **Τσοκάκη Θ.**, Δημητρακόπουλος Σ., Ανδριώτης Α., Κολιαντζάκη Σ., Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010
15. Φαρμακευτική αντιμετώπιση ακράτειας ούρων και κατάθλιψης μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με χορήγηση duloxetine. Ανδριώτης Α., Δημητρακόπουλος Σ., Κολιαντζάκη Σ., **Τσοκάκη Θ.**, Καραχάλιου Ε., Λιάτσος Χ., Παπαδημητρίου Δ., Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010
16. Ιστορία της Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής. Ανδριώτης Α., Δημητρακόπουλος Σ., Κολιαντζάκη Σ., **Τσοκάκη Θ.**, Καραχάλιου Ε., Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010
17. Με άλλα μάτια η προσέγγιση της νομικής γωνίας του πρίσματος της τεχνητής έκτρωσης. Δημητρακόπουλος Σ., Ανδριώτης Α., Κολιαντζάκη Σ., **Τσοκάκη Θ.**, Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010
18. Μελέτη αντιμετώπισης ρήξης σφιγκτήρα του πρωκτού σε κοιλιακούς τοκετούς. Δημητρακόπουλος Σ., Ανδριώτης Α., Κολιαντζάκη Σ., **Τσοκάκη Θ.**,

Σιδηρόπουλος Ν. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Διαταραχών Πυελικού Εδάφους, Αθήνα 19 - 21 Μαρτίου 2010

19. Αιτιολογία εξέτασης στο παιδονευρολογικό εξωτερικό ιατρείο τη δωδεκαετία 1994-2005. Τζέτζη Ο., Κοντόπουλος Ε., Παπαδόπουλος Γ., **Τσοκάκη Θ.**, Φιλιππίδου Μ., Ζαφειρίου Δ., Κανακούδη-Τσακαλίδου Φ. 44^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος 9 -11 Ιουνίου 2006
20. Περιγεννητικά προβλήματα μακροσωμικών νεογνών. **Τσοκάκη Θεοδώρα**, Παπαδόπουλος Γεώργιος, Διαμαντή Ελισάβετ, Σαραφίδης Κοσμάς, Δρόσου-Αγακίδου Βασιλική. 12^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας, Λάρισα 5-7 Μαΐου 2006
21. Οι μεταβολές της λιπιδαιμικής εικόνας των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του συνδρόμου. Ευστρατιάδης Γ., Πετρίδου Ο., Προβατοπούλου Σ., **Τσοκάκη Θ.**, Γεωργιάδου Ε., Πάτσιου Α., Μπαντής Χ., Στάγκου Μ., Κουκουρικού Μ., Μέμμος Δ. 3^ο Πολυθεματικό Ιατρικό Συνέδριο, Ξάνθη 30 Σεπτεμβρίου - 2 Οκτωβρίου 2005
22. Φαιοχρωμοκύττωμα. Ρωμανίδου Ο., Προβατοπούλου Σ., **Τσοκάκη Θ.** Διημερίδα Πτυχιακών εργασιών φοιτητών Β' Χειρουργικής Προπαιδευτικής Κλινικής Ιπποκρατείου Γ.Ν.Θ, Θεσσαλονίκη 2-3 Ιουνίου 2006
23. Δοκιμασίες ανίχνευσης και διάγνωσης του σακχαρώδη διαβήτη της εγκυμοσύνης. **Τσοκάκη Θ.**, Παπαδόπουλος Γ., Γουλής Δ., Αθανασιάδης Α., Παπαδήμας Ι., Μπόντης Ι. 11^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας, Αλεξανδρούπολη 13-15 Μαΐου 2005

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Preeclampsia related to untreated Gestational Diabetes Mellitus. Epigenetically affected genes involved in inflammation. P. Halvatsiotis, M. Gazouli, **Th. Tsokaki**, V. Tsitsis, N. Papantoniou, G. Dimitriadis. 13th Annual World Congress On Insulin Resistance, Diabetes & Cardiovascular Disease, Los Angeles 1/12 – 3/12/2015

2. Expression profile of miRNAs in human placentas from pregnancies complicated by Preeclampsia. Alexandra Lykoudi, Aggeliki Kolialexi, Georgia Tounta, Thanasis Papanikolaou, **Theodora Tsokaki**, George Spyrou, Marilena Bourdakou, Emmanouil Athanasiadis, Ariadni Mavrou, Nikolaos Papantoniou. 19th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Washington, DC 12/7 – 15/7/2015
3. Prenatal sonographic appearance of sigmoid colon duplication in a fetus and the perinatal result: A case report. **Th. Tsokaki**, V. Tsitsis, S. Galanopoulou, M. Tsiamantani, A. Bami. 24th European Congress of Perinatal Medicine, Florence 4/6 – 7/6/2014
4. Fetal axillary lymphangioma detected by prenatal ultrasonography: A case report. **Th. Tsokaki**, V. Tsitsis, S. Galanopoulou, G. Kousavelou, D. Ziata. 24th European Congress of Perinatal Medicine, Florence 4/6 – 7/6/2014
5. The use of misoprostole in cervical ripening in full - term pregnancies and the perinatal result. Tsitsis V, **Tsokaki Th.** 23th European Congress of Perinatal Medicine, Paris 13/6 – 16/6/2012
6. Mifepristone and Misoprostol for the termination of intrauterine pregnancy. Tsitsis B., **Tsokaki Th.** 23th European Congress of Perinatal Medicine, Paris 13/6 – 16/6/2012
7. Cesarean scar pregnancy and treatment in a small country hospital. **Tsokaki Th.**, Tsitsis V. The World Congress on building consensus in Gynecology, Infertility and Perinatology, Barcelona 3/5 – 6/5/2012