



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης Εγκύων  
Υψηλού Κινδύνου για Πρόωρο Τοκετό**

**Δανάη Μαυρέλη**

**Μοριακή Βιολόγος-Γενετίστρια, BSc, MSc**

Αθήνα 2023



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

## **Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΓΙΑ ΟΡΙΣΜΟ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 22-9-2017**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 31-10-2017**

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

- Νικόλαος Παπαντωνίου, Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας (Επιβλέπων)
- Δημήτριος Γουργιώτης, Καθηγητής Κλινικής
- Ελένη Φρυσίρα, Καθηγήτρια Γενετικής

**ΔΗΛΩΣΗ ΘΕΜΑΤΟΣ: 8-1-2018**

\*Λόγω αφυπηρέτησης των μελών της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, έγινε αντικατάσταση από τους (Σχετ.61802/18-12-2020)

- Γεώργιο Δασκαλάκη, Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας (Επιβλέπων)
- Ιωάννα-Ραχήλ Traeger -Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής
- Μαριάννα Θεοδωρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 30-10-2023**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1-11-2023**

**ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

1. Γεώργιος Δασκαλάκης, Καθηγητής-Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής
2. Jan Traeger-Synodinos- Καθηγήτρια-Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής
3. Μαριάννα Θεοδωρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας
4. Καλλιόπη Παππά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας
5. Μακάριος Ελευθεριάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας
6. Παναγιώτης Αντσακλής, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
7. Χρισταλένα Σοφοκλέους, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής

**Μετά τη δημόσια υποστήριξη στις 24/04/2024 αποδόθηκε ο βαθμός «Άριστα»**

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Νικόλαος Αρκαδόπουλος**

## Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις που έχουν προκύψει στο πλαίσιο εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής

- Mavreli D, Theodora M, Lambrou G, Avgeris M, Papantoniou N, Traeger-Synodinos J, Daskalakis G, Kolialexi A. **First trimester maternal plasma proteomic changes predictive of spontaneous moderate/late preterm delivery.** J Matern Fetal Neonatal Med. 2023 Dec;36(2):2232074.
- Mavreli D, Theodora M, Avgeris M, Papantoniou N, Antsaklis P, Daskalakis G, Kolialexi A. **First Trimester Maternal Plasma Aberrant miRNA Expression Associated with Spontaneous Preterm Birth.** Int J Mol Sci. 2022 Nov 29;23(23):14972.
- Mavreli D, Theodora M, Kolialexi A. **Known biomarkers for monitoring pregnancy complications.** Expert Rev Mol Diagn. 2021 Nov;21(11):1115-1117.
- Mavreli D, Evangelinakis N, Papantoniou N, Kolialexi A. **Quantitative Comparative Proteomics Reveals Candidate Biomarkers for the Early Prediction of Gestational Diabetes Mellitus: A Preliminary Study.** In Vivo. 2020 Mar-Apr;34(2):517-525.
- Mavreli D, Papantoniou N, Kolialexi A. **miRNAs in pregnancy-related complications: an update.** Expert Rev Mol Diagn. 2018 Jul;18(7):587-589.

## Πίνακας περιεχομένων

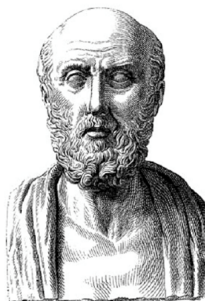
Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής .....	2
<b>Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις που έχουν προκύψει στο πλαίσιο εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής .....</b>	<b>3</b>
Ιπποκράτειος όρκος.....	7
Όρκος του Ιπποκράτη .....	8
Σύντομο Βιογραφικό .....	9
Περίληψη .....	18
Abstract .....	20
Πρόλογος.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	24
ΠΡΟΩΡΟΣ ΤΟΚΕΤΟΣ.....	24
1.1 Ορισμός.....	25
1.2 Προσδιορισμός της ηλικία κύησης.....	25
1.3 Κατηγορίες Πρόωρου Τοκετού .....	26
1.3.1 Ιατρογενής Πρόωρος Τοκετός.....	27
1.3.2 Πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων (PPROM) .....	27
1.3.3 Αυτόματος Πρόωρος Τοκετός.....	27
1.4 Επιπτώσεις Πρόωρου Τοκετού .....	28
1.5 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	29
1.6 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί πρόωρου τοκετού .....	30
1.6.1 Αγγειακές βλάβες στο πλακούντα-Αποκόλληση πλακούντα.....	30
<b>1.6.2 Λοίμωξη- Ενδομήτρια φλεγμονή .....</b>	<b>31</b>
<i>Φλεγμονώδεις κυτοκίνες.....</i>	<i>32</i>
<i>Φλεγμονώδης αντίδραση μετά από λοίμωξη με Gram αρνητικά στελέχη.....</i>	<i>33</i>
<b>1.6.3 Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6.4 Μειωμένη ανεκτικότητα της μήτρας (το έμβρυο ως αλλομόσχευμα) .....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.5. Υπερδιάταση της μήτρας και ανεπάρκεια του τραχήλου .....</b>	<b>35</b>
<b>1.6.6 Ελεύθερο εμβρυικό DNA πλάσματος εγκύου (cell-free fetal DNA) .....</b>	<b>35</b>
<b>1.7 Παράγοντες κινδύνου .....</b>	<b>36</b>
Πίνακας 2. Προδιαθεσικοί παράγοντες αυτόματου πρόωρου τοκετού.....	37
<b>1.8 Ενδομήτριες λοιμώξεις και πρόωρος τοκετός .....</b>	<b>43</b>
<b>1.9 Γενετική βάση Πρόωρου Τοκετού .....</b>	<b>44</b>

<b>1.9.1 Γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη αντίδραση-αιμορραγία και μυομητρική δραστηριότητα.</b>	44
<b>1.9.2 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος</b>	46
<b>1.9.3 Επιγενετική</b>	47
<b>1.10 Πρόληψη πρόωρου τοκετού</b>	48
<b>1.10.1 Πρωτογενής πρόληψη</b>	48
<b>1.10.2 Πρόληψη του πρόωρου τοκετού σε κυήσεις υψηλού κινδύνου</b>	48
<i>Συμπληρώματα προγεστερόνης</i>	49
<i>Τοποθέτηση πεσσού</i>	50
<i>Περίδεση τραχήλου</i>	50
<b>1.11 Πρόβλεψη του κινδύνου για πρόωρο τοκετό</b>	51
<b>1.11.1 Μοντέλα πρόβλεψης με βάση τους παράγοντες κινδύνου</b>	51
<b>1.11.2 Βιοχημικοί Βιοδείκτες πρόβλεψης του κινδύνου για πρόωρο τοκετό</b>	52
<b>1.11.3 Βιοφυσικοί δείκτες- Υπερηχογραφική εκτίμηση του μήκους του τραχήλου</b>	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	59
ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ	59
2.1 Εισαγωγή στην Πρωτεωμική	60
2.2 Τεχνολογία της Πρωτεωμικής	61
2.2.1 Διαχωρισμός πρωτεϊνών	61
2.2.2 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC)	63
2.2.3 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με Φασματογραφία μάζας	64
<b>2.2.4 Μέθοδοι ιονισμού</b>	66
2.2.5 Αναλυτής μαζών (mass analyzer)	67
2.3 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών	68
2.3.1 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών χωρίς επισήμανση	69
2.3.2 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με επισήμανση	69
2.3.3 Στοχευμένη ποσοτικοποίηση	70
2.4 Χρησιμοποίηση της πρωτεωμικής για την ανίχνευση βιοδεικτών	71
2.4.1 Βιοδείκτες και κύηση	72
2.5.2 Χρησιμοποίηση της πρωτεωμικής για την μελέτη επιπλοκών της κύησης	72
2.4.3 Πρωτεωμική και πρόωρος τοκετός	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	78
ΣΚΟΠΟΣ	78
<b>3.1 Σκοπός</b>	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	80

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	80
4.1 Συλλογή Βιολογικού υλικού .....	81
4.2 Επιλογή δειγμάτων για ανάλυση .....	82
4.3 Διασφάλιση προσωπικών δεδομένων .....	84
5.1 Απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλής συγκέντρωσης.....	86
5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών .....	86
5.3 Προετοιμασία των δειγμάτων- Ενζυμική πέψη.....	87
5.4 Σήμανση των πεπτιδίων με ισοβαρείς ιχνηθέτες (iTRAQ).....	87
5.5 Κλασματοποίηση των iTRAQ σημασμένων πεπτιδίων και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματογραφία μάζας.....	89
5.6 Ανάλυση των δεδομένων της MS/MS φασματομετρίας μάζας με βιοπληροφορική .....	91
6.7 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) .....	91
5.8 Ανοσοενζυματική δοκιμασία (ELISA).....	92
5.9 Στατιστική ανάλυση.....	93
6.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων της μελέτης .....	95
6.2 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών με μεθόδους πρωτεωμικής στο πλάσμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης .....	96
6.3 Ταυτοποίηση του ρυθμιστικού ρόλου των πρωτεϊνών και των ρυθμιστικών οδών των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση .....	98
6.4 Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης με Elisa.....	106
6.5 Αξιολόγηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των πρωτεϊνών για τη πρώιμη ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για αυτόματο Πρόωρο Τοκετό.....	107
Μεταβλητή .....	109
Covariant .....	109
7.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	111
7.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	121
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	155
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 .....	156
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 .....	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Ιπποκράτειος όρκος

Όμνυμι Απόλλωνα ιητρών, και Άσκληπιόν, και Υγείαν, και Πανάκειαν, και θεούς πάντας τε και πάσας, ίστορας ποιούμενος, έπιτελέα ποιήσιν κατά δύναμιν και κρίσιν έμην όρκον τόνδε και ξυγγραφην τήνδε. Ηγήσασθαι μέν τον διδάξαντά με την τέχνην ταύτην ίσα γενέτησιν έμοϊσι, και βίου κοινώσασθαι, και χρεών χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, και γένος τò έξ ωυτέου άδελφοϊς ίσον έπικρινέειν άρρеси, και διδάξειν την τέχνην ταύτην, ην χρηίζωσι μανθάνειν, άνευ μισθοϋ και ξυγγραφής, παραγγελίης τε και άκροήσιος και τής λοιπής άπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υιοϊσί τε έμοϊσι, και τοϊσι τοϋ έμέ διδάξαντος, και μαθηταϊσι συγγεγραμμένοισί τε και ώρκισμένοις νόμω ιητρικῶ, άλλω δέ ουδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι έπ' ώφελείη καμνόντων κατά δύναμιν και κρίσιν έμην, έπι δηλήσει δέ και άδική ειρξειν. Ου δώσω δέ ουδέ φάρμακον ουδενί αιτηθείς θανάσιμον, ουδέ ύφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Όμοίως δέ ουδέ γυναικι πεσσόν φθόριον δώσω. Άγνως δέ και όσίως διατηρήσω βίον τον έμόν και τέχνην την έμην. Ου τεμέω δέ ουδέ μην λιθιώντας, έκχωρήσω δέ έργάτησιν άνδράσι πρήξιος τήσδε. Ές οικίας δέ όκόσας αν έσίω, έσελεύσομαι έπ' ώφελείη καμνόντων, έκτός έών πάσης άδικής εκουσίης και φθορίης, τής τε άλλης και άφροδισίων έργων έπί τε γυναικειών σωμάτων και άνδρώνων, έλευθέρων τε και δούλων. Ά δ' αν έν θεραπειή η ίδω, η άκούσω, η και άνευ θεραπηίης κατά βίον άνθρώπων, α μη χρη ποτε έκλαλέεσθαι έξω, σιγήσομαι, άρρήτα ηγεύμενος ειΐναι τα τοιαϋτα. Όρκον μέν οϋν μοι τόνδε έπιτελέα ποιέοντι, και μη ξυγγέοντι, ειη έπαύρασθαι και βίου και τέχνης δοξαζομένω παρα πᾶσιν άνθρώποις ές τον αιεί χρόνον. παραβαίνοντι δέ και έπιορκοϋντι, τάναντία τουτέων.

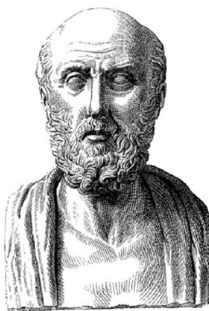


Ιπποκράτης (460 π.Χ. - 377 π.Χ.)

## Όρκος του Ιπποκράτη

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.





Γαλιλαίος (460 π.Χ. - 377 π.Χ.)

## Σύντομο Βιογραφικό

### Δανάη Μαυρέλη Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

#### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία Γέννησης: 03-03-1993

Διεύθυνση Ηλεκτρονικού Ταχυδρομείου: [dmavreli@med.uoa.gr](mailto:dmavreli@med.uoa.gr)

#### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΤΙΤΛΟΙ

##### 2017-σήμερα

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή Υποψήφια διδάκτωρ (PhD)- Α΄ Μαιευτική- Γυναικολογική Κλινική και Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής

##### 2018-2019

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (MSc) «Παθολογία της Κύησης».

##### 2017

Αναγνώριση των τίτλων BSc (King's College, London) και MSc (University College London) από ΔΟΑΤΑΠ ως πτυχίο ισότιμο προς τα απονεμόμενα από Ελληνικά ΑΕΙ.

##### 2015

University College London (UCL), Institute for Women's Health London, UK Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (MSc)- Prenatal Genetics and Fetal Medicine ( Προγεννητική Γενετική και Εμβρυϊκή Ιατρική)

##### 2011

International Baccalaureate (IB), Σχολή Μωραΐτη, Αθήνα

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**2017-2019:** Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατρικής Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία».

Τεχνικές

- Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από ελεύθερο DNA πλάσματος εγκύου για την διάγνωση του συστήματος RhD του εμβρύου και συγκεκριμένων αλληλουχιών στα φυλετικά χρωμοσώματα (DYS, SRY).
- Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) για την διάγνωση γενετικών νοσημάτων που προκαλούνται από μικροελλείψεις γενετικού υλικού (DiGeorge, Williams Syndrome).
- Απομόνωση DNA/RNA, multiplex PCR, RT-q-PCR, miRNA Μικροσυστοιχίες, σύστημα μαζικής αλληλούχισης miSeq, Western blot, Στατιστική Ανάλυση.

**2016: Τμήμα Αναπτυξιακής Γενετικής, Francis-Crick Institute,( Υπευθυνος: Dr James Turner)**

Τεχνικές PCR, Next Generation Sequencing, RT-PCR, qPCR, Western blotting, histological approaches to visualise tissue level phenotypic abnormalities.

**Ιούνιος-Αύγουστος 2013:** Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατρικής Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία»

- Εξωτερικό ιατρείο κλινικής γενετικής και γενετικής συμβουλευτικής (Υπεύθυνη Καθ. Σ. Κίτσιου).
- Τεχνικές Μοριακής Κυτταρογενετικής (Υπεύθυνη Dr. Α. Κολιαλέξη).

**Ιούλιος-Αύγουστος 2012:** Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Τομέας Πρωτεωμικής (Υπεύθυνος Dr. Γ. Τσάγκαρης).

- Τεχνικές πρωτεωμικής (2D-E, MALDI TOF MS/MS).
- Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο «First trimester prediction of preeclampsia using protein biomarkers» με στόχο την αναγνώριση πρωτεωμικών δεικτών στο πλάσμα εγκύων για την πρώιμη ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας.

**Ιούνιος-Αύγουστος 2010:** Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Β' Παιδιατρική Κλινική ΕΚΠΑ, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διάγνωσης (Υπεύθυνος Καθ. Δ. Γουργιώτης).

- Τεχνικές μοριακής βιολογίας (DNA, RNA extraction, PCR primer design, PCR, RT-PCR, q-PCR, MLPA και sequencing).

#### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΟΥΜΕΝΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ**

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

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Ν. Παπαντωνίου

Φορέας χρηματοδότησης: Αριστεία-Συγχρηματοδότηση από την Ελλάδα και την ΕΕ μέσω κονδυλίων ΕΣΠΑ

Θέση: Βοηθός Ερευνητή.

2. Τίτλος Προγράμματος: **«Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης»** (2018-2019)

Ακαδημαϊκός Υπεύθυνος: Ν. Παπαντωνίου

Φορέας χρηματοδότησης: Συγχρηματοδότηση από την Ελλάδα και την ΕΕ μέσω ΕΣΠΑ (Κ.Α. 70/3/14993)-Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Διά Βίου Μάθησης «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους Νέους Ερευνητές».

Θέση: Υπότροφος-Ερευνήτρια.

#### **ΒΡΑΒΕΙΑ**

- 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 2019, Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης.

*Τίτλος εργασίας: Τα miRNAs ως δείκτες πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας όψιμης έναρξης*

- 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία, Ιωάννινα 2022, Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης.

*Τίτλος εργασίας: Τα miRNAs ως βιοδείκτες πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό*

## ΥΠΟΤΡΟΦΙΑ

**2018-2019:** Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και διά Βίου Μάθησης, Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους Νέους Ερευνητές» Συγχρηματοδότηση από την Ελλάδα και την ΕΕ, Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές - ΕΣΠΑ, Κ.Α. 70/3/14993  
Ακαδημαϊκός Υπεύθυνος: Ν. Παπαντωνίου

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΥΠΟ

1. Mavreli D, Theodora M, Lambrou G, Avgeris M, Papantoniou N, Traeger-Synodinos J, Daskalakis G, Kolialexi A. **First trimester maternal plasma proteomic changes predictive of spontaneous moderate/late preterm delivery.** J Matern Fetal Neonatal Med. 2018 (in press)
2. Mavreli D, Theodora M, Avgeris M, Papantoniou N, Antsaklis P, Daskalakis G, Kolialexi A. **First Trimester Maternal Plasma Aberrant miRNA Expression Associated with Spontaneous Preterm Birth.** Int J Mol Sci. 2022 Nov 29;23(23):14972.
3. Mavreli D, Theodora M, Kolialexi A. **Known biomarkers for monitoring pregnancy complications.** Expert Rev Mol Diagn. 2021 Nov;21(11):1115-1117.
4. Mavreli D, Lykoudi A, Lambrou G, Papaioannou G, Vrachnis N, Kalantaridou S, Papantoniou N, Kolialexi A. **Deep Sequencing Identified Dysregulated Circulating MicroRNAs in Late Onset Preeclampsia.** In Vivo. 2020 Sep-Oct;34(5):2317-2324.
5. Mavreli D, Evangelinakis N, Papantoniou N, Kolialexi A. **Quantitative Comparative Proteomics Reveals Candidate Biomarkers for the Early Prediction of Gestational Diabetes Mellitus: A Preliminary Study.** In Vivo. 2020 Mar-Apr;34(2):517-525.
6. Mavreli D, Papantoniou N, Kolialexi A. miRNAs in pregnancy-related complications: an update. Expert Rev Mol Diagn. 2018 Jul;18(7):587-589.
7. Kolialexi A, Mavreli D, Papantoniou N **Proteomics for early prenatal screening of pregnancy complications: a 2017 perspective.** Expert Rev Proteomics. 2017 Feb;14(2):113-115
8. Kolialexi A, Tsangaris GT, Sifakis S, Gourgiotis D, Katsafadou A, Lykoudi A, Marmarinos A, Mavreli D, Pergialiotis V, Fexi D, Mavrou A, Papaioanou GK, Papantoniou N. **Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia.** Expert Rev Proteomics. 2017 Mar;14(3):269-276.

9. Lycoudi A, Mavreli D, Mavrou A, Papantoniou N, Kolialexi A. **miRNAs in pregnancy-related complications**. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(8):999-1010.
10. Kolialexi A, Gourgiotis D, Daskalakis G, Marmarinos A, Lykoudi A, Mavreli D, Mavrou A, Papantoniou N. **Validation of serum biomarkers derived from proteomic analysis for the early screening of preeclampsia**. Dis Markers. 2015;2015: 121848.
11. Kolialexi A, Mavreli D, Tounta G, Mavrou A, Papantoniou N. **Urine proteomic studies in preeclampsia**. Clin Appl. 2015 Jun;9(5-6):501-6.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΒΙΒΛΙΑ

1. Danay Mavreli, Nikolas Papantoniou, Aggeliki. Kolialexi: The genetic basis of miscarriage. In «Miscarriages: Diagnosis, Management and coping strategies». Authors/Editors: Virginia Pannel. Nova Science NY, 155-166, 2014.
2. Angellike Kolialexi, Georgia Tounta, Danay Mavreli, Ariadni Mavrou, Nikolas Papantoniou: Non-Invasive Prenatal Diagnosis for Fetal Sex Determination. In Sex Chromosomes: New Research. Author/Editors: Mario D'Aquino and Vincente Stallone. Nova Science NY, 139-150, 2013.

#### ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Kolialexi A, Tsangaris GTh, Sifakis S, Katsafadou A, Anagnostopoulos AK, Lykoudi A, Mavreli D, Papaioannou GK, Mavrou A. **Plasma biomarkers for early identification of women at risk for preeclampsia**.
  - 19<sup>th</sup> International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Washington DC, USA, 2015.
  - 37<sup>th</sup> Fetoscopy Meeting, Barcelona, 2015
2. Papantoniou N, Lykoudi A, Antsaklis P, Papadopoulos P, Mavreli D, Kitsiou-Tzeli S, Kolialexi A. Overexpression of miR-518b and miR-519a in preeclamptic placentas.
  - 32nd Congress of «Fetus as a patient» Society, Tirana, Albania, 2016
  - 12<sup>th</sup> meeting of the International Academy of Perinatal Medicine (IAPM), 2016
3. Anagnostopoulos AK, Kolialexi A, Taraslia V, Mavreli D, Lignou C, Vastardis H, Anastasiadou E, Tsangaris GT. **A primary cell line for Down syndrome studies**. 16<sup>th</sup> Human Proteome Organisation Word Congress, Dublin, Ireland, 2017

4. Kolialexi A, Mavreli D, Papantoniou N. **High Throuput Sequencing identified miRNAs as candidate biomarkers for late onset Preeclampsia**. 40<sup>th</sup> Fetoscopy Meeting, Bologna, 2018
5. Mavreli D, Mavrou A, Lykoudi A, Papaioannou GK, Papantoniou N, Kolialexi A. **Proteomic Biomarkers for the early prediction of early-onset Preeclampsia**. Symposium in Clinical Genetics & Genomics-18<sup>th</sup> Educational Seminar in Genetics, Athens, 2018.
6. Mavreli D, Lykoudi A, Lambrou G, Papaioannou G, Kalantaridou S, Papantoniou N, Kolialexi A. **Down-regulation of miR-23b and miR-99b in 1<sup>st</sup> trimester maternal plasma in women at risk for late preeclampsia using deep sequencing**. 23<sup>rd</sup> International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Singapore, 2019.
7. Kolialexi A, Mavreli D, Evangelinakis N, Papantoniou N. **Proteomic Biomarkers for the Early Prediction of Gesttional Diabetes**. 23<sup>rd</sup> International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Singapore, 2019

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Λυκούδη Α, Κολιαλέξη Α, Μπραουδάκη Μ, Μαυρέλη Δ, Παπανικολάου Α, Ισόπουλος Θ, Τσοκάκη Θ, Σπύρου Γ, Μπουρδάκου Μ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. **Μελέτη των miRNAs του πλακούντα σε κυήσεις με Προεκλαμψία**. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 2015
2. Κολιαλέξη Α, Τσάγκαρης Γ, Σηφάκης Σ, Κατσαφάδου Α, Λυκούδη Α, Μαυρέλη Δ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. **Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης της Προεκλαμψίας**. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 2015
3. Λυκούδη Α, Κολιαλέξη Α, Μαυρέλη Δ, Μπραουδάκη Μ, Λάμπρου Γ, Τζέτη Μ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. **Ανάλυση του προτύπου έκφρασης των miRNAs σε κυήσεις με προεκλαμψία**. 2<sup>ο</sup> Συνέδριο ΣΙΓΕ «Διερευνώντας το Γονιδίωμα του ανθρώπου, αντιμετωπίζοντας τα γενετικά νοσήματα», Αθήνα, 2016
4. Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης της προεκλαμψίας. Κολιαλέξη Α, Τσάγκαρης Γ, Σηφάκης Σ, Γουργιώτης Δ, Κατσαφάδου Α, Λυκούδη Α, Μαρμαρινός Α, Περγιαλιώτης Β, Μαυρέλη Δ, Μαύρου Α, Παπαντωνίου Ν. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική-Γυναικολογία, Θεσσαλονίκη, 2017
5. Μαυρέλη Δ, Κολιαλέξη Α, Λυκούδη Α, Λάμπρου Γ, Παπαιωάννου Γ, Καλανταρίδου Σ, Παπαντωνίου Ν. **Τα miRNAs ως δείκτες πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Προεκλαμψίας όψιμης έναρξης**. 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα, 2019.

6. Μαυρέλη Δ., Θεοδωρά Μ., Παπαντωνίου Ν., Αντσακλής Π., Δασκαλάκης Γ., Κολιαλέξη Α. **Τα miRNAs ως βιοδείκτες πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό.** 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία, Ιωάννινα 2022.

7. Μαυρέλη Δ., Κολιαλέξη Α., Αντσακλής Π., Traeger-Synodinos J., Παπαντωνίου Ν., Δασκαλάκης Γ., Θεοδωρά Μ.,. **Πρωτεωμικοί δείκτες πρώιμης ανίχνευσης πρόωρου τοκετού.** 22ο Πανελλήνιο συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 2022.

## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**Σεπτέμβριος 2015– Ιούνιος 2016:** Business Development Associate, Clarivate Analytics, London, UK: Το επιστημονικό τμήμα της Clarivate Analytics συνεργάζεται με εταιρείες βιοτεχνολογίας για την επιτυχή αντιμετώπιση των προκλήσεων στην έρευνα του φαρμάκου, τις νέες επενδύσεις και τις συνεργασίες, τη νομοθεσία και την κυκλοφορία των προϊόντων.

**Ιούλιος 2019- τωρα: Senior Scientific Liaison, Causaly, Αθίνα** - Η Causaly επιταχύνει τον τρόπο με τον οποίο οι άνθρωποι αποκτούν γνώση και αναπτύσσουν εισαγωγές στη βιοϊατρική. Επιτρέπουμε στους ερευνητές και τους λήπτες αποφάσεων να ανακαλύπτουν στοιχεία από εκατομμύρια ακαδημαϊκές δημοσιεύσεις, κλινικές δοκιμές, ρυθμιστικά έγγραφα, διπλώματα ευρεσιτεχνίας και άλλες πηγές δεδομένων σε λίγα λεπτά.

## ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ιούνιος 2015:** Color Run UK, Εθελόντρια, London, UK

**Ιούνιος 2012:** Medical Brigades, Global Brigades, Μαθητικός Εθελοντικός Οργανισμός  
Εγκατάσταση κλινικής σε ένα μικρό χωριό στη Γκάνα. Η κλινική περιελάμβανε υποδοχή ασθενών και καταγραφή συμπτωμάτων, ιατρική γνωμάτευση, φαρμακείο, ενημέρωση και εκπαίδευση για θέματα δημόσιας υγείας. Όλοι οι εθελοντές εργάστηκαν διαδοχικά σε όλα τα τμήματα της κλινικής.

## ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Γνώση ηλεκτρονικών υπολογιστών

MS Office, IGCSE University of Cambridge, UK.

● **Ξένες Γλώσσες**

Αγγλικά: Άριστα

Γαλλικά: DALF C1, DELF B2, B1, A2, A1



***Στην οικογένειά μου.....***

## Περίληψη

**Σκοπός:** Σκοπός της μελέτης είναι η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πρόωμη πρόβλεψη και τον παθογενετικό μηχανισμό του πρόωρου τοκετού με μελέτη της έκφρασης τους στο περιφερικό αίμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που αργότερα διεκπεραίωσαν τον τοκετό πρόωρα, μεταξύ 320/7 και 366/7 εβδομάδων κύησης σε σχέση με εγκύους με τελειόμηνη κύηση

**Βιολογικό υλικό & Μεθοδολογίες:** Κατά το πρώτο στάδιο της μελέτης, το διερευνητικό, έγινε ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης με μεθόδους πρωτεωμικής, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), σε συνδυασμό με διαδοχική φασματογραφία μάζας (MS/MS) και επισήμανση των πρωτεϊνών με αντιδραστήρια iTRAQ, σε δείγματα πλάσματος από 5 εγκύους με πρόωρο τοκετό και 5 με τελειόμηνες κυήσεις (ομάδα ελέγχου). Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων με μεθόδους βιοπληροφορικής, για την ταυτοποίηση των ρυθμιστικών οδών στις οποίες συμμετέχουν και την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) (βιολογική διαδικασία, μοριακή λειτουργία και κυτταρική σύσταση).

Κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης, το στάδιο της επιβεβαίωσης, επικυρώθηκε η διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν κατά το διερευνητικό στάδιο με στοχευμένη ποσοτικοποίηση επιλεγμένων πρωτεϊνών με ενζυμική ανοσοπροσοφητική δοκιμασία (ELISA) σε 58 δείγματα περιφερικού αίματος, 29 από εγκύους που στη συνέχεια διεκπεραίωσαν την κύηση με αυτόματο πρόωρο τοκετό μεταξύ 320/7 και 366/7 εβδομάδων και 29 από εγκύους χωρίς την επιπλοκή.

**Αποτελέσματα:** Συγκριτική ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης οδήγησε στη ταυτοποίηση 142 πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων από τις οποίες 54 παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση σε εγκύους που τελικά γέννησαν με αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 320/7 και 366/7 εβδομάδες κύησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (λόγος ιόντων αναφοράς >1.5) και 88 με μειωμένη έκφραση (λόγος ιόντων αναφοράς <0.5). Δεν ανιχνεύτηκαν πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων που να πληρούν τις προϋποθέσεις στατιστικής σημαντικότητας ( $p < 0.05$ ). *In silico* ανάλυση έδειξε ότι οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό εμπλουτίζονται κυρίως στην ρυθμιστική οδό της πήξης και στην οδό του συμπληρώματος και επιβεβαιώνουν την εμπλοκή του αιμοστατικού συστήματος και την

ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον παθογενετικό μηχανισμό που οδηγεί στην εμφάνιση της επιπλοκής. Κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης για περαιτέρω επιβεβαίωση επιλέχθηκαν τρεις πρωτεΐνες οι VCAM-1, SAA και Talin-1, με την πλέον σημαντική τιμή  $p$  (μικρότερη τιμή  $p$ ). Η ανάλυση επιβεβαίωσε τα ευρήματα της πρωτεωμικής ανάλυσης και αποκάλυψε μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που εμφάνισαν στη συνέχεια αυτόματο πρόωρο τοκετό. Στατιστική ανάλυση έδειξε τη δυνατότητα να διακρίνουν τις εγκύους υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό από εκείνες που με  $AUC > 0,8$  και  $p < 0,05$ . Σύμφωνα με το μοντέλο πολυμεταβλητής παλινδρόμησης, οι πρωτεΐνες VCAM 1 ( $p = 0,001$ ) και Talin -1 ( $p < 0,001$ ) μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια τον επακόλουθο αυτόματο πρόωρο τοκετό ανεξάρτητα από τους παράγοντες που μελετήθηκαν (ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού,, κάπνισμα, BMI πριν από την εγκυμοσύνη, ηλικία εγκύου, φύλο εμβρύου και τρόπος σύλληψης)

**Συμπεράσματα:** Στη παρούσα μελέτη η χρησιμοποίηση της τεχνολογίας της πρωτεωμικής για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης στο περιφερικό αίμα εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης οδήγησε στη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών Talin-1 και VCAM-1, ως υποψήφιους βιοδείκτες που συνδέονται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης αυτόματου πρόωρου τοκετού.

Οι βιοδείκτες αυτοί, μετά από αξιολόγηση σε ευρείας κλίμακας μελέτες, μπορούν να διευκολύνουν την κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της επιπλοκής και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων και χαμηλού κόστους προβλεπτικών δοκιμασιών που θα αλλάξουν ριζικά τον τρόπο διαχείρισης της κύησης. Αποτελούν επιπλέον πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

## Abstract

**Aim:** To identify proteins related to the early prediction and the pathogenic mechanism of preterm delivery by examining their expression in the peripheral blood of pregnant women during the first trimester, who later experienced preterm delivery between 32/7 and 36/7 weeks of gestation, in comparison to women with full-term pregnancies.

**Materials & Methods:** In the exploratory phase of the study, protein expression analysis was conducted using proteomic methods, including high-performance liquid chromatography (HPLC) in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS) and protein labeling with iTRAQ reagents, on plasma samples from 5 pregnant women with preterm delivery and 5 with full-term pregnancies (control group). Subsequently, proteins with differential expression between the two groups were analyzed using bioinformatics methods to identify the regulatory pathways involved, along with Gene Ontology analysis (biological process, molecular function, and cellular component).

In the validation phase of the study, differential expression of identified proteins from the exploratory phase was confirmed using targeted quantitative analysis of selected proteins via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 58 peripheral blood samples, 29 from pregnant women who later experienced preterm delivery between 32/7 and 36/7 weeks, and 29 from pregnant women without complications.

**Results:** Comparative analysis of protein expression led to the identification of 142 proteins with differential expression between the two groups, among which 54 showed increased expression in pregnant women who ultimately gave birth prematurely at 32/7 and 36/7 weeks of gestation compared to the control group (fold change >1.5), while 88 showed decreased expression (fold change <0.5). No proteins with differentially expressed levels meeting the criteria for statistical significance ( $p < 0.05$ ) were detected. In silico analysis revealed that proteins with differential expression in the plasma of women with automatic preterm delivery are primarily enriched in the coagulation regulatory pathway and the complement pathway, confirming the involvement of the hemostatic system and complement activation in the pathogenic mechanism leading to the complication.

In the second stage of the study for further confirmation, three proteins - VCAM-1, SAA, and Talin-1 - were selected with the most significant p-value (lowest p-value). The analysis confirmed the findings of the proteomic analysis and revealed reduced levels of VCAM-1,

SAA, and Talin-1 proteins in the plasma of pregnant women during the first trimester who subsequently experienced automatic preterm delivery. Statistical analysis demonstrated the ability to distinguish high-risk pregnant women for automatic preterm delivery from those with  $AUC > 0.8$  and  $p < 0.05$ . According to the multivariate regression model, VCAM-1 ( $p = 0.001$ ) and Talin-1 ( $p < 0.001$ ) proteins can accurately predict subsequent automatic preterm delivery independently of the studied factors (history of automatic preterm delivery, smoking, BMI before pregnancy, maternal age, fetal gender, and method of conception).

**Conclusion:** In this study, the use of proteomic technology for studying protein expression in the peripheral blood of pregnant women during the first trimester led to the identification of Talin-1 and VCAM-1 proteins as potential biomarkers closely associated with the risk of automatic preterm delivery. These biomarkers, after evaluation in large-scale studies, may facilitate understanding of the pathophysiological mechanism of the complication and contribute to the development of specialized and cost-effective predictive tests that will revolutionize pregnancy management. Additionally, they represent potential therapeutic targets.

## Πρόλογος

Η ταυτοποίηση νέων βιολογικών δεικτών που θα μπορούν να ανιχνεύσουν κυήσεις υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό αλλά και να αποσαφηνίσουν τον παθογενετικό μηχανισμό που εμπλέκεται στην εκδήλωση της επιπλοκής αποτελεί στόχο όλων όσων ασχολούνται με τον τομέα της εμβρυομητρικής ιατρικής. Οι βιοδείκτες που αναζητούνται πρέπει να έχουν δυνατότητα να ανιχνεύουν κυήσεις υψηλού κινδύνου, με ευαισθησία, ειδικότητα και σε πρώιμο στάδιο της κύησης καθώς η έγκαιρη ανίχνευση αποτελεί σημαντικό παράγοντα αποτελεσματικής θεραπευτικής παρέμβασης. Επιπλέον, οι νέοι βιοδείκτες θα πρέπει να ανιχνεύονται σε βιολογικά υλικά που συλλέγονται με μη επεμβατικές μεθόδους, η ποσοτικοποίηση τους σε κλινικό επίπεδο να είναι εύκολη και οικονομική και τα αποτελέσματα των μετρήσεων να αντανακλούν με αξιοπιστία την εξέλιξη της κύησης.

Μέσα από τις γραμμές αυτές, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Γεώργιο Δασκαλάκη, Διευθυντή της Α΄Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής ΕΚΠΑ, επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος της διατριβής, και το ενδιαφέρον του για την ολοκλήρωση της μελέτης.

Την Καθηγήτρια κα Traeger-Συνοδινού, Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, ΕΚΠΑ, ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη υποστήριξη της, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις πολύτιμες συμβουλές.

Εγκάρδιες ευχαριστίες οφείλω επίσης στην επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ Μαριάννα Θεοδωρά για την ουσιαστική συμβολή της στο σχεδιασμό της μελέτης, την επιλογή των δειγμάτων για ανάλυση, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή των κειμένων. Η άρτια επιστημονική της κατάρτιση και η συνεχής καθοδήγησή της ήταν πολύτιμα σε κάθε στάδιο της μελέτης.

Επιθυμώ επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες στον κ. Νικόλαο Παπαντωνίου, Ομότιμο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας-Εμβρυομητρικής Ιατρικής που από την πρώτη στιγμή στήριξε έμπρακτα την μελέτη αυτή παρέχοντας καθοδήγηση, γνώσεις και εμπειρία. Αποτελεί παράδειγμα καθηγητή που εμπιστεύεται και δίνει ευκαιρίες στους νέους επιστήμονες και με προσωπική επίβλεψη φροντίζει για την συνεχή εκπαίδευση τους.

Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφερθώ στην σημαντική βοήθεια της Dr. Αγγελικής Κολιαλέξη για την συστηματική καθοδήγηση σε όλες τις φάσεις εκπόνησης και συγγραφής

της μελέτης και του Dr. Γεωργίου Λάμπρου για τη συμβολή του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων με μεθόδους Βιοπληροφορικής.

Τέλος θέλω ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω τους ιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό της Μονάδας Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, για τη συλλογή των δειγμάτων και των κλινικών/δημογραφικών στοιχείων των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## **ΠΡΟΩΡΟΣ ΤΟΚΕΤΟΣ**



## 1.1 Ορισμός

Πρόωρος, ορίζεται ο τοκετός που πραγματοποιείται πριν την συμπλήρωση 37 εβδομάδων κύησης ή 259 ημερών από την πρώτη ημέρα της τελευταίας εμμήνου ρύσεως (TEP) [1],[2]. Η έναρξη του τοκετού καθορίζεται με επιβεβαιωμένη καταγραφή ρυθμικών και επώδυνων συσπάσεων της μήτρας (τουλάχιστον 1 σύσπαση ανά 10 λεπτά της ώρας), αυτόματη ρήξη των εμβρυικών υμένων ή με μεταβολές του τραχήλου. Ο όρος απειλούμενος πρόωρος τοκετός χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση που χαρακτηρίζεται από συστολές της μήτρας χωρίς μεταβολή του τραχήλου [3].

Η διατύπωση αυτή του πρόωρου τοκετού δεν περιλαμβάνει το κατώτερο όριο, δηλαδή την εβδομάδα κύησης που καθορίζεται ως το όριο μεταξύ πρόωρου τοκετού και αυτόματης έκτρωσης ή αποβολής (όριο βιωσιμότητας). Το όριο αυτό ποικίλει διεθνώς και εξαρτάται από την σχετική νομοθεσία. Γενικώς, κυμαίνεται από την 20<sup>η</sup> έως την 28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [4]. Στις Η.Π.Α. το όριο αυτό είναι η 20<sup>η</sup> εβδομάδα, ενώ στην Ελλάδα, από το 2018, η 22<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [1],[5]

Ο πρόωρος τοκετός είναι απαραίτητο να διαχωριστεί από δύο διαφορετικές κλινικές οντότητες, την ανεπάρκεια τραχήλου και τη πρώιμη μυομητρική δραστηριότητα [6]. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται μεταβολή των χαρακτηριστικών του τραχήλου, χωρίς συστολές του μυομητρίου, και αντιμετωπίζεται διαφορετικά από τον οξύ τοκετό. Η δεύτερη κλινική οντότητα, η πρώιμη μυομητρική δραστηριότητα, δεν συνοδεύεται από μεταβολή των χαρακτηριστικών του τραχήλου και δεν απαιτείται άμεση παρέμβαση, εκτός ίσως από ήπιο περιορισμό της φυσικής δραστηριότητας.

## 1.2 Προσδιορισμός της ηλικίας κύησης

Ο ορισμός του πρόωρου τοκετού, όπως διατυπώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), προήλθε από στατιστική ανάλυση της κατανομής της ηλικίας κύησης κατά τον τοκετό, με βάση τη πρώτη ημέρα της TEP [7]. Αυτή η ημέρα θεωρείται ημέρα "0" της εγκυμοσύνης. Με εξαίρεση τις κυήσεις που προήλθαν από υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, 20% των γυναικών είναι αβέβαιες για την ημερομηνία σύλληψης λόγω (1) μνημονικής αβεβαιότητας, (2) παραλλαγών της διάρκειας του κύκλου, (3) σύλληψης κατά τη διάρκεια του θηλασμού η/και (4) χρήσης ορμονικής αντισύλληψης που καθιστούν ανακριβή τον υπολογισμό της ηλικίας κύησης με βάση τη TEP [8].

Οι υπερηχογραφικές μετρήσεις του εμβρύου αποτελούν μέθοδο επιλογής γιατί εξασφαλίζουν ακριβέστερη εκτίμηση της ηλικίας κύησης [9]. Επισημαίνεται ότι ο προσδιορισμός της πιθανής ημερομηνίας τοκετού με τον τρόπο αυτό εξαρτάται από την ηλικία κύησης κατά την οποία διενεργείται ο υπερηχογραφικός έλεγχος και γίνεται λιγότερο αξιόπιστος όσο προχωρεί η εγκυμοσύνη [10][11]. Επιπλέον, προσδιορισμός της ηλικίας κύησης βάσει υπερηχογραφικών μετρήσεων αυξάνει το ποσοστό των τοκετών που κατατάσσονται στους πρόωρους, καθώς, συνήθως η ηλικία κύησης με βάση τη ΤΕΡ είναι μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίζεται με βάση τη βιομετρία του εμβρύου.

Το πρώτο τρίμηνο της κύησης, ο προσδιορισμός της ηλικίας κύησης γίνεται με υπερηχογραφική μέτρηση του κεφαλοουριαίου μήκους του εμβρύου (CRL)[12],[13],[14]. Στην περίπτωση που η ηλικία κύησης που προσδιορίζεται από το υπερηχογράφημα του πρώτου τριμήνου διαφέρει περισσότερο από 7 ημέρες από την ηλικία κύησης που προκύπτει από την ΤΕΡ, υπερισχύει η ηλικία κύησης όπως προσδιορίστηκε κατά τον υπερηχογραφικό έλεγχο.

Το δεύτερο τρίμηνο, ο προσδιορισμός της ηλικίας κύησης μπορεί να γίνει με υπερηχογραφική μέτρηση της αμφιβρεγματικής διαμέτρου (BPD) ενώ μετά το τρίτο τρίμηνο εκτιμάται με βάση το μήκος του μηριαίου οστού (FL) και την περίμετρο της κοιλιάς του εμβρύου (AC).

### 1.3 Κατηγορίες Πρόωρου Τοκετού

Με κριτήριο την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, ο πρόωρος τοκετός ταξινομείται σε (1) Ήπιο-όψιμο (moderate to late) (32-36<sup>+6</sup> εβδομάδες), που ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό πρόωρων τοκετών και που με τη σειρά υποδιαιρείται σε (1α) Ήπιο (moderate)(32-33<sup>+6</sup> εβδομάδες)- 20% των πρόωρων τοκετών και (1β) Όψιμο (late)(34-36<sup>+6</sup> εβδομάδες) -60-70% των πρόωρων τοκετών - (2) Πολύ (very) πρόωρο τοκετό (28-31<sup>+6</sup> εβδομάδες), που ευθύνεται για ποσοστό 10-15% των πρόωρων τοκετών και για ποσοστό 1% του συνόλου των τοκετών και σε (3) Εξαιρετικά (extremely) πρόωρο τοκετό (<28 εβδομάδες), που ευθύνεται για ποσοστό μικρότερο του 5% του συνόλου των πρόωρων τοκετών (Πίνακας 1) [10],[15],[16],[17],[18].

**Πίνακας 1.** Κατηγορίες πρόωρου τοκετού ανάλογα με την ηλικία κύησης

Κατηγορία	Εβδομάδα κύησης
Εξαιρετικά Πρόωρος Τοκετός (extremely preterm)	<28
Πολύ Πρόωρος Τοκετός (very preterm)	28-31 <sup>+6</sup>
Ήπιος (moderate preterm)	32-33 <sup>+6</sup>
Όψιμος (late preterm)	34-36 <sup>+6</sup>

Ανάλογα με τον παθογενετικό μηχανισμό που εμπλέκεται στην εμφάνιση του πρόωρου τοκετού η επιπλοκή ταξινομείται σε (1) ιατρογενή, (2) αποτέλεσμα πρόωρης ρήξης εμβρυικών υμένων (PPROM) και (3) αυτόματο πρόωρο τοκετό

### 1.3.1 Ιατρογενής Πρόωρος Τοκετός

Είναι ο πρόωρος τοκετός που πραγματοποιείται λόγω ιατρικών ενδείξεων που αφορούν είτε τη μητέρα είτε το έμβρυο, σε περιπτώσεις που η συνέχιση της κύησης αποτελεί κίνδυνο. Ευθύνεται για ποσοστό 25-35% όλων πρόωρων γεννήσεων [10],[18],[19].

Οι πιο συχνές αιτίες ιατρογενούς πρόωρου τοκετού είναι ανωμαλίες του πόρου του Muller (7.02%), πρωτεϊνουρία πριν την 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (5.85%), ιστορικό χρόνιας υπέρτασης (4.06%), ατομικό ιστορικό ιατρογενούς ή αυτόματου πρόωρου τοκετού (5.8%), πνευμονοπάθεια (2.52%) και ηλικία της εγκύου μεγαλύτερη από 35 έτη [20],[21].

### 1.3.2 Πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων (PPROM)

Ο όρος περιγράφει την αυτόματη ρήξη των υμένων πριν τη συμπλήρωση της 37ης εβδομάδας κύησης και τουλάχιστον μια ώρα πριν την εμφάνιση συσπάσεων της μήτρας [10],[18]. Αποτελεί ποσοστό 25-35% όλων των πρόωρων γεννήσεων, ανεξάρτητα από τη μέθοδο τοκετού (κολπική ή με καισαρική τομή). Εμφανίζεται κυρίως σε εγκύους χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου, αφροαμερικανικής καταγωγής και στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με ασυμπτωματική ενδομήτρια λοίμωξη

### 1.3.3 Αυτόματος Πρόωρος Τοκετός

Είναι ο πρόωρος τοκετός κατά τον οποίο οι υμένες είναι άρρηκτοι. Συναντάται πιο συχνά σε εγκύους χωρίς εμφανείς παράγοντες κινδύνου, αν και σε ποσοστό 96% των περιπτώσεων αναγνωρίζεται τουλάχιστον ένας αιτιολογικός παράγοντας. Ευθύνεται για

ποσοστό 40-50% του συνόλου των πρόωρων τοκετών και είναι συχνότερος σε γυναίκες της λευκής φυλής [22],[23].

#### **1.4 Επιπτώσεις Πρόωρου Τοκετού**

Ο πρόωρος τοκετός αποτελεί τη κυριότερη αιτία περιγεννητικής/νεογνικής θνησιμότητας και νοσηρότητας καθώς και μακροχρόνιων επιπτώσεων που συνδέονται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό πιθανώς λόγω ανατομικής και λειτουργικής ανωριμότητας οργάνων και συστημάτων που το καθιστούν ευάλωτο σε διάφορες επιπλοκές.

Στον πρόωρο τοκετό αποδίδεται ποσοστό 75% των νεογνικών θανάτων παιδιών ηλικίας μικρότερης των 5 ετών από τους οποίους η πλειονότητα συμβαίνει κατά τη νεογνική περίοδο και αφορά νεογνά που γεννιούνται πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα και κυρίως νεογνά που γεννιούνται πριν την 28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [16],[24],[25],[26]. Όσον αφορά νεογνά που γεννιούνται μετά την 32<sup>η</sup> εβδομάδα τα ποσοστά θνησιμότητας είναι παρόμοια με αυτά σε τελειόμηνα.

Στις συχνές νεογνικές επιπλοκές περιλαμβάνονται η βρογχοπνευμονική δυσπλασία, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνού, η άπνοια, η νεκρωτική εντεροκολίτιδα, η παρουσία ανοικτού βοτάλειου πόρου, η υπερχολερυθριναιμία, η νεφροπάθεια, η εγκεφαλική ενδοκοιλιακή αιμορραγία, η αμφιβληστροειδοπάθεια και η σηψαιμία.

Οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της προωρότητας αφορούν ποσοστό 12% έως 25% των επιζώντων εξαιρετικά πρόωρων νεογνών και περιλαμβάνουν προβλήματα όρασης, εγκεφαλική παράλυση, της ακοής διαταραχές, αναπτυξιακή καθυστέρηση, διαταραχές συμπεριφοράς (υπερκινητική συμπεριφορά), χαμηλό δείκτη IQ, έλλειψη προσοχής και μαθησιακά προβλήματα [27]. Η προωρότητα έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένη κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων, χρόνιας νεφρικής νόσου, αρτηριακής υπέρτασης (ήδη από την ηλικία των έξι ετών), αυξημένης αντίστασης στην ινσουλίνη, παχυσαρκίας και μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα [28],[29],[30],[31].

Τα προβλήματα όρασης και νοητικής ανάπτυξης αποτελούν τις συχνότερες αναπηρίες, με ποσοστά 17% και 21% αντίστοιχα, και ακολουθεί η εγκεφαλική παράλυση με ποσοστό 12% έως 15%. Η κώφωση και τύφλωση είναι λιγότερο συχνές αναπηρίες με συχνότητα 5% έως 8% και 3% έως 5% αντίστοιχα, ενώ περίπου ποσοστό 50% των επιζώντων εξαιρετικά πρόωρων νεογνών έχουν περισσότερες από μία σημαντικές αναπηρίες.

Τα τελευταία χρόνια, οι σημαντικές εξελίξεις στο τομέα της Νεογνολογίας και της Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των

πρόωρων νεογνών που αγγίζει ακόμη και το 100% για αυτά που γεννώνται μετά την 32<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [32],[33]. Δυστυχώς, η παρατηρούμενη ανοδική τάση των ποσοστών επιβίωσης των πρόωρων νεογνών συνοδεύεται από αύξηση της νοσηρότητας και των μακροχρόνιων επιπτώσεων στη σωματική και ψυχική υγεία των νεογνών που επιβιώνουν την προωρότητα. Στο πλαίσιο της μελέτης EriCURE2, συστηματική παρακολούθηση 811 πρόωρων νεογνών στο Ηνωμένο Βασίλειο έως την ηλικία των 2.5 ετών, έδειξε σοβαρή νευρολογική αναπηρία σε ποσοστό 54%, 52% και 45% των βρεφών που γεννήθηκαν την 23<sup>η</sup>, 24<sup>η</sup> και 25<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης αντιστοίχως [34]. Σε άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 1338 παιδιά που γεννήθηκαν πρόωρα διαπιστώθηκε προοδευτική μείωση του ποσοστού των παιδιών με κάποιου βαθμού αναπηρία με την αύξηση της ηλικίας κύησης κατά τον τοκετό (OR 0,86 ανά εβδομάδα) [35]. Σε κυήσεις 26 εβδομάδων το ποσοστό αναπηρίας ήταν 58% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό γι' αυτά που γεννήθηκαν τη 31<sup>η</sup> εβδομάδα 32% (

Στις επιπτώσεις της προωρότητας στην υγεία των νεογνών οφείλουμε να συνυπολογίσουμε την επιβάρυνση στο σύστημα υγείας, στην εκπαίδευση, στις κοινωνικές υπηρεσίες και κυρίως την συναισθηματική φόρτιση για τις οικογένειες και για αυτούς που περιθάλπουν τα άτομα αυτά.

Το οικονομικό βάρος της προωρότητας επίσης είναι σημαντικό τόσο για το σύστημα υγείας όσο και για τις οικογένειες. Στο Ηνωμένο Βασίλειο το κόστος για τη περιγεννητική φροντίδα ενός πρόωρου νεογνού, βάρους μικρότερου των 1000 gr, υπολογίζεται σε £39.483 [36]. Από την άλλη, οι γονείς υποχρεώνονται να λείψουν από την εργασία τους όσο διαρκεί η νοσηλεία του ενώ εάν το παιδί έχει σημαντική αναπηρία, οι γονείς αντιμετωπίζουν πολύ μεγάλες οικονομικές υποχρεώσεις για τις ανάγκες ειδικής αγωγής, αμοιβής ατόμου για την περιθαλψη του ή ακόμη και παραίτησής τους από την εργασία.

## 1.5 Επιδημιολογικά δεδομένα

Η επίπτωση των πρόωρων τοκετών παγκοσμίως κυμαίνεται από 5% έως 18% [1],[37]. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό πρόωρων γεννήσεων αφορά τοκετούς λόγω ιατρικών ενδείξεων σε μονήρεις ή πολύδυμες κυήσεις [38],[39]. Η σημαντική αυτή διακύμανση αποδίδεται σε διαφορές στο τρόπο ζωής, το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο και το επίπεδο εκπαίδευσης κάθε χώρας καθώς και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται από στις διάφορες χώρες για την καταγραφή των δεδομένων [40]. Σύμφωνα με στοιχεία της WHO, το 2010, επί συνόλου 135 εκατομμυρίων γεννήσεων παγκοσμίως, γεννήθηκαν 15 εκατομμύρια πρόωρα νεογνά που αντιστοιχεί σε επίπτωση 11,1% [10]. Έξι χώρες, Ινδία, Κίνα, Νιγηρία,

Πακιστάν, Ινδονησία και Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής ευθύνονται για ποσοστό 50% (περίπου 7.4 εκατομμύρια) των πρόωρων γεννήσεων παγκοσμίως [1].

Γενικά, η επίπτωση του πρόωρου τοκετού είναι κατά μέσο όρο 11,5% σε χώρες χαμηλού/μεσαίου εισοδήματος και σε ομάδες μειονοτήτων ή μεταναστών και μικρότερη (9,3%) σε χώρες με μεγαλύτερο κατά κεφαλήν εισόδημα [41], [42].

Στη βόρεια Ευρώπη είναι περίπου 5%, ενώ σε χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και της Νότιας Ασίας, με υψηλή γονιμότητα και χαμηλά εισοδήματα, είναι μεγαλύτερη [1].

Η συχνότητα του πρόωρου τοκετού έχει αυξηθεί τα τελευταία 25 χρόνια [43],[44]. Οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) έχουν την υψηλότερη επίπτωση πρόωρου τοκετού (9.57%) μεταξύ των χωρών με υψηλά εισοδήματα που αντιστοιχεί σε ποσοστό 42% των πρόωρων γεννήσεων σε αναπτυγμένες χώρες παγκοσμίως [7] Στην Ευρώπη, η επίπτωση του πρόωρου τοκετού κυμαίνεται από 5% έως 11%, αν και μικρό ποσοστό (μικρότερο του 0,5%) αφορά πρόωρους τοκετούς πριν τη 28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [45],[46].

Η διεθνής πολυκεντρική μελέτη “Intergrowth” έδειξε ότι σε κυήσεως χαμηλού κινδύνου, η επίπτωση του πρόωρου τοκετού είναι 4.5% [47]. Σε αντίστοιχη πρόσφατη ελληνική μελέτη η επίπτωση του αυτόματου πρόωρου τοκετού σε μονήρεις κυήσεις χαμηλού κινδύνου ήταν 4,9% [48].

## **1.6 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί πρόωρου τοκετού**

Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μία σειρά παθογενετικών διαδικασιών οδηγούν σε πρόωρο τοκετό δηλαδή σε πρόωρη μετάβαση από την κατάσταση ηρεμίας σε αυξημένη συσταλτικότητα της μήτρας, διαστολή του τραχήλου της μήτρας και ρήξη των εμβρυικών μεμβρανών [19]. Οι διαδικασίες που οδηγούν σε πρόωρο τοκετό είναι πολύπλοκες και παρά τις εντατικές προσπάθειες δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Οι επικρατέστερες διαδικασίες περιλαμβάνουν

1. Αγγειακές βλάβες στον πλακούντα-μητροπλακουντιακή ισχαιμία
2. Λοιμώξεις- Ενδομήτρια φλεγμονή
3. Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια
4. Μειωμένη ανεκτικότητα της μήτρας (το έμβρυο ως αλλομόσχευμα)
5. Υπερδιάταση της μήτρας.
6. Ελεύθερο DNA πλάσματος εγκύου (cell-free DNA)

### **1.6.1 Αγγειακές βλάβες στο πλακούντα-Αποκόλληση πλακούντα**

Παρότι ο παθογενετικός μηχανισμός που συσχετίζει τον πρόωρο τοκετό με τις αγγειακές

βλάβες στο πλακούντα και κατ'επέκταση την μητροπλακουντιακή ισχαιμία παραμένει ασαφής, επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν σαφή συσχέτιση μεταξύ θρομβοφιλικών διαταραχών, δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων και πρόωρου τοκετού [49],[50]. Οι θρομβοφιλικές διαταραχές που έχουν συσχετισθεί με πρόωρο τοκετό είναι η κοινή παραλλαγή του παράγοντα Leiden, η παραλλαγή G20210A της προθρομβίνης και πολυμορφισμοί των παραγόντων VII (121del/ins) και XIII (Val34Leu) [51],[52].

Στον παθογενετικό μηχανισμό, κεντρικό ρόλο παίζει η θρόμβωση του πλακούντα, προκαλώντας την απελευθέρωση ιστικού παράγοντα. Ο ιστικός παράγοντας αντιδρά με τον παράγοντα VIIa, με αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή ενεργοποιημένου παράγοντα X (Xa), ενεργοποιημένου παράγοντα V (Va) και τελικά της θρομβίνης. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τις μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1, - MMP-3, MMP-8, MMP-9 και οδηγεί σε αποδόμηση του συνδετικού ιστού και ρήξη των εμβρυικών μεμβρανών. Υψηλές συγκεντρώσεις MMP-8 στο αμνιακό υγρό έχουν συσχετιστεί με πρόωρο τοκετό πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και πρόωρη ρήξη υμένων [52],[53]. Παρόμοια συσχέτιση έχει αναφερθεί για τις MMP-9 και MMP-1 [54],[55].

### **1.6.2 Λοίμωξη- Ενδομήτρια φλεγμονή**

Η λοίμωξη και η φλεγμονώδης αντίδραση αποτελούν μέχρι σήμερα τον μοναδικό μηχανισμό με άμεση αιτιολογική συσχέτιση με τον αυτόματο πρόωρο τοκετό και η υπέρμετρη ενεργοποίησή τους έχει εμπλακεί στον παθογενετικό μηχανισμό της επιπλοκής [19], [56],[57],[58],[59].

Το 1960, οι Benirschke και συν., με ιστολογική ανάλυση εμβρυικών υμένων έδειξαν ότι η λοίμωξη μπορεί να είναι αιτιολογικός παράγοντας πρόωρου τοκετού, ακόμη και όταν απουσιάζουν τα κλινικά σημεία [60]. Επίσης τόσο η υποκλινική, όσο και η κλινική χοριοαμνιονίτιδα είναι συχνότερες στον πρόωρο τοκετό παρά σε τελειόμηνες κυήσεις και παρατηρούνται σε ποσοστό 50% των πρόωρων τοκετών πριν από 30<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [61]. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα από τους Daikoku και συν. οι οποίοι έδειξαν ότι η πρόωρη ρήξη των εμβρυικών μεμβρανών και ο πρόωρος τοκετός είναι αποτέλεσμα λοίμωξης [62]. Επιπλέον μελέτες δείχνουν υψηλότερη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυτοκινών στο αμνιακό υγρό εγκύων με πρόωρο τοκετό από αυτό γυναικών ίδιας ηλικίας κύησης που τελικά γέννησαν τελειόμηνα νεογνά [63].

Η διαδικασία συσχετίζεται κυρίως με τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και δευτερευόντως με τους ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRP), τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, τις προσταγλανδίνες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. [64].

Οι πλέον σημαντικοί ειδικοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων είναι οι υποδοχείς τύπου TLRs (Toll-like receptors) οι οποίοι έχουν ταυτοποιηθεί στα κύτταρα του τραχήλου, του πλακούντα, του φθαρτού και του χορίου [59], [64]. Οι υποδοχείς TLRs μπορούν να ενεργοποιηθούν είτε άμεσα, από βακτήρια ή τμήματα των βακτηρίων, είτε από διαλυτά μόρια με τροποποιητική δράση επί των υποδοχέων TLRs όπως ο διαλυτός υποδοχέας-1 του TNF, η IL-6, ο διαλυτός TLR-2 και ο συν υποδοχέας CD14.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ακόμη και μη λοιμώδεις παράγοντες του πλακούντα, σε εγκύους με ισχαιμική νόσο, μπορούν να ενεργοποιήσουν τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες και να προκαλέσουν την έναρξη του τοκετού [65]. Ενεργοποίηση των υποδοχέων TLRs προάγει την παραγωγή του μεταγραφικού παράγοντα NFκappaB (Nuclear Factor κB, NFκB), ο οποίος με τη σειρά του καταστέλλει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων και ενεργοποιεί την παραγωγή κυτοκινών με προ-φλεγμονώδη ή μετά-φλεγμονώδη δράση. Η παραγωγή κυτοκινών γίνεται από τα μακροφάγα του φθαρτού, τα κύτταρα του χορίου, αλλά και από τροφοβλαστικά κύτταρα [66],[67]. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες εκλύουν την παραγωγή μεταλλοπρωτεασών (MMP-8 και MMP-9) από τον φθαρτό και το άμνιο, και ενεργοποιούν τη δράση των προσταγλανδινών είτε μέσω της Cyclooxygenase-2 (COX-2) είτε μέσω αναστολής της 15-υδροξυ-δεϋδρογενάσης των προσταγλανδινών, (PGDH) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φιμπρονεκτίνης [64],[65],[68].

Τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των ανοσολογικών διεργασιών είναι η ενεργοποίηση της διαδικασίας της απόπτωσης, η έναρξη της μυομητρικής δραστηριότητας, η διαστολή του τραχήλου, η πρόωρη ρήξη των υμένων και ο πρόωρος τοκετός [69], [70].

#### *Φλεγμονώδεις κυτοκίνες*

Από τους φλεγμονώδεις παράγοντες ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη κυτοκίνη TNFα, στις ιντερλευκίνες IL-1β, IL -6, IL -8 και IL -10 και στον transforming growth factor TGF-beta1. Επισημαίνεται ότι εκτός από τις κυτοκίνες της μητέρας, στον πρόωρο τοκετό εμπλέκονται και κυτοκίνες εμβρυϊκής προέλευσης που παράγονται από τις εμβρυϊκές μεμβράνες.

Οι TNFα και IL-1β προσελκύουν ουδετερόφιλα στο σημείο της φλεγμονής και τα ενεργοποιούν με αποτέλεσμα την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 και F2α [71]. Είναι οι πλέον σημαντικές φλεγμονώδεις κυτοκίνες και η παράλληλη αύξηση τους είναι απαραίτητη ώστε να οδηγήσει η φλεγμονώδης αντίδραση σε πρόωρο τοκετό [56].

Η IL-6 παράγεται ως απάντηση στους παράγοντες TNFα και IL-1β και έχει συντονιστικό



ρόλο. Η συγκέντρωσή της στο αμνιακό υγρό αυξάνεται σημαντικά σε εγκύους με χοριοαμνιονίτιδα και σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού.

Η IL-10, συμμετέχει στη διατήρηση της κύησης, ενώ ο transforming growth factor TGF-beta1 εμπλέκεται στο αρχικό στάδιο της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η IL-10 έχει συσχετισθεί με την διατήρηση της κύησης σύμφωνα με τη θεωρία το έμβρυο ως αλλομόσχευμα.

#### *Φλεγμονώδης αντίδραση μετά από λοίμωξη με Gram αρνητικά στελέχη*

*In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η μόλυνση από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, κυρίως Gram αρνητικά στελέχη (Enterobacter, Staphylococcus, Streptococcus, Bacteroides και Pseudomonas aeruginosa) μπορούν άμεσα, μέσω επίδρασης στις εμβρυϊκές μεμβράνες, να ενεργοποιήσουν την διαδικασία του αυτόματου πρόωρου τοκετού. Σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία φαίνεται ότι έχει ο υποδοχέας TLR4 που είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση του Gram-αρνητικού βακτηριδίου, ο TLR2 που αναγνωρίζει την βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη και ο TLR9 που σχετίζεται με το βακτηριακό CpG DNA [72],[73]. Τα στελέχη αυτά παράγουν διάφορες πρωτεάσες και κολλαγενάσες οι οποίες επιδρούν στις εμβρυϊκές μεμβράνες με αποτέλεσμα να τις εξασθενούν και να προκαλούν την πρόωμη ρήξη τους [74]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια μπορούν να διεγείρουν άμεσα το μυομήτριο και να προκαλέσουν οργανωμένες συστολές [75].

Εκτός από τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι γνωστός ένας μεγάλος αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών που παράγουν φωσφολιπάση A2, μία ουσία που ενισχύει την απελευθέρωση μη εστεροποιημένου αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών και πρόωρη ρήξη των εμβρυϊκών μεμβρανών [75]

#### **1.6.3 Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια**

Σωματικό ή και ψυχολογικό stress της μητέρας ή του εμβρύου μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη απορρύθμιση του νευροενδοκρινικού συστήματος της μητέρας ή του εμβρύου καθώς και του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια, με ενδιάμεσο διαμεσολαβητή την πλακουντιακή κορτικοτροπίνη (CRH). Η πλακουντιακή CRH πυροδοτεί την έκκριση προσταγλανδινών τοπικά με αποτέλεσμα πρόωρη έναρξη συστολών του μυομητρίου και πρόωρο τοκετό [76], [77]. Επισημαίνεται ότι η ίδια διαδικασία χαρακτηρίζει το “βιολογικό ρολόι” που σηματοδοτεί την έναρξη του τελειόμηνου τοκετού [76].

Η συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε stress κατά την κύηση και του πρόωρου τοκετού και ειδικότερα του πρόωρου τοκετού πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα μετα-ανάλυσης οκτώ μελετών που περιλαμβάνουν 8.000 εγκύους [78].

Η θεωρία της συσχέτισης του stress με τον πρόωρο τοκετό μπορεί εν μέρει να ερμηνεύσει την αυξημένη επίπτωση του πρόωρου τοκετού σε ανύπαντρες ή σε άνεργες μητέρες, σε εγκύους μετά από έντονη σωματική άσκηση, σε αυτές με χρόνια συστηματικά νοσήματα καθώς και σε γυναίκες από χαμηλότερα κοινωνικοοικονομικά στρώματα.

Σε φυσιολογικές συνθήκες η CRH παράγεται από τον υποθάλαμο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της κύησης και αμέσως μετά τον τοκετό, λόγω των υψηλών επιπέδων κορτιζόλης στο περιφερικό αίμα, μειώνεται η έκκριση CRH από τον υποθάλαμο και αναλαμβάνει ο πλακούντας. Η πλακουντιακή CRH εμπλέκεται στην προετοιμασία της ανάπτυξης της μήτρας και στην ενεργοποίηση της διαδικασίας του τοκετού ενώ συμμετέχει ενεργά και στην ρύθμιση της έκκρισης κορτιζόλης στη μητρική και την εμβρυική κυκλοφορία [56], [79], [80]. Η CRH επάγει την παραγωγή προσταγλανδινών από τον πλακούντα οι οποίες, μέσω θετικής ρύθμισης, ενισχύουν περαιτέρω την παραγωγή CRH. Η CRH εκκινεί τον τοκετό ενεργοποιώντας τις πρωτεάσες του κατώτερου γεννητικού συστήματος. Παράλληλα η πλακουντιακή CRH ενισχύει την έκκριση των πρωτεϊνών FK506 binding protein 51 (FKBP51) της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) και της δεϋδροεπιανδρο-στερόνης (DHEA). Η FKBP51 μειώνει τη δέσμευση (λειτουργική αποσιώπηση) και προάγει την υπερέκκριση εμβρυϊκής ACTH που ενεργοποιεί την σύνθεση της DHEA [80],[81]. Δεδομένου ότι ο πλακούντας δεν έχει ενζυμικό μηχανισμό για τη μετατροπή της προγεστερόνης σε οιστριόλη, η DHEA αποτελεί τη πρόδρομη ουσία για τη παραγωγή οιστραδιόλης και οιστριόλης [82]. Τα οιστρογόνα που παράγονται τελικά από τον πλακούντα οδηγούν σε αύξηση των διακυτταρικών συνδέσμων (gap junctions) στο μυομήτριο, αυξημένη έκφραση υποδοχέων της οξυτοκίνης και αυξημένη παραγωγή ενζύμων, όπως η κινάση της ελαφριάς αλύσου της μυοσίνης και η καλμοδουλίνη, που σχετίζονται με τη σύσπαση των μυϊκών ινών του μυομητρίου. [75].

#### **1.6.4 Μειωμένη ανεκτικότητα της μήτρας (το έμβρυο ως αλλομόσχευμα)**

Στη προσπάθεια αποσαφήνισης του παθογενετικού μηχανισμού που εμπλέκεται στην εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού, ο μηχανισμός ανοσολογικής ανοχής της μήτρας και η θεωρία του εμβρύου ως αλλομόσχευμα έχουν εκτενώς μελετηθεί [83],[84]. Η εξήγηση έχει ως βάση το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex) [85].

Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, η έκφραση των εμβρυϊκών αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στα κύτταρα της τροφοβλάστης, στη διεπαφή μητέρας-εμβρύου, αφ' ενός μεν είναι ελαττωμένη σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς αφ' ετέρου είναι τροποποιημένη. Συγκεκριμένα, περιορίζεται η δράση των MHC πρωτεϊνών τάξης Ια (MHC-A και MHC-B), οι οποίες κυρίως συμβάλλουν στην απόρριψη μοσχευμάτων από τον συνεχώς αναπτυσσόμενο πλακούντα. Ταυτόχρονα, εκφράζονται κυρίως πρωτεΐνες τάξης Ιβ (MHC-E, MHC-F και MHC-G) για να προστατευθεί το έμβρυο από την ανοσολογική αντίδραση της μητέρας [86],[87]. Η έλλειψη επαρκούς αναγνώρισης μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία διατήρησης της κύησης, δηλαδή στην έναρξη του τοκετού.

#### **1.6.5. Υπερδιάταση της μήτρας και ανεπάρκεια του τραχήλου**

Παθολογική διάταση της μήτρας όπως σε πολύδυμες κυήσεις, μακροσωμία του εμβρύου, υδράμνιο και συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας προκαλεί υπερδιάταση των ινών του μυομητρίου και των εμβρυϊκών μεμβρανών με αποτέλεσμα μυομητρική δραστηριότητα και πρόωρο τοκετό. Η υπερδιάταση των μυϊκών ινών οδηγεί στη δημιουργία διακυτταρικών συνάψεων (gap junctions) μεταξύ των μυϊκών ινών, παραγωγή προσταγλανδινών E2 και F2a και υποδοχέων οξυτοκίνης καθώς και έκφραση πρωτεϊνών διακυτταρικών συνάψεων (CX-43 και CX-26) [88]. Επιπλέον η αυξημένη ενδομήτρια πίεση έχει συσχετιστεί με την έκφραση γονιδίων με σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή (κυτοκίνες, προσταγλανδίνες) και την κολλαγονόλυση (κολλαγενάση). Η απελευθέρωση κυταροκινών και κολλαγενάσης οδηγεί σε απώλεια της διασύνδεσης του κολλαγόνου, αλλαγές των ιδιοτήτων του ενδοθηλίου και πρόωρη ρήξη των εμβρυϊκών υμένων [89],[90].

#### **1.6.6 Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA πλάσματος εγκύου (cell-free fetal DNA)**

Πρόσφατα έχει προταθεί ρόλος του ελεύθερου DNA εμβρυϊκής προέλευσης (cffDNA) στο πλάσμα της εγκύου ως έναυσμα για την έναρξη του τοκετού [91]. Η παρουσία cffDNA στο πλάσμα εγκύου είναι γνωστή ήδη από το 1997 [92]. Ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα ήδη από την 7<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, η συγκέντρωσή του αυξάνει με την ηλικία κύησης και κορυφώνεται στο τέλος της εγκυμοσύνης λίγο πριν την έναρξη του τοκετού. Είναι ενδιαφέρον ότι οι γυναίκες με αυξημένα επίπεδα cffDNA στο πλάσμα, το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για αυτόματο πρόωρο τοκετό [93]. Αυτά τα στοιχεία, σε συνδυασμό με την ήδη διαπιστωμένη προ φλεγμονώδη ιδιότητα του cffDNA, υποστηρίζουν η θεωρία ότι το cffDNA μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα κοινό παθογενετικό

μηχανισμό για τον τοκετό [94].

Αυξημένη συγκέντρωση cffDNA στο περιφερικό αίμα εγκύων έχει παρατηρηθεί σε παθολογικές εγκυμοσύνες με δυσλειτουργία του πλακούντα και φλεγμονή. Μηχανιστικά, το cffDNA μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα TLR9, με αποτέλεσμα αναδιαμόρφωση του υποδοχέα, στενή τοποθέτηση των περιοχών σηματοδότησης TIR, ενεργοποίηση του NF-kB και μεταγραφή φλεγμονωδών κυτοκίνης [95]. Πρόσφατα οι Herrera και συν., μελέτησαν τη σχέση μεταξύ cffDNA, φλεγμονώδους αντίδρασης και αυτόματου πρόωρου τοκετού και διαπίστωσαν αυξημένη συγκέντρωση cffDNA σε εγκύους που εμφάνισαν την επιπλοκή σε σχέση με τελειόμηνες κυήσεις πιθανώς λόγω ύπαρξης περισσότερου υπομεθυλιωμένου DNA διαθέσιμου για αλληλεπίδραση με τον καταρράκτη της φλεγμονής [96]. Όλα αυτά τα ζητήματα αποτελούν σημείο εκκίνησης για μελέτη του cffDNA σε εγκύους υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό [91]. Η ιδέα ότι το cffDNA μπορεί να μεσολαβήσει σε διάλογο μεταξύ εμβρύου-πλακούντα-μητρικής κυκλοφορίας για να σηματοδοτήσει την έναρξη του τοκετού σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες καθώς και σε αυτόματο πρόωρο τοκετό είναι μια συναρπαστική υπόθεση που αξίζει να διερευνηθεί.

## 1.7 Παράγοντες κινδύνου

Ο πρόωρος τοκετός αποτελεί μια ιδιαίτερη ανομοιογενή κλινική οντότητα στην οποία εμπλέκεται μια σειρά μεταβλητών που δρουν είτε μεμονωμένα είτε συνεργικά. Πολλές από αυτές τις μεταβλητές μπορούν να τροποποιηθούν και να οδηγήσουν στο σχεδιασμό παρεμβάσεων για την αποφυγή της επιπλοκής.

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση πρόωρου τοκετού περιλαμβάνουν παράγοντες από τη μητέρα, παράγοντες από το έμβρυο ή τον πλακούντα καθώς και συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την κύηση (Σακχαρώδης Διαβήτης της κύησης, Προεκλαμψία κ.ά.). Δεν έχουν μέχρι σήμερα αναφερθεί παράγοντες του πατέρα που να σχετίζονται με την εμφάνιση πρόωρου τοκετού [96].

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση πρόωρου τοκετού περιλαμβάνουν δημογραφικά χαρακτηριστικά, διατροφικές συνήθειες, στοιχεία του μαιευτικού ιστορικού, χαρακτηριστικά της παρούσας κύησης καθώς και βιολογικούς και γενετικούς παράγοντες (πίνακας 2).

**Πίνακας 2. Προδιαθεσικοί παράγοντες αυτόματου πρόωρου τοκετού**

- Ιστορικό πρόωρου τοκετού: 20-40%
- Ηλικία της εγκύου (εφηβεία, προχωρημένη ηλικία)
- Φυλή-εθνότητα
- Χρόνια νοσήματα της μητέρας
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες και συγγενείς δυσπλασίες του εμβρύου
- Σωματομετρικά χαρακτηριστικά της εγκύου
- Ανατομικές ανωμαλίες μήτρας (μονόκερη 20%, δίκερη 20-66%, διάφραγμα 3-12%)
- Ανεπάρκεια τραχηλικού στομίου (ιδιοπαθής, επέμβαση στον τράχηλο)
- Αυξημένο μέγεθος μήτρας (υδράμνιο)
- Ινομύματα μήτρας (υποβλεννογόνια, υποπλακουντιακά)
- Διατροφή
- Εκπαίδευση, οικονομική κατάσταση
- Δίδυμη κύηση: >50%
- Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή
- *Ιστορικό τεχνητής διακοπής της κύησης*
- Επιπλοκές στην κύηση (π.χ. αποκόλληση πλακούντα, αιμορραγία πρώτου τριμήνου, ολιγάμνιο, Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης, υπέρταση κύησης)
- Χρήση ουσιών (καφές, κάπνισμα, αλκοόλ, ναρκωτικά)
- Λοίμωξη της μητέρας (ασυμπτωματική βακτηριουρία, πυελονεφρίτιδα, λοιμώξεις γεννητικού σωλήνα, άλλες συστηματικές λοιμώξεις)
- Πρόωρη ρήξη εμβρυϊκών υμένων
- Φύλο του εμβρύου
- Εργασία, σωματική άσκηση, stress μητέρας (δράση κατεχολαμινών)

*Ατομικό ιστορικό πρόωρου τοκετού*

Ατομικό ιστορικό πρόωρου τοκετού αποτελεί τον πιο ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την επανεμφάνιση της επιπλοκής και καθιστά αυτόματα την κύηση ως υψηλού κινδύνου,

πιθανώς γιατί η υποκείμενη αίτια που οδηγεί σε πρόωρο τοκετό την πρώτη φορά, υπάρχει και στην επόμενη εγκυμοσύνη [97],[98].

Ο κίνδυνος κυμαίνεται από 15% έως 50% και αυξάνει όσο αυξάνει ο αριθμός των πρόωρων τοκετών που έχουν προηγηθεί [99]. Αν έχει προηγηθεί ένας πρόωρος τοκετός ο κίνδυνος είναι 14% έως 22%, δύο 28% έως 42% και 67% αν έχουν προηγηθεί τρεις ή περισσότεροι. Είναι αξιοσημείωτο ότι η υποτροπή εμφανίζεται την ίδια περίπου εβδομάδα κύησης που είχε εμφανιστεί και στην προηγούμενη εγκυμοσύνη [100].

Ο κίνδυνος επανάληψης του πρόωρου τοκετού αυξάνει όσο μειώνεται το μεσοδιάστημα μεταξύ των κυήσεων και δεν έχει μεσολαβήσει τελειόμηνη εγκυμοσύνη. Αναφέρεται ότι διάστημα μικρότερο των έξι μηνών μεταξύ δύο διαδοχικών κυήσεων συνδέεται με τριπλάσιο κίνδυνο πρόωρου τοκετού πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα [101],[102],[103].

#### *Ηλικία εγκύου*

Σε γυναίκες εφηβικής-νεαρής ηλικίας (<20 ετών) καθώς και σε γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 45 ετών αναφέρονται αυξημένα ποσοστά προωρότητας [104],[105],[106],[107],[108]. Οι Cortes-Castell και συν., μελέτησαν 78.391 τοκετούς στους οποίους περιλαμβάνονται 5.295 πρόωροι και διαπίστωσαν στατιστικά μεγαλύτερη επίπτωση της προωρότητας σε έφηβες μητέρες την οποία αποδίδουν σε κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες και στο σχετικά υψηλό ποσοστό ανεπιθύμητων κυήσεων σε αυτή την ηλικιακή ομάδα [104]. Σε γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας ο αυξημένος κίνδυνος για πρόωρο τοκετό είναι αναμενόμενος λόγω μεγαλύτερης συχνότητας χρόνιων νοσημάτων.

#### *Φυλή-εθνότητα*

Η επίπτωση του πρόωρου τοκετού διαφέρει μεταξύ φυλετικών και εθνικών ομάδων και υπολογίζεται σε 5% έως 9% στη λευκή φυλή ενώ είναι σχεδόν διπλάσια (16%- έως 8%) σε γυναίκες της μαύρης φυλής αντίστοιχης ηλικίας, ανεξαρτήτως κοινωνικοοικονομικής κατάστασης [109],[110],[111]. Συστηματική μετα-ανάλυση οκτώ μελετών που περιλαμβάνει περίπου 26.335 τοκετούς έδειξε μικρότερη συχνότητα πρόωρου τοκετού σε κυήσεις στις οποίες και οι δύο γονείς ήταν λευκοί και προοδευτική αύξηση της επίπτωσης με την επικράτηση του μαύρου χρώματος (μαύρος ο ένας ή και οι δύο γονείς) ακόμη και σε περιπτώσεις με ατομικό ιστορικό πρόωρου τοκετού [113],[114]. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται από πιο πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη των Rubens και συν στις ΗΠΑ

που αναφέρει 40% υψηλότερη επίπτωση πρόωρου τοκετού σε γυναίκες της μαύρη φυλής σε σχέση με αυτές της λευκής [115].

#### *Σωματομετρικά χαρακτηριστικά της εγκύου*

Ακραίες τιμές δείκτη μάζας σώματος (BMI) πριν την εγκυμοσύνη (< 18.5 και >35) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού [116],[117],[118].. Οι Siega-Riz και συν. σε μελέτη που περιλαμβάνει 7.589 εγκύους, διαπίστωσαν ότι το χαμηλό βάρος πριν την εγκυμοσύνη (<18.5) και η μικρή πρόσληψη βάρους, ιδιαίτερα κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, συνδέονται με μεγαλύτερη πιθανότητα πρόωρου τοκετού [116].

#### *Διατροφή*

Παρά το ότι δεν έχει αποδειχθεί ότι η διατροφή της μητέρας αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει την διάρκεια της κύησης και την εμφάνιση πρόωρου τοκετού, μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι αυξημένη κατανάλωση ζάχαρης καθώς και χαμηλά επίπεδα βιταμινών B6, B12, ψευδαργύρου και σιδήρου στο αίμα αυξάνουν τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό [119]. Αντιθέτως, η κατανάλωση ψαριών πλούσιων σε πολυακόρεστα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, το γάλα με προ-βιοτικά και το σκόρδο ασκούν προστατευτική δράση [120].

#### *Χρήση και κατάχρηση ουσιών*

-*Καφεΐνη*: Νεότερα δεδομένα καταρρίπτουν την άποψη που επικρατούσε παλαιότερα και συνέδεε την κατανάλωση καφέ με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό. Σε πρόσφατες μελέτες δεν διαπιστώνεται επίδραση της κατανάλωσης καφεΐνης στην τελική έκβαση της κύησης ούτε και στο τελικό βάρος γέννησης του νεογνού [121].

-*Κατανάλωσης αλκοόλ*: Μικρή κατανάλωση αλκοόλ, έως 4 ποτήρια την εβδομάδα, δεν επηρεάζει την τελική έκβαση της εγκυμοσύνης [122].

-*Κάπνισμα*: Το κάπνισμα σχεδόν διπλασιάζει τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό, ανεξάρτητα από τη παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου, πιθανώς λόγω της ανάπτυξης συστηματικής φλεγμονής αλλά και της αγγειοσυσπαστικής δράσης της νικοτίνης και του εκλυόμενου μονοξειδίου του άνθρακα [123]. Είναι ενδιαφέρον οι γυναίκες οι οποίες διακόπτουν το κάπνισμα, πριν την 15<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, έχουν τον ίδιο κίνδυνο πρόωρου τοκετού με όσες δεν καπνίζουν υποδηλώνοντας ότι η επιβλαβής επίδραση του καπνού έχει αναστρέψιμα αποτελέσματα [124].

Γυναίκες που εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχουν και αυτές αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό.

-*Ναρκωτικές ουσίες*: Ποσοστό περίπου 25% των γυναικών που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών θα έχουν πρόωρο τοκετό, χωρίς να μπορεί να αναγνωριστεί ο απόλυτος κίνδυνος καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις συνυπάρχουν και άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως έλλειψη εμβρυικής φροντίδας, κακές συνθήκες υγιεινής, χαμηλό κοινωνικό και - οικονομικό περιβάλλον και κακή διατροφή [125].

Η κοκαΐνη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία [121]. Ο τρόπος με τον οποίο η κοκαΐνη οδηγεί στον πρόωρο τοκετό δεν έχει επαρκώς εξηγηθεί, πιθανότατα, όμως, οφείλεται στην αύξηση των κατεχολαμινών στο αίμα της εγκύου, καθώς και στην αυξημένη πιθανότητα αποκόλλησης του πλακούντα και αιμορραγίας [126].

#### *Εργασία-Σωματική άσκηση*

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τη συσχέτιση της εργασίας της εγκύου με τον κίνδυνο εμφάνισης πρόωρου τοκετού είναι αντικρουόμενα καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις συνυπάρχουν και άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία της εγκύου, η φυσική της κατάσταση και η κοινωνική τάξη που επηρεάζουν την διερεύνηση του κινδύνου [127],[128].

Γενικά, είναι αποδεκτό ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ πολύωρης εργασίας και έντονης σωματικής δραστηριότητας, υπό συνθήκες stress, με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής [128].

Αντιθέτως, μελέτες εγκύων έχουν δείξει ότι άσκηση κατά τη διάρκεια της κύησης φαίνεται ότι ελαττώνει κατά 10% τον κίνδυνο προωρότητας [129]. Για το λόγο αυτό οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν σε όλες τις εγκύους 20-30 λεπτά άσκηση ημερησίως.

#### *Εκπαίδευση, οικονομική κατάσταση και άλλοι κοινωνικοί παράγοντες*

Στατιστική ανάλυση των δημογραφικών στοιχείων από περίπου 4 εκατομμύρια εγκύους, από την Ομάδα Εργασίας για τον πρόωρο τοκετό της FIGO, έδειξε σταθερή συσχέτιση μεταξύ χαμηλού οικονομικού επιπέδου και χαμηλού επιπέδου εκπαίδευσης με τον πρόωρο τοκετό [130]. Όσον αφορά την επίδραση άλλων κοινωνικών παραγόντων (π.χ. άγαμη μητέρα) στον κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα παραμένουν αντικρουόμενα.

#### *Χρόνια νοσήματα της μητέρας*



Χρόνια νοσήματα της εγκύου όπως σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, νοσήματα του θυρεοειδούς, άσθμα ή αρτηριακή υπέρταση έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ιατρογενής [131].

#### *Φύλο του εμβρύου*

Την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες αναφέρουν μεγαλύτερη αναλογία αγοριών που γεννιούνται πρόωρα σε σχέση με τα κορίτσια [132]. Παρά το ότι δεν έχει διευκρινιστεί ο αιτιολογικός παράγοντας, πιθανολογείται ότι το μεγαλύτερο βάρος των αρρένων εμβρύων και η μεγαλύτερη παραγωγή οιστρογόνων σε αυτά σχετίζονται με την αυξημένη επίπτωση της επιπλοκής.

#### *Χρωμοσωμικές ανωμαλίες- Συγγενείς δυσπλασίες του εμβρύου*

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου και συγγενείς δυσπλασίες έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο αυτόματου πρόωρου τοκετού [133]. Ο κίνδυνος αυξάνει περαιτέρω σε περιπτώσεις συγγενών ανωμαλιών που σχετίζονται με πολυάμνιο όπως οι ατρησίες του γαστρεντερικού σωλήνα.

#### *Πολύδυμη κύηση*

Η παρουσία πολύδυμης κύησης αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση πρόωρου τοκετού [134]. Ο κίνδυνος υπολογίζεται σε 50% όταν πρόκειται για κύηση δίδυμων και μπορεί να φθάσει έως και 90% στις τρίδυμες κυήσεις πιθανώς λόγω της υπερδιάτασης της μήτρας και του αυξημένου ενδομήτριου όγκου. Υπολογίζεται ότι ποσοστό 10% των πρόωρων τοκετών παρατηρούνται σε πολύδυμες κυήσεις.

#### *Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή*

Αυξημένος κίνδυνος πρόωρου τοκετού έχει παρατηρηθεί σε κυήσεις που έχουν επιτευχθεί με χρήση μεθόδων εξωσωματικής γονιμοποίησης, ακόμα και σε μονήρεις, λόγω αυτής καθαυτής της υπογονιμότητας ή και παραγόντων που αφορούν την διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης [135].

#### *Βακτηριακή κολπίτιδα*

Η βακτηριακή κολπίτιδα χαρακτηρίζεται από διαταραχή της φυσιολογικής χλωρίδας του κόλπου και υπερανάπτυξη κυρίως αναερόβιων βακτηρίων, όπως *Gardenerella*, *Bacteroides*, και *Mobiluncus* [136]. Η βακτηριακή κολπίτιδα περιπλέκει ποσοστό 15% έως

42% των κήσεων και σχεδόν διπλασιάζει τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό. Μετα-ανάλυση 18 ανεξάρτητων μελετών έδειξε ότι ο σχετικός κίνδυνος για πρόωρο τοκετό είναι μεγαλύτερος, όσο πιο μικρή είναι η ηλικία κύησης κατά την διάγνωση της βακτηριακής κολπίτιδας.

#### *Ιστορικό τεχνητής διακοπής της κύησης*

Επιδημιολογικά δεδομένα συσχετίζουν την τεχνητή διακοπή της εγκυμοσύνης με μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο εμφάνισης πρόωρου τοκετού. Ο κίνδυνος εξαρτάται από τον αριθμό των διακοπών κύησης που έχουν προηγηθεί και κυμαίνεται από 1.3 (μετά από μία τεχνητή διακοπή) έως 1.9 (μετά από δύο ή περισσότερες [137]).

#### *Ανεπάρκεια τραχήλου και συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας*

-*Ανεπάρκεια τραχήλου* είναι η ανώδυνη διαστολή του τραχήλου που οδηγεί σε αυτόματες αποβολές ή πρόωρο τοκετό χωρίς την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου [138].

Συγγενείς παράγοντες που προδιαθέτουν σε ανεπάρκεια τραχήλου είναι η ιδιοπαθής ανεπάρκεια ενώ στους επίκτητους παράγοντες περιλαμβάνονται οι χειρουργικές επεμβάσεις του τραχήλου όπως η κωνοειδής εκτομή καθώς και οι επανειλημμένες διαστολές του τραχήλου κατά τη διενέργεια διαγνωστικών και θεραπευτικών αποξέσεων. Συνηθέστερη όμως αιτία ανεπάρκειας τραχήλου αποτελεί η υποκλινική ενδομήτρια λοίμωξη.

-*Συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας*, κυρίως ανωμαλίες της διάπλασης, εμπλέκονται στην εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης πρόωρου τοκετού που υπολογίζεται στις περιπτώσεις αυτές σε περίπου 40% συνολικά. Ειδικότερα ο κίνδυνος είναι 56% σε γυναίκες με ανωμαλίες διπλασιασμού της μήτρας, 43% σε γυναίκες με μονόκερη μήτρα και 39% σε γυναίκες με δίκερη μήτρα [139].

-*Τα ινομύωματα*, κυρίως αυτά με διάμετρο μεγαλύτερη των 6cm, έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού πιθανώς λόγω ελάττωσης του όγκου της κοιλότητας της μήτρας [140].

#### *Συστηματικές λοιμώξεις της εγκύου*

Συστηματικές λοιμώξεις της εγκύου, όπως πυελονεφρίτιδα, πνευμονία και περιοδοντικές λοιμώξεις, έχουν συσχετισθεί με πρόωρο τοκετό. Η πιθανότητα πρόωρου τοκετού σε εγκύους με πνευμονία υπολογίζεται σε 15% έως 48%, και δεν φαίνεται να μεταβάλλεται μετά από χρήση αντιβιοτικών [141].

Άλλες εμπύρετες καταστάσεις της μητέρας, όπως τυφοειδής πυρετός, και ελονοσία έχουν την ίδια δυσμενή έκβαση, αλλά και η περιοδοντίτιδα όπου ο σχετικός κίνδυνος για πρόωρο τοκετό παραμένει σε υψηλά επίπεδα [142]. Επισημαίνεται ότι η European Federation of Periodontology και η American Academy of Periodontology (2013) έχουν εκδώσει οδηγία σύμφωνα με την οποία η θεραπεία της περιοδοντικής νόσου κατά τη διάρκεια της κύησης, παρά το ότι είναι ασφαλής, δεν βελτιώνει το περιγεννητικό αποτέλεσμα, συμπεριλαμβανομένου του κινδύνου για πρόωρο τοκετό [143].

### 1.8 Ενδομήτριες λοιμώξεις και πρόωρος τοκετός

Η ενδομήτρια λοίμωξη είναι χρόνια διαδικασία η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού μέσω ενεργοποίησης του ανοσολογικού μηχανισμού. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ενδομήτριες λοιμώξεις ενοχοποιούνται για ποσοστό 25% έως 40% των πρόωρων τοκετών όμως το ποσοστό αυτό υπολείπεται του πραγματικού λόγω δυσκολιών στην ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού με τις κλασικές τεχνικές καλλιέργειας των παθογόνων βακτηριδίων [144].

Οι τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της Μοριακής Γενετικής και Μικροβιολογίας και κυρίως η χρήση των συστημάτων αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) δίνουν πλέον την δυνατότητα αλληλούχισης του γονιδιώματος των παθογόνων βακτηριδίων και συνεπώς της διάγνωσης ενδομήτριων λοιμώξεων. Η ανάλυση πραγματοποιείται με ειδικούς εκκινήτες (primers) για τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας 16S rRNA που είναι συντηρημένη μεταξύ των βακτηριδίων [145],[146]. Οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύονται συχνότερα στην αμνιακή κοιλότητα εγκύων με πρόωρο τοκετό είναι το *Mycoplasma spp* και το *Ureaplasma urealyticum* [147]. Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί του κατώτερου γεννητικού συστήματος όπως ο *Streptococcus agalactiae* ανιχνεύονται σπανιότερα, εκτός αν έχει προηγηθεί ρήξη εμβρυικών μεμβρανών.

Η μετάδοση των παθογόνων βακτηριδίων στην αμνιακή κοιλότητα γίνεται κυρίως με την ανιούσα οδό, μέσω του κόλπου και του τραχήλου [148]. Κατά δεύτερο λόγο μπορεί να γίνει αιματογενώς μέσω του πλακούντα, με εισαγωγή μικροβίων κατά τη διενέργεια επεμβατικών διαγνωστικών εξετάσεων στην αμνιακή κοιλότητα ή με παλίνδρομη διάχυση από τις σάλπιγγες. Η ανιούσα λοίμωξη συμβαίνει συνήθως κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης χωρίς να αποκλείεται ασυμπτωματική ενδομήτρια λοίμωξη ακόμη και πριν την εγκυμοσύνη. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο αποικισμός της αμνιακής κοιλότητας γίνεται μετά

την 20<sup>η</sup> εβδομάδα, όταν οι εμβρυικές μεμβράνες έρχονται σε στενή επαφή με τον φθαρτό. Τότε οι έγκυες γίνονται συμπτωματικές και οδηγούνται σταδιακά σε πρόωρο τοκετό.

## 1.9 Γενετική βάση Πρόωρου Τοκετού

Η τάση επανάληψης του πρόωρου τοκετού και η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της επιπλοκής σε γυναίκες οι οποίες έχουν και οι ίδιες γεννηθεί πρόωρα υποδηλώνουν την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης [149]. Η άποψη αυτή ενισχύεται από ευρήματα μελετών σε διδύμους που αποδεικνύουν 17% έως 36% γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της επιπλοκής [150]. Επιπλέον γενετικά νοσήματα όπως η μυοτονική δυστροφία, τα σύνδρομα Ehlers-Danlos και Smith-Lemli-Opitz καθώς και η Νευροϊνωμάτωση έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού πιθανώς λόγω της αυξημένης παραγωγής αμνιακού υγρού.

Τα τελευταία χρόνια η αναγνώριση γονιδίων που πιθανά σχετίζονται με την πρόωρη έναρξη του τοκετού έδειξε ότι η προωρότητα δεν οφείλεται απλά σε μία γονιδιακή παραλλαγή αλλά είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ γονιδίων ή γονιδίων με περιβαλλοντολογικούς παράγοντες [57]. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία ο πρόωρος τοκετός πιθανώς οφείλεται σε κοινές ή παθολογικές παραλλαγές γονιδίων των οποίων η δράση εκδηλώνεται όταν υπάρχει κάποιος άλλος παράγοντας [151]. Τα ευρήματα των μελετών αυτών περιλαμβάνονται στη «Βάση δεδομένων για τον πρόωρο τοκετό» (dbPTB), ένα διαδικτυακό εργαλείο συγκέντρωσης και οργάνωσης των γονιδίων και των γονιδιακών παραλλαγών που εμπλέκονται στον πρόωρο τοκετό. Αυτή η βάση δεδομένων είναι διαθέσιμη στο κοινό, ως πηγή για ερευνητές, που ενδιαφέρονται για τη γενετική του αυτόματου πρόωρου τοκετού ([www.dbptb.cs.brown.edu](http://www.dbptb.cs.brown.edu)). Μέχρι σήμερα στη βάση δεδομένων dbPTB περιλαμβάνονται συνολικά 617 γονίδια τα περισσότερα από τα οποία έχουν επιλεγεί με κριτήριο τις ρυθμιστικές οδούς στις οποίες συμμετέχουν χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτισή τους με τον πρόωρο τοκετό [152]. Επισημαίνεται ότι δεν είναι ακόμη διαθέσιμες γενετικές δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου σε κλινικό επίπεδο, καθώς και η ερμηνεία των ευρημάτων είναι προς το παρόν δύσκολη αλλά και δεν είναι διαθέσιμες θεραπευτικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση της επιπλοκής σε εγκύους «υψηλού κινδύνου» με συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές.

### 1.9.1 Γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη αντίδραση-αιμορραγία και μυομητρική δραστηριότητα.

Τα περισσότερα καλά μελετημένα γονίδια, όσον αφορά την εμπλοκή τους στην εμφάνιση πρόωρου τοκετού, είναι γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των προ- και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και των υποδοχέων τους καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την αιμορραγία του πλακούντα και τη μυομητρική δραστηριότητα.

Οι Amory και συν. διαπίστωσαν αυξημένη συχνότητα πρόωρου τοκετού σε γυναίκες ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο-863 A του γονιδίου *TNF-α* ενώ οι Roberts και συν. αναφέρουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου -308 A του υποκινητή του *TNF-α* με τον πρόωρο τοκετό και τη πρόωρη ρήξη εμβρυικών μεμβρανών σε Αφροαμερικανές [153],[154].

Σε μία άλλη μελέτη οι Menon και συν., διαπίστωσαν θετική συσχέτιση κοινών παραλλαγών των υποδοχέων *TNFR1* και *TNFR2* του *TNF-α* με τον πρόωρο τοκετό [155].

Ομοζυγωτία του αλληλομόρφου -174 C του γονιδίου *IL-6* έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό σε γυναίκες της λευκής φυλής ενώ αντιθέτως κοινές παραλλαγές του υποδοχέα της *IL-6R* (*IL-6R*) στις θέσεις -37672 και -4553185 έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής μεταξύ Αφροαμερικανών [156].

Οι Bessler και συν. αναφέρουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρόωρου τοκετού σε έμβρυα ομοζυγώτες για την παραλλαγή *IL-1RN\*2* του ιντρόνιου 2 του *IL-1ra* του εμβρύου και αυξημένο κολπικό αποικισμό σε γυναίκες της μαύρης φυλής [157].

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *G20210A* της προθρομβίνης και παραλλαγές των γονιδίων των παραγόντων *VII* (121del/ins) και *XIII* (Val34Leu) ανιχνεύονται συχνότερα σε πρόωρα νεογνά με πολύ χαμηλό βάρος γέννησης ενώ η συχνότητα της παραλλαγής -Val34Leu του παράγοντα *XIII* είναι εξαιρετικά σπάνια σε αυτά [158],[159]. Οι Parazoglou και συν. συνέδεσαν τις παραλλαγές -634G/C και -936C/T του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού [160].

Οι Landau και συν., ταυτοποίησαν παραλλαγές στα κωδικόνια 16 και 27 του β-2 αδρενεργικού υποδοχέα (*beta2-AR*) που σχετίζονται με την εμφάνιση του πρόωρου τοκετού [161]. Παρά το ότι τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ακόμη αντικρουόμενα φαίνεται ότι ομοζυγωτία του αλληλόμορφου A στο κωδικόνιο 16 (Arg-16) συνδέεται με μείωση της γονιδιακής έκφρασης του *beta2-AR* με αποτέλεσμα να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι του πρόωρου τοκετού [162],[163],[164]. Επισημαίνεται ότι οι β-2 αδρενεργικοί υποδοχείς στα μητριαία αγγεία αναστέλλουν τις συσπάσεις της μήτρας και έχουν την δυνατότητα να παρατείνουν την εγκυμοσύνη για τουλάχιστον 48 ώρες.

Πιο πρόσφατα, οι Zhang και συν., ταυτοποίησαν στο γονιδίωμα γυναικών Ευρωπαϊκής καταγωγής παραλλαγές έξι γονιδίων των *EBF1*, *EEFSEC*, *AGTR2*, *WNT4*, *ADCY5* και *RAP2C*, που πιθανώς συνδέονται με τη διάρκεια της κύησης καθώς και παραλλαγές των γονιδίων *EBF1*, *EEFSEC* και *AGTR2* που πιθανώς συσχετίζονται με τον πρόωρο τοκετό [165].

Το γονίδιο *EBF1*, το οποίο κωδικοποιεί τον πρώιμο παράγοντα Β-κυττάρου 1, είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη των Β-κυττάρων [166]. Μελέτες συσχέτισης έχουν δείξει ότι συγκεκριμένη παραλλαγή του *EBF1* εμπλέκεται στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης, το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας, τον υποσπαδία και το μεταβολικό σύνδρομο [166],[167],[168],[169]. Προς το παρόν όμως δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο παραλλαγές του *EBF1* σχετίζονται με τη διάρκεια της κύησης μέσω ειδικών μηχανισμών για την εγκυμοσύνη ή μέσω της γενικότερης συσχέτισης τους με τα καρδιαγγειακά νοσήματα ή τις διαταραχές του μεταβολισμού που επηρεάζουν την κύηση. Το γονίδιο *EEFSEC*, κωδικοποιεί τον ειδικό ευκαρυωτικό παράγοντα επιμήκυνσης tRNA σεληνοκυστεΐνης που είναι απαραίτητος για την ενσωμάτωση της σεληνοκυστεΐνης στις σεληνοπρωτεΐνες. Οι σεληνοπρωτεΐνες εξυπηρετούν τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της αντιοξειδωτικής άμυνας και ως εκ τούτου εμπλέκονται στην φλεγμονώδη αντίδραση [11],[170],[171],[172].

### 1.9.2 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος

Παρόλο που ορισμένες μεταλλάξεις γονιδίων αυξάνουν τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό, πολλές γυναίκες φορείς των κοινών παραλλαγών δεν οδηγούνται σε πρόωρο τοκετό. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη διατύπωση της θεωρίας ότι ο πρόωρος τοκετός είναι το τελικό αποτέλεσμα όχι μιας γονιδιακής παραλλαγής αλλά αλληλεπίδρασης μεταξύ γονιδίων ή/και μεταξύ γονιδίων και παραγόντων του περιβάλλοντος.

Πρόσφατα, οι Macones και συν. περιέγραψαν αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος μέσω της κοινής παραλλαγής 308α του *TNF-α* και της βακτηριακής κολπίτιδας [172]. Γυναίκες φορείς της παραλλαγής με βακτηριακή κολπίτιδα βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό από αυτές που είχαν μόνο τον ένα από τους δύο παράγοντες. Είναι πάντως αυτονόητο ότι μια τέτοια συσχέτιση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί από περισσότερες μελέτες.

Το κάπνισμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για πρόωρο τοκετό με αδιευκρίνιστο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι παραλλαγές των γονιδίων *CYP1A1*, *MspI* και *GSTT1* που προδιαθέτουν τους καπνιστές στην εμφάνιση καρκίνου πνεύμονα σχετίζονται και με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού

σε καπνίστριες [173]. Οι Nukui και συν., έδειξαν ότι γυναίκες ομοζυγώτες για τη παραλλαγή T1 στο γονίδιο *GSTT1* που είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό του καπνού, βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό όταν εκτεθούν σε καπνό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [174].

Ως γνωστό το φυλικό οξύ είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη Β (βιταμίνη Β9) που εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες του μεταβολισμού και συμβάλει στην ομαλή εμβρυϊκή ανάπτυξη. Το φυλικό οξύ αποτελεί βασικό υπόστρωμα για μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων που απαιτούνται για τη σύνθεση των αμινοξέων και τον μεταβολισμό των βιταμινών ενώ παράλληλα συμβάλει στην σύνθεση πρωτεϊνών υπεύθυνων για την αντιγραφή του DNA. Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η λήψη φυλικού οξέος ή συμπληρωμάτων του κατά την περίοδο πριν ή περί την σύλληψη αλλά και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για την εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού, καθώς έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος και μειώνει τους δείκτες φλεγμονής [175]. Επιπλέον, παραλλαγές γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του φυλικού οξέος (*DHFR* και *SHMT1*) αυξάνουν τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό ακόμη και σε ετεροζυγώτες μιας τέτοιας γενετικής παραλλαγής με επαρκή πρόσληψη φυλικού οξέος [176],[177].

### 1.9.3 Επιγενετική

Η επιγενετική, δηλαδή η μελέτη των γενετικών αλλαγών που οδηγούν σε τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης χωρίς αλλαγή της αλληλουχίας του DNA είναι μία εξελισσόμενη περιοχή έρευνας στη μαιευτική. Σε αντίθεση με τη μελέτη παραλλαγών του γονιδιωματικού DNA, οι επιγενετικές παραλλαγές είναι λιγότερο στατικές, επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. κάπνισμα, έκθεση σε φάρμακα) και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των κυήσεων [178].

Η πιο κοινή επιγενετική τροποποίηση είναι η μεθυλίωση CpG - δηλαδή η τοποθέτηση μιας μεθυλομάδας στο 5' άκρο ενός δακτυλίου κυτοσίνης-για να σχηματιστεί η 5-μεθυλοκυτοσίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτή η υπερμεθυλίωση οδηγεί σε γονιδιακή σίγαση (μειωμένη μεταγραφή). Αντίθετα, η υπομεθυλίωση σε περιοχή του υποκινητή γονιδίου θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση γονιδίου (αυξημένη μεταγραφή).

Η αξιολόγηση της γονιδιακής μεταγραφής και της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για υποκείμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μητρικού γονιδιώματος και περιβάλλοντος ή/και εμβρυικών ρυθμιστικών οδών και περιβάλλοντος που συμβάλλουν τελικά στη διατήρηση της εγκυμοσύνης ή στην εκδήλωση πρόωρου

τοκετού. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *PTGER2* και του επαναλαμβανόμενου πυρηνικού στοιχείου *LINE 1-HS* σε τραχηλικό επίχρισμα στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης (16<sup>0</sup> έως 19<sup>+6</sup> εβδομάδες κύησης) έδειξε ότι έχει την δυνατότητα πρόβλεψης της διάρκειας της κύησης [179]. Επιπλέον, υπερμεθυλίωση του *LINE1-HS DNA* έχει παρατηρηθεί σε εγκύους που εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου, γνωστό παράγοντα κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό [180]. Κατά πόσο οι προαναφερθείσες επιγενετικές τροποποιήσεις είναι εμφανείς σε πρώιμο στάδιο κατά τη διάρκεια της κύησης ώστε να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη δοκιμασίας προσυμπτωματικού ελέγχου για την εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού στο μέλλον είναι άγνωστο και αποτελεί πεδίο εντατικής ερευνητικής προσπάθειας.

## **1.10 Πρόληψη πρόωρου τοκετού**

### **1.10.1 Πρωτογενής πρόληψη**

Θεωρητικά η αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου για πρόωρο τοκετό και η συστηματική αποφυγή τους, όταν αυτό είναι εφικτό, ή η θεραπευτική αντιμετώπιση έχει την δυνατότητα να συμβάλλει στην ελάττωση της συχνότητας του πρόωρου τοκετού [181],[182]. Όσον αφορά εγκύους με παράγοντες κινδύνου που δεν μπορούν να τροποποιηθούν, (π.χ. ιστορικό πρόωρου τοκετού) η στενότερη παρακολούθηση έχει την δυνατότητα πρόληψης ενός σημαντικού αριθμού πρόωρων τοκετών. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε σε ποσοστό πρόωρων τοκετών που υπερβαίνει το 50%, δεν αναγνωρίζεται κανένας παράγοντας κινδύνου και ως εκ τούτου σε αυτές τις κυήσεις απαιτείται διαφορετική προσέγγιση.

Πρόσφατα η μελέτη *ASPIRIN* αξιολόγησε την δυνατότητα πρωτογενούς πρόληψης του αυτόματου πρόωρου τοκετού σε 12.000 πρωτότοκες γυναίκες με μονήρεις κυήσεις από έξι χώρες, με χορήγηση ασπιρίνης (80mg ημερησίως) από την 6<sup>η</sup>-14<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης μέχρι και την 36<sup>η</sup> [183]. Από τα ευρήματα της μελέτης προέκυψε μείωση του κινδύνου για πρόωρο τοκετό πριν την 37<sup>η</sup> εβδομάδα (11,6% vs 13,1%), μείωση του κινδύνου για πρόωρο τοκετό πριν την 34<sup>η</sup> (3,3% vs 4,0%) καθώς και ελάττωση της επίπτωσης των αποβολών και της περιγεννητικής θνησιμότητας. Παρά τα ενθαρρυντικά ευρήματα της ερευνητικής αυτής προσπάθειας απαιτούνται περαιτέρω μελέτες μέχρι να αποφασιστεί η χρησιμοποίηση της ασπιρίνης στον γενικό μαιευτικό πληθυσμό για τη πρόληψη του αυτόματου πρόωρου τοκετού.

### **1.10.2 Πρόληψη του πρόωρου τοκετού σε κυήσεις υψηλού κινδύνου**



Έχουν διερευνηθεί διάφορες προληπτικές επεμβάσεις με σκοπό τη μείωση της συχνότητας και επανάληψης του πρόωρου τοκετού. Τα υπάρχοντα δεδομένα παρέχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα και υποδεικνύουν βελτίωση στα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης για τις εγκύους που λαμβάνουν φροντίδα σε εξειδικευμένα κλινικά κέντρα.

Προοπτική μελέτη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των θεραπευτικών παρεμβάσεων με σύγκριση στοιχείων πριν και μετά την εφαρμογή ολοκληρωμένου προγράμματος πρόληψης της προωρότητας στη Δυτική Αυστραλία έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του αυτόματου πρόωρου τοκετού [184]. Ομοίως, μείωση των ποσοστών του υποτροπιάζοντα πρόωρου παρατηρήθηκε σε γυναίκες που νοσηλεύονταν σε κλινική πρόληψης πρόωρου τοκετού Salt Lake City, Utah [185].

#### *Συμπληρώματα προγεστερόνης*

Η προγεστερόνη είναι αναμφισβήτητα η πιο καλά μελετημένη στρατηγική για την πρόληψη εμφάνισης της επιπλοκής σε εγκύους με ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού. Παρά το ότι ο μηχανισμός δράσης της προγεστερόνης δεν έχει διευκρινιστεί ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι λόγω των αντιφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων της η προγεστερόνη αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή για τη διατήρηση της κύησης στην μήτρα μέσω αναστολής της μυομητρικής δραστηριότητας και της απελευθέρωσης προσταγλανδινών [186]. Τυχαιοποιημένες μελέτες σε εγκύους με ιστορικό πρόωρου τοκετού δείχνουν ότι ενδομυϊκή χορήγηση 250mg 17-α υδροξυ-προγεστερόνης ή χρησιμοποίηση κολπικής προγεστερόνης από το δεύτερο τρίμηνο έως την 37<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης βελτιώνει το προγεννητικό αποτέλεσμα και ελαττώνει το ποσοστό των πρόωρων τοκετών [187],[188].

Σε γυναίκες χωρίς ιστορικό πρόωρου τοκετού στις οποίες διαπιστώθηκε βραχύς τράχηλος ( $\leq 20$  ή 25 mm), στο διακολπικό υπερηχογράφημα 2<sup>ου</sup> τριμήνου, η χορήγηση κολπικής προγεστερόνης έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο αυτόματου πρόωρου τοκετού. Στοιχεία δύο ανεξάρτητων μελετών έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της επίπτωσης της προωρότητας σε εγκύους με υπερηχογραφικά τεκμηριωμένο βραχύ τράχηλο [189]. Αντίθετα, ευρήματα της πολυκεντρικής τυχαιοποιημένης μελέτης OPTIMUM δεν επιβεβαίωσαν την μείωση του κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό σε εγκύους υψηλού κινδύνου στις οποίες χορηγήθηκε κολπική προγεστερόνη έναντι του εικονικού φαρμάκου (placebo) [190]. Ωστόσο παραμένει να διευκρινιστούν τα κριτήρια επιλογής των εγκύων που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη χορήγηση προγεστερόνης καθώς και της οδού χορήγησης.

Με βάση τα ευρήματα αυτά προτείνεται σε πολλές χώρες η προληπτική χορήγηση προγεστερόνης σε εγκύους με υψηλό κίνδυνο για πρόωρο τοκετό [191].

#### *Τοποθέτηση πεσσού*

Η τοποθέτηση ενδοκολπικά πεσσού χρησιμοποιείται ως μέθοδος ελάχιστα επεμβατική και εύκολα εφαρμόσιμη για την διαχείριση της ανεπάρκειας τραχήλου της μήτρας ή την πρόληψη υποτροπιάζοντα αυτόματου πρόωρου τοκετού [182]. Η εφαρμογή πεσσού μεταβάλλει τη γωνία του άξονα του τραχήλου σε σχέση με τον άξονα της μήτρας, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός στην ανιούσα λοίμωξη από τον κόλπο.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις όσον αφορά το όφελος από τη χρήση πεσσού. Οι *Arabin και συν.*, έδειξαν ότι η τοποθέτηση πεσσού μπορεί να μειώσει σημαντικά την επίπτωση του πρόωρου τοκετού πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (OR: 0,18/ 95% CI: 0,08-57 0,37) [192]. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τους *Sacccone και συν.* [193]. Αντιθέτως, σύμφωνα με πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη, η τοποθέτηση πεσσού δεν φαίνεται να επηρεάζει την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό σε μονήρεις κυήσεις ηλικίας μικρότερης των 34 εβδομάδων και μήκος τραχήλου <25mm όπως και το σύνολο των πρόωρων τοκετών με δίδυμες κυήσεις [194].

Διάφοροι τύποι πεσών είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο με τον πεσό *Arabin* από σιλικόνη να είναι ο πλέον δημοφιλής [192]. Η χρήση του έχει εγκριθεί από το την ΕΕ (CE0482/EN ISO 13485:2003 Annexe/III of the Council Directive 93/42 EEC), το FDA και ένα σημαντικό αριθμό χωρών.

#### *Περίδεση τραχήλου*

Η περίδεση τραχήλου παρέχει δομική υποστήριξη στον δυσλειτουργικό τράχηλο σε εγκύους υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ευρέως για την χειρουργική διαχείριση της τραχηλικής ανεπάρκειας και την πρόληψη του υποτροπιάζοντα αυτόματου πρόωρου τοκετού [195].

Σε σημαντικό ποσοστό εγκύων η περίδεση τραχήλου επιτυγχάνει παράταση της κύησης πέραν των 32 εβδομάδων, ανεξάρτητα από την ένδειξη, ενώ σε άλλες η θεραπευτική αντιμετώπιση αποτυγχάνει και γεννούν πολύ πρόωρα [181]. Σε εγκύους με ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης η περίδεση τραχήλου προσφέρεται ως επιλογή στο τέλος του πρώτου τριμήνου ή εναλλακτικά μετά από μέτρηση του μήκους του τραχήλου στο μέσο του δεύτερου τριμήνου της κύησης και σε δεύτερο χρόνο περίδεση τραχήλου εάν ο τράχηλος βραχύνει χωρίς συμπτώματα

πρόωρου τοκετού. Σε μονήρεις κύησεις με ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και μήκος τραχήλου <15 mm, έχει αποδειχθεί ότι η περιδέση τραχήλου αποτρέπει τον τοκετό πριν την 35<sup>η</sup> εβδομάδα και μειώνει την νεογνική νοσηρότητα και περιγεννητική θνησιμότητα ενώ αυξάνει σημαντικά το ποσοστό των καισαρικών τομών [196].

Όσον αφορά τις δίδυμες κύησεις, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να τεκμηριώνουν την άποψη ότι η περιδέση τραχήλου αποτρέπει τον αυτόματο πρόωρο τοκετό [194].

### **1.11 Πρόβλεψη του κινδύνου για πρόωρο τοκετό**

Η έγκαιρη αναγνώριση εγκύων υψηλού κινδύνου για πρόωρο τοκετό είναι ιδιαίτερα σημαντική δεδομένου ότι πλέον υπάρχει δυνατότητα πρώιμης θεραπευτικής παρέμβασης προκειμένου αποφευχθεί η προωρότητα.

#### **1.11.1 Μοντέλα πρόβλεψης με βάση τους παράγοντες κινδύνου**

Είναι διαθέσιμα αρκετά μοντέλα πρόβλεψης του πρόωρου τοκετού που συνδυάζουν ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου και στοιχεία του ατομικού μαιευτικού ιστορικού (ηλικία, δείκτης μάζας-σώματος, εθνικότητα, κάπνισμα, τρόπος σύλληψης, αριθμός τοκετών, ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού). Ωστόσο, η θετική προγνωστική αξία τους δεν ξεπερνά το 30% και ποικίλει ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό [196],[197],[198].. Γυναίκες με μονήρη κύηση, χωρίς κάποιο παράγοντα κινδύνου για πρόωρο τοκετό έχουν 35% έως 45% κίνδυνο να γεννήσουν πρόωρα, πριν την 35<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, με θετική προγνωστική αξία 20-30%. Επιπλέον επειδή στο σχεδιασμό των μοντέλων αυτών το ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε πρωτότοκες γυναίκες [199].

Η δυνατότητα πρόβλεψης του πρόωρου τοκετού δεν βελτιώνεται με την προσθήκη στο μοντέλο μιας σειράς βιοχημικών βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση κύησεων υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου όπως η σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη πρωτεΐνη-A (PAPP-A), η ελεύθερη β-ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (β-hCG), ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PlGF), η πρωτεΐνη πλακούντα 13 (PP13), η Α αποσινδρίνη και μεταλλοπρωτεάση 12 (ADAM12), η α-εμβρυοπρωτεΐνη (αFP), η ινχιμπίνη-A και η ακτιβίνη-A [200],[201],[202],[203],[204],[205],[206].

### 1.11.2 Βιοχημικοί Βιοδείκτες πρόβλεψης του κινδύνου για πρόωρο τοκετό

- *Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες*

Δεδομένης της συσχέτισης του πρόωρου τοκετού με την φλεγμονώδη αντίδραση και την λοίμωξη διάφοροι παράγοντες φλεγμονής στο περιφερικό αίμα εγκύων, το αμνιακό υγρό και τις κολποτραχηλικές εκκρίσεις έχουν μελετηθεί εκτενώς ως εναλλακτικοί υποψήφιοι βιοδείκτες για την εκτίμηση του κινδύνου προωρότητας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, IL-6, IL-1α, IL-8, ο παράγοντας TNF-α και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση από τους Wei και συν., αξιολόγησε την σχέση των κυτοκινών με τον αυτόματο πρόωρο τοκετό σε ασυμπτωματικές εγκύους και έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα IL-6 και CRP στο αμνιακό υγρό και τις κολποτραχηλικές εκκρίσεις αποτελούν ένδειξη επικείμενου τοκετού [207]. Άλλες δημοσιευμένες μελέτες που αξιολογούν τη συσχέτιση μεταξύ φλεγμονωδών κυτοκινών και αυτόματου πρόωρου τοκετού επιβεβαιώνουν τα ευρήματα αυτά [208],[209],[210],[211]. Η χρησιμοποίηση όμως των δεικτών αυτών στον προσυμπτωματικό έλεγχο δεν προτείνεται, προς το παρόν τουλάχιστον, αφ' ενός μεν γιατί δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί αφ' ετέρου δε λόγω του επεμβατικού τρόπου συλλογής των δειγμάτων που απαιτούνται για ανάλυση.

- *Εμβρυική φιβρονεκτίνη*

Η εμβρυική φιβρονεκτίνη (fetal Fibronectin- fFN) είναι γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας που παράγεται από τις εμβρυϊκές μεμβράνες και λειτουργεί ως μέσο προσκόλλησης μεταξύ πλακούντα και μεμβρανών [212].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας της fFN στις κολποτραχηλικές εκκρίσεις και του κινδύνου εμφάνισης αυτόματου πρόωρου τοκετού [212],[213]. Επίπεδα fFN >50 ng/mL μετά τη 22<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για αυτόματο πρόωρο τοκετό ενώ επίπεδα <50 ng/ml κρίνονται ως αρνητικό αποτέλεσμα [214].

Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό για την χρησιμοποίηση των επιπέδων του fFN ως δείκτη πρόβλεψης του πρόωρου τοκετού, η δοκιμασία έχει μικρή ευαισθησία και χαμηλή θετική προγνωστική αξία τόσο σε συμπτωματικές όσο και σε ασυμπτωματικές εγκύους. Τιμή fFN>50ng/ml στις κολποτραχηλικές εκκρίσεις την 22<sup>η</sup> έως 28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, σε συμπτωματικές εγκύους, έχει δυνατότητα πρόβλεψης εμφάνισης της επιπλοκής πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης με 55% ευαισθησία και 27% θετική προγνωστική αξία [215]. Σε μελέτη 9.410 ασυμπτωματικών εγκύων μεταξύ 22<sup>ης</sup> και 30<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης, με

μονήρεις κυήσεις και μήκος τραχήλου μεγαλύτερο των 15mm, η δοκιμασία fFN έδειξε ευαισθησία και θετική προγνωστική αξία 32,1% και 3,1% αντίστοιχα για την πρόβλεψη της επιπλοκής πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, για τιμές fFN>50 ng/ml [216].

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε συστηματική ανασκόπηση από τους Berghella και συν. και άλλες προοπτικές μελέτες παρατήρησης [217],[218],[219].

- *Phosphorylated insulin-like growth factor binding protein (pIIGFBP-1)*

Η πρωτεΐνη Phosphorylated insulin-like growth factor binding protein (pIIGFBP-1) παράγεται από κύτταρα του πλακούντα και απελευθερώνεται στο κοιλποτραχηλικό υγρό ως αποτέλεσμα ιστικής βλάβης [219]. Μετα-ανάλυση αξιολόγησης της δυνατότητας πρόβλεψης του αυτόματου πρόωρου τοκετού με ποιοτική δοκιμασία, με προσδιορισμό της pIIGFBP-1 σε κοιλικό επίχρισμα την 22<sup>η</sup> έως 36<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, σε συμπτωματικές εγκύους, έδειξε δυνατότητα πρόβλεψης επικείμενου τοκετού εντός των προσεχών 7 ημερών με ευαισθησία 67% (62% έως 72%) και ειδικότητα 77% (75% έως 79%) ενώ το αρνητικό αποτέλεσμα είχε περιορισμένη ακρίβεια για την ανίχνευση εγκύων χαμηλού κινδύνου [220]. Η ποιοτική δοκιμασία προσδιορισμού της *pIIGFBP-1* γίνεται με ανοσοχρωματογραφία με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit Actim Partus, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland.

- *Placental alpha-macroglobulin-1 (PAMG-1)*

Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τον πλακούντα και ανιχνεύεται σε υψηλή συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό. Η δοκιμασία αναπτύχθηκε αρχικά για την πρόβλεψη της ρήξης των εμβρυϊκών μεμβρανών. Έχουν δημοσιευθεί ωστόσο αρκετές μελέτες που περιγράφουν την δυνατότητα της PAMG-1 να προβλέπει τον κίνδυνο για αυτόματο πρόωρο τοκετό εντός 7 ή 14 ημερών από τη δοκιμή σε εγκύους με συμπτώματα πρόωρου τοκετού και άθικτες μεμβράνες [221].

Στην πρώτη πολυκεντρική, πολυεθνική κλινική μελέτη αξιολόγησης της δοκιμής PAMG-1 για την πρόβλεψη του αυτόματου πρόωρου τοκετού εντός 7 ημερών διαπιστώθηκε 97.4% ευαισθησία, 96.1% ειδικότητα και 93.6% αρνητική προγνωστική αξία (NPV) [221]. Σε μεταγενέστερη, μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, στην οποία έγινε σύγκριση της κλινικής αξίας της PAMG-1 με αυτή της fFN για την πρόβλεψη αυτόματου πρόωρου τοκετού οι συγγραφείς αναφέρουν ευαισθησία 80% και 50%, ειδικότητα 95% και 72% και NPV 96% και 87% αντίστοιχα [222]. Οι Werlen και συν. επιβεβαίωσαν την σημαντική

ακρίβεια της δοκιμής [ειδικότητα (97,5% [CI 95%; 86,8-99,9]) και NPV (97,5% [CI 95%; 86,8-99,9]) και έδειξαν ότι τα αποτελέσματα ενδέχεται να μην επηρεάζονται από προηγούμενη κολπική εξέταση γεγονός που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα [223].

### **1.11.3 Βιοφυσικοί δείκτες- Υπερηχογραφική εκτίμηση του μήκους του τραχήλου**

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 η παρατήρηση ότι η εξάλειψη του τραχήλου σχετίζεται άμεσα με τον τοκετό και ότι οι μεταβολές του τραχήλου παρατηρούνται 4 έως και 8 μήνες πριν από τον τοκετό οδήγησε στην χρήση της υπερηχογραφικής μέτρησης του μήκους τραχήλου ως δείκτη αντικειμενικού και ελάχιστα επεμβατικού ελέγχου για την εκτίμηση του κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό. Ταυτόχρονα διατυπώθηκε για πρώτη φορά η θεωρία ότι ο κίνδυνος για πρόωρο τοκετό είναι αντιστρόφως ανάλογος του υπερηχογραφικού μήκους του τραχήλου, και μάλιστα όσο πρωιμότερα καταγράφεται αυτή η μείωση τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος [224].

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης το μήκος του τραχήλου είναι γενικά σταθερό μεταξύ 14<sup>ης</sup> και 28<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης και ελαττώνεται σταδιακά από περίπου 43mm που υπολογίζεται την 16<sup>η</sup> εβδομάδα σε 31mm την 36<sup>η</sup>. Επισημαίνεται ότι βραχύτερος τράχηλος παρατηρείται σε γυναίκες Αφρικανικής και Ασιατικής καταγωγής, σε εγκύους ηλικίας μικρότερης των 20 ετών καθώς και σε γυναίκες με μικρό BMI[225].

Προκειμένου να ενταχθεί η υπερηχογραφική εκτίμηση του τραχήλου της μήτρας στη κλινική πράξη είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση ενιαίου πρωτοκόλλου [226]. Λεπτομέρειες περιγράφονται αναλυτικά σε πρόσφατες οδηγία της ISUAG) καθώς και της EMGE [227], [228].

Η υπερηχογραφική εκτίμηση του τραχήλου μπορεί να γίνει διακουλιακά ή με περινεϊκή υπερηχογραφία, όμως η διακολπική μέτρηση προτείνεται από τις διεθνείς μαιευτικές εταιρείες γιατί είναι ασφαλής, αξιόπιστη και με εξαιρετική επαναληψιμότητα των μετρήσεων, όταν εκτελείται από εκπαιδευμένους παρόχους [229],[230],[231]. Επίσημη εκπαίδευση διενέργειας και πιστοποίηση είναι διαθέσιμη μέσω πολλών διαδικτυακών εκπαιδευτικών προγραμμάτων όπως το Περιγεννητικό Πρόγραμμα Cervical Length Education and Review (CLEAR) (<https://clear.perinatalquality.org>) του Perinatal Quality Foundation και το πιστοποιητικό αξιολόγησης του τραχήλου της μήτρας Fetal Medicine Foundation, London UK. Όσον αφορά την ηλικία κύησης κατά την εκτίμηση, οι περισσότερες μαιευτικές εταιρείες, προκειμένου να καθοριστούν οι γυναίκες υψηλού κινδύνου να γεννήσουν πρόωρα, προτείνουν την μέτρηση του μήκους του τραχήλου κατά τη 18<sup>η</sup> έως την 25<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Το μήκος τραχήλου που έχει τεθεί ως όριο για την

έναρξη θεραπείας είναι τα 25mm για εγκύους με κάποιο παράγοντα κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό (ιστορικό πρόωρου τοκετού, κωνοειδής εκτομή) και τα 20 mm σε εγκύους χαμηλού κινδύνου.

Η συμβολή της υπερηχογραφικής μέτρησης του μήκους του τραχήλου στην εκτίμηση του κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό έχει αξιολογηθεί σε:

1. Συμπτωματικές εγκύους (κλινικά σημεία επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού)
2. Ασυμπτωματικές εγκύους τόσο υψηλού όσο και χαμηλού κινδύνου
3. Γενικό πληθυσμό εγκύων

• **Συμβολή της υπερηχογραφικής μέτρησης του μήκους του τραχήλου σε συμπτωματικές εγκύους**

Σε εγκύους με συμπτώματα επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού, η υπερηχογραφική εκτίμηση του μήκους του τραχήλου μπορεί να συμβάλλει στη σωστή διαχείριση της κύησης. Μετα-ανάλυση που δημοσιεύθηκε το 2017 έδειξε ότι η αντιμετώπιση του αληθιώς επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού βασιζόμενη στη μέτρηση του μήκους του τραχήλου συνέβαλλε, μέσω κατάλληλης διαχείρισης, σε μείωση κατά 36% των πρόωρων γεννήσεων πριν τη 37<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και σε παράταση της κύησης κατά 4,5 ημέρες (95% CI, 1,18–9,98 ημέρες) σε σχέση με τις συμπτωματικές εγκύους με άγνωστο μήκος τραχήλου [232]. Δύο χρόνια αργότερα, ανασκόπηση Cochrane που περιλαμβάνει 245 συμπτωματικές εγκύους με μονήρεις επιβεβαίωσε ευρήματα αυτά [233].

Όσον αφορά το όριο κάτω από το οποίο ο τράχηλος θεωρείται «κοντός» και απαιτείται λήψη κλινικών αποφάσεων οι Alfirevic και συν. προτείνουν τα 15 mm ενώ οι Palacio και συν. το μήκος τραχήλου  $\geq 25$  mm ως όριο πάνω από το οποίο η κύηση θεωρείται χαμηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό. [234],[235].

Ο καθορισμός του βέλτιστου ορίου μήκους τραχήλου για θεραπευτική παρέμβαση απαιτεί συνεκτίμηση της ηλικίας κύησης Σύμφωνα με τους Hiersch και συν., τα όρια για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης της δοκιμασίας αξιολόγησης του κινδύνου για αυτόματο Πρόωρο Τοκετό εντός των επόμενων 14 ημερών είναι τα 36mm για εγκύους στην 32<sup>+0</sup> έως 33<sup>+6</sup> εβδομάδα κύησης με συμπτώματα επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού, 32.5 mm για αυτές που παρουσιάζονται στη 30<sup>+0</sup> έως 31<sup>+6</sup> εβδομάδα, 24mm όταν τα συμπτώματα εμφανιστούν τη 27<sup>+0</sup> έως 29<sup>+6</sup> εβδομάδα και 20.5mm για τις εγκύους με συμπτώματα την 24<sup>+0</sup> έως 26<sup>+6</sup> εβδομάδα κύησης [236]. Επομένως, τιμές μήκους τραχήλου <15mm ή <20mm και  $\geq 30$ mm μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως προβλεπτικοί δείκτες για τη ταξινόμηση των εγκύων σε υψηλού ή χαμηλού κινδύνου για επικείμενο αυτόματο πρόωρο τοκετό εντός 14 ημερών, αντίστοιχα.

Πρόσφατη οδηγία της ISUOG προτείνει τη μέτρηση του μήκους του τραχήλου σε όλες τις εγκύους μεταξύ 22<sup>+0</sup> και 33<sup>+6</sup> εβδομάδων κύησης με συμπτώματα απειλούμενου πρόωρου τοκετού [228]. Εάν το μήκος του τραχήλου είναι  $\geq 30$  mm, η κύηση θεωρείται χαμηλού κινδύνου και αποφεύγονται άσκοπες παρεμβάσεις ενώ για τιμές  $<15$  mm ή  $<20$  mm, προτείνεται θεραπευτική αντιμετώπιση. Εάν το μήκος τραχήλου είναι μεταξύ 15 ή 20mm και 29mm, εφόσον υπάρχει η δυνατότητα, η διαλογή των εγκύων υψηλού ή χαμηλού κινδύνου μπορεί να γίνει με τη χρήση κάποιου βιοχημικού δείκτη. Επισημαίνεται ότι το όφελος από τη θεραπευτική παρέμβαση σε σχέση με τους κινδύνους από αυτή σαφώς ευνοεί την έναρξη θεραπείας σε εγκύους με μήκος τραχήλου μικρότερο των 25mm αντί των 20mm ή 15mm, αφού η μη παρέμβαση συνδέεται με μεγαλύτερο κίνδυνο για δυσμενή έκβαση της κύησης από τον κίνδυνο χορήγησης προγεστερόνης, η οποία δεν έχει συνδεθεί με ανεπιθύμητες ενέργειες.

- ***Συμβολή της υπερηχογραφικής μέτρησης του μήκους του τραχήλου σε ασυμπτωματικές έγκυες***

Σε εγκύους με μονήρεις κυήσεις χωρίς συμπτώματα επαπειλούμενου πρόωρου τοκετού η διαπίστωση, με διακολλικό υπερηχογράφημα, κοντού τραχήλου αυξάνει τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό [237],[238]. Γενικά, όσο πιο κοντός είναι ο τράχηλος και όσο πιο νωρίς κατά τη διάρκεια της κύησης εμφανιστεί η βράχυνση, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος. Συνήθη τακτική αποτελεί ο διαχωρισμός των εγκύων σε αυτές που εμφανίζουν κάποιο παράγοντα κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό (ιστορικό πρόωρου τοκετού, κωνοειδής εκτομή) και στις οποίες ως όριο παρέμβασης τίθενται τα 25mm, και σε αυτές χωρίς παράγοντες κινδύνου που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση του ελέγχου, για τις οποίες το όριο είναι τα 20mm [239]. Η ακρίβεια της πρόβλεψης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο πληθυσμός που μελετάται, η επίπτωση του αυτόματου πρόωρου τοκετού και η ηλικία κύησης. [225].

- ***Πληθυσμιακός έλεγχος για τη μέτρηση του μήκους του τραχήλου***

Η υιοθέτηση καθολικού πληθυσμιακού ελέγχου (screening) με μέτρηση του μήκους του τραχήλου αποτελεί θέμα ευρείας συζήτησης [240],[241],[242].. Μελέτη στις ΗΠΑ έδειξε αύξηση κατά 175 εκατομμύρια δολάρια των ετήσιων δαπανών για την υγεία τα οποία όμως φαίνεται να ισοσκελίζονται από την αποτελεσματικότητα της στρατηγικής [243]. Μετά την αναγνώριση ενός βραχέος τραχήλου σε ασυμπτωματικές εγκύους, η χορήγηση προγεστερόνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας του πρόωρου τοκετού με ταυτόχρονη μείωση των δαπανών που σχετίζονται με ατομική και οικογενειακή ιατρική περίθαλψη.

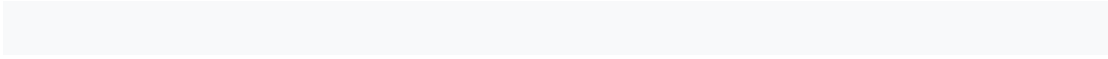


Αντίστοιχα, πρόγραμμα πρόληψης του αυτόματου πρόωρου τοκετού στην πολιτεία της Δυτικής Αυστραλίας, με αξιολόγηση του μήκους του τραχήλου, σε όλες τις εγκύους μεταξύ 18<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης, οδήγησε μέσα σε ένα χρόνο πλήρους εφαρμογής, σε μείωση κατά 7,6% του ποσοστού των μονήρων κήσεων με αυτόματο πρόωρο τοκετό σε εγκύους που αρχικά ταξινομήθηκαν ως χαμηλού κινδύνου. Οι Son και συν. αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα του καθολικού προσυμπτωματικού ελέγχου του μήκους του τραχήλου στη μείωση της επίπτωσης του αυτόματου πρόωρου τοκετού σε 46.598 σε εγκύους με μονήρη κύηση χωρίς ιστορικό πρόωρου τοκετού [229]. Στη μελέτη αυτή, η διακολλική εκτίμηση του μήκους του τραχήλου, στο πλαίσιο πληθυσμιακού ελέγχου, έγινε αποδεκτή από το 99,9% των εγκύων. Η προληπτική χορήγηση προγεστερόνης στις εγκύους υψηλού κινδύνου, με «κοντό» τράχηλο, οδήγησε σε μείωση της συχνότητας πρόωρου τοκετού πριν την 37<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης σε 6,7% έναντι 6,0%, πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα σε 1,9% έναντι 1,7% και πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα σε 1,1% έναντι 1,0%. Σε άλλη μελέτη που περιλαμβάνει 1.751 μονήρεις κήσεις χωρίς ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού, εφαρμογή καθολικού πληθυσμιακού ελέγχου, με εκτίμηση του μήκους του τραχήλου, συσχετίστηκε με μείωση της συχνότητας της επιπλοκής από 11,1% σε 6,7% καθώς και σε μείωση των εισαγωγών στο νοσοκομείο (από 2,3% σε 1,4%)<sup>81</sup> [244].

Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα η ISUOG αναθεώρησε πρόσφατα την οδηγία που αφορά τον καθολικό πληθυσμιακό έλεγχο (screening), με μέτρηση του μήκους του τραχήλου, για την πρόβλεψη του αυτόματου Πρόωρου Τοκετού και προτείνει τον έλεγχο με την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκής χρηματοδότηση, κατάλληλος εξοπλισμός, εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό και δυνατότητα συνταγογράφησης προγεστερόνης σε εγκύους υψηλού κινδύνου με μήκος τραχήλου  $\leq 25$  mm [228].

Οι περισσότερες Μαιευτικές εταιρείες, μεταξύ των οποίων και η ΕΜΓΕ, προκειμένου να ανιχνευτούν έγκαιρα οι έγκυες υψηλού κινδύνου να γεννήσουν πρόωρα προτείνουν την μέτρηση του μήκους του τραχήλου την 18<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, ταυτόχρονα με τη διενέργεια του υπερηχογραφήματος Β' επιπέδου (ανατομίας του εμβρύου). Το όριο που έχει τεθεί για την έναρξη θεραπείας έχει καθοριστεί στα 25mm.

Όσον αφορά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η προγνωστική ικανότητα του μήκους του τραχήλου για την πρόβλεψη του αυτόματου πρόωρου τοκετού είναι περιορισμένη και αυτό γιατί μόλις στο τέλος του πρώτου τριμήνου ο τράχηλος αρχίζει να απεικονίζεται ξεχωριστά από το κατώτερο τριτημόριο της μήτρας [245],[246]. Είναι προφανές ωστόσο ότι όσο πρωιμότερα τεθεί η διάγνωση του αυξημένου κινδύνου πρόωρου τοκετού τόσο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρέμβασης δίδεται στον κλινικό ιατρό.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ**

## 2.1 Εισαγωγή στην Πρωτεωμική

Ο όρος πρωτεωμική (proteomics), αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1974 από τον Marc Willkins για να περιγράψει την ευρείας κλίμακας μελέτη των πρωτεωμάτων δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό, συμπεριλαμβανομένης της δομής, των λειτουργιών, των αλληλεπιδράσεων και των τροποποιήσεων των πρωτεϊνών σε οποιοδήποτε στάδιο. Ο όρος περιγράφει την πρωτεϊνική έκφραση σε μία δεδομένη χρονική στιγμή ή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (φυσιολογικές ή με παρουσία ασθένειας).

Η πρωτεωμική (proteomics) συμπληρώνει τη γενωμική (genomics) στη μελέτη της βιολογίας των συστημάτων με μεγάλο αριθμό δεδομένων που έχουν την δυνατότητα να διευκολύνουν την κατανόηση των βιολογικών συστημάτων [247].

Οι πρωτεΐνες, ως τα κατ'εξοχήν λειτουργικά μόρια του οργανισμού, εμπλέκονται σχεδόν σε όλες τις βιολογικές διεργασίες και αντικατοπτρίζουν τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα που είναι σταθερό, το πρωτέωμα διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και μεταβάλλεται συνεχώς μέσω αλληλεπιδράσεων με το γονιδίωμα ή υπό την επίδραση εξωκυτταρικών ή/και ενδοκυτταρικών παραγόντων.

Η ανάλυση του πρωτεώματος είναι δυσκολότερη από την ανάλυση του γονιδιώματος. Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και αυτό γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις, από ένα γονίδιο παράγονται περισσότερες από μία πρωτεΐνες. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν περίπου 25.000 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για την παραγωγή περισσότερων από 1.000.000 πρωτεϊνών. Επίσης, πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μεταβάλλουν την έκφραση και την δραστηκότητά τους [247],[248].

Τις τελευταίες δεκαετίες η ανάπτυξη νέων πρωτεωμικών εργαλείων, κυρίως η ανάπτυξη της τεχνικής της φασματογραφίας μάζας, σε συνδυασμό με τις ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της βιοπληροφορικής, έχουν βοηθήσει τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών μειγμάτων, την κατανόηση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, καθώς και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [249].

## 2.2 Τεχνολογία της Πρωτεωμικής

Η τεχνολογία της πρωτεωμικής έχει αλλάξει ριζικά τον τρόπο ανάλυσης των πρωτεϊνών. Περιλαμβάνει δύο βασικές προσεγγίσεις [249]. Η πρώτη είναι η πρωτεωμική ανάλυση *bottom-up* κατά την οποία τα υπό ανάλυση βιολογικά υλικά υπόκεινται αρχικά σε ενζυμική πέψη και στη συνέχεια, τα πεπτιδία που σχηματίζονται αναλύονται με φασματογραφία μάζας [250]. Η δεύτερη προσέγγιση, η *top-down*, περιλαμβάνει τον διαχωρισμό ακεραιων πρωτεϊνικών μορίων τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε θραυσματοποίηση και ανάλυση των θραυσμάτων με φασματογραφία μάζας [251].

Η τεχνολογία της πρωτεωμικής περιλαμβάνει μεθόδους για τον

- Διαχωρισμό πρωτεϊνών
- Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων με φασματογραφία μάζας
- Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

### 2.2.1 Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών διευκολύνει την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων και την μελέτη ολόκληρων πρωτεωμάτων με απώτερο στόχο την αναγνώριση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων ή ομάδων δειγμάτων.

- Διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε γέλη (*Gel proteomics*)

Η πλέον δημοφιλής μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-D), η οποία αναπτύχθηκε το 1975 από τον O'Farrell [252]. Η τεχνική επιτρέπει τον διαχωρισμό ακόμα και 1800 πρωτεϊνών και περιλαμβάνει δύο στάδια.

Στην τυπική ηλεκτροφόρηση 2-D, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ηλεκτρικό φορτίο (ισοηλεκτρικό σημείο-IP), μέσω ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF), και την μοριακή μάζα σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που περιέχει δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS-PAGE). Η οπτικοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών γίνεται με χρώση είτε για το ορατό εύρος (κολλοειδές Coomassie blue, ψευδάργυρος ιμιδαζόλη και νιτρικός άργυρος/διαμίνη (Ag), είτε για το μη ορατό [χρώση φθορισμού (sypro ruby κ.λπ.)]. Στη συνέχεια οι εικόνες των πηκτωμάτων ψηφιοποιούνται και αναλύονται με ειδικό λογισμικό για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε πρωτεΐνης

Για να είναι δυνατή η άμεση σύγκριση διαφορετικών μειγμάτων πρωτεϊνών, αναπτύχθηκε η τεχνική της διαφορικής ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα [Differential in-gel electrophoresis

(DIGE)] που επιτρέπει την ταυτόχρονη σύγκριση πρωτεϊνών σημασμένων με φθοριοχρώματα σε διαφορετικά μείγματα. Στη περίπτωση αυτή, δύο δείγματα επισημαίνονται με διαφορετικά φθοριοχρώματα (Cy3 και Cy5) και αναμειγνύονται πριν από την ηλεκτροφόρηση [254],[255],[256]. Παράλληλα χρησιμοποιείται ένα εσωτερικό πρότυπο σημασμένο με μια τρίτη φθορίζουσα χρωστική (Cy2) για ποσοτική ανάλυση.

Η ηλεκτροφόρηση 2-D έχει εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα και δυνατότητα ταυτοποίησης μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων ακόμα και σε πολύπλοκα βιολογικά υλικά. Ωστόσο, είναι χρονοβόρα και δεν επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων (low throughput). Το σημαντικότερο όμως πρόβλημα με την ηλεκτροφόρηση 2-D είναι η αδυναμία ανίχνευσης πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση και ο αποκλεισμός από την ανάλυση πρωτεϊνικών ομάδων όπως οι υδρόφοβες μεμβρανικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες μεγέθους μεγαλύτερου των 250 kDa.

- *Χρωματογραφικές τεχνικές*

Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας [257] «χρωματογραφία είναι η φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα βιομόρια που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής (static phase) και μιας κινητής (mobile phase), προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση»[258]. Η κινητή φάση είναι διαλύτης ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση είναι πορώδες στερεό υλικό ή υγρό ακινητοποιημένο σε στερεό υπόστρωμα.

Κατά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με χρωματογραφία, κάθε μόριο μετακινείται πολλές φορές μεταξύ κινητής και στατικής φάσης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται διαχωρισμός των βιομορίων με βάση τις διαφορές τους ως προς το ηλεκτρικό φορτίο και τις οξεοβασικές τους ιδιότητες, το μέγεθος των μορίων, την προσρόφσή τους σε διάφορα μέσα ή την κατανομή τους μεταξύ δύο φάσεων.

Με κριτήριο το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση, οι τεχνικές χρωματογραφίας ταξινομούνται σε *χρωματογραφία στήλης* και *επίπεδη χρωματογραφία*, ενώ με βάση το είδος της κινητής και στατικής φάσης σε *υγρή χρωματογραφία* και *αέρια χρωματογραφία* [258].

Ανάλογα με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων που υποβάλλονται σε χρωματογραφικό διαχωρισμό και της στατικής φάσης, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιοντανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας [259].

*Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography):* Ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό προσρόφησής τους στη στατική φάση.

*Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography):* Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ υγρής κινητής και υγρής στατικής φάσης. Η τεχνική χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων.

*Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography):* Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος γίνεται με βάση το μέγεθος των μορίων. Τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης ενώ τα μικρά μόρια εισέρχονται και κατά συνέπεια καθυστερούν να εξέλθουν.

*Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ion exchange chromatography):* Βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων και φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.

*Χρωματογραφία χημικής συγγένειας (affinity chromatography):* Οι υπό διαχωρισμό ουσίες δεσμεύονται εκλεκτικά σε μόρια υποκαταστάτες με τα οποία έχουν εκλεκτική συγγένεια.

### **2.2.2 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC)**

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν [260],[261],[262],[263]. Η στατική φάση είναι συνήθως στήλη με πορώδες υλικό. Επιλέγεται με βάση την αρχή του χρωματογραφικού διαχωρισμού σύμφωνα με την οποία τα όμοια μόρια διαχωρίζουν τα όμοια δηλ. πολικές στήλες απαιτούνται για τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων. Η διάμετρος της στήλης σχετίζεται άμεσα με την ευαισθησία του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η κινητή φάση είναι πάντοτε διάλυμα που περιέχει και το προς διαχωρισμό βιολογικό υλικό και ρέει μέσα στη στήλη.

Η υγρή χρωματογραφία διαχωρίζεται σε

- *Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης:* Η στατική φάση είναι πολική (συνήθως οξείδιο του πυριτίου) και αλληλοεπιδρά ισχυρά με τα πολικά μόρια της κινητής φάσης. Οι μη πολικές ενώσεις εκκλύονται από τη στήλη.
- *Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reverse phase-RP):* Η στατική φάση αποτελείται από υπόστρωμα στο οποίο έχουν προσροφηθεί μεγάλες αλυσίδες υδρογονανθράκων και είναι μη πολική. Οι μη πολικές ενώσεις της κινητής φάσης συνεπώς κατακρατούνται στη στήλη ενώ οι πολικές κινούνται γρήγορα και εκκλύονται πρώτες από τη στήλη.
- *Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High performance Liquid Chromatography-HPLC):* Είναι η πλέον δημοφιλής μέθοδος χρωματογραφικού διαχωρισμού των πρωτεϊνών

με υψηλή απόδοση και δυνατότητα διαχωρισμού μη πτητικών και θερμοευαίσθητων βιομορίων [263] Η μέθοδος βασίζεται στην υδροφοβικότητα των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν.

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης η κινητή φάση ρέει μέσω της στήλης, υπό την επίδραση υψηλής πίεσης, με αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιούνται στήλες μικρής διαμέτρου να αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα. Επιπλέον έχει τη δυνατότητα να συνδυάζει διάφορους τύπους στατικής φάσης με μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών διαλυμάτων και να επιτυγχάνει πολύπλοκους διαχωρισμούς.

### 2.2.3 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με Φασματογραφία μάζας

Η φασματογραφία μάζας εφαρμόζεται ήδη για περισσότερο από έναν αιώνα, ως τεχνική ταυτοποίησης και σχετικής ποσοτικοποίησης χημικών ενώσεων με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, για τον διαχωρισμό ιόντων με βάση την μάζα [264].

Ο πρώτος φασματογράφος μάζας κατασκευάστηκε το 1912 από τον J.J. Thompson και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  και  $COCl_2$ . Το 1918 ο A.J. Dempster, μαθητής του Thompson, κατασκεύασε το φασματόμετρο μαγνητικής εστίασης με πηγή ιοντισμού την πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Ένα χρόνο αργότερα, το 1919, ο F.W. Aston (βραβείο Nobel Χημείας, 1922) περιέγραψε το πρώτο φασματόμετρο μάζας με εστίαση ταχύτητας, με τη χρησιμοποίηση ηλεκτροστατικών και μαγνητικών πεδίων, για την μελέτη ισοτόπων

#### *Αρχή λειτουργίας του Φασματογράφου Μάζας*

Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων/μορίων ή ιοντικών θραυσμάτων, με προσδιορισμό του λόγου μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ), την αντιστοίχιση των μαζών των παραγομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης και την απαρίθμηση των ιόντων κάθε κατηγορίας κατά την πρόσκρουση σε κατάλληλο μεταλλάκτη [265]. Ο λόγος  $m/z$  προκύπτει με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος ( $m$ ) με τον αριθμό ( $z$ ) των φορτίων του.

*Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από*

**1. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος και σύστημα υψηλού κενού (high vacuum system)** που επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος χωρίς να διαταράσσεται το κενό. Η παρουσία κενού στον φασματογράφο είναι απαραίτητη για την αποφυγή συγκρούσεων μεταξύ των ιόντων.



2. *Πηγή ιόντων* για την παραγωγή ελευθέρων ηλεκτρονίων και ιόντων σε αέρια φάση. Οι πηγές ιόντων διαφέρουν ανάλογα με την φύση του υπό μελέτη δείγματος και περιλαμβάνουν

- Χημικό ιονισμό (Chemical ionization)
- Ιονισμό μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια υψηλής ενέργειας (High energy particle impact)
- Ιονισμό με ψεκασμό από ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray, ESI)
- Θερμοψεκασμό (Thermo spray)
- Ιονισμός μέσω επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP)
- Χρήση μήτρας μέσω laser [MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization)]
- Ιονισμό από επιφάνεια μέσω laser (Surface enhanced laser desorption/ ionization, SELDI)

3. *Αναλυτή μάζας (mass analyzer)* : Διαχωρίζει τα ιονισμένα μόρια με κριτήριο τον λόγο  $m/z$

4. *Ανιχνευτή ιόντων (ion detector)*: Ενισχύει το σήμα και το μεταδίδεται στο σύστημα δεδομένων όπου καταγράφεται με τη μορφή φασμάτων μάζας. Οι τιμές  $m/z$  των ιόντων υπολογίζονται σε συνάρτηση με τις εντάσεις τους για να δείξουν τον αριθμό των συστατικών στο δείγμα, την μοριακή μάζα κάθε συστατικού και την σχετική αφθονία των συστατικών. Ο τύπος του ανιχνευτή επιλέγεται ώστε να ταιριάζει στον τύπο του αναλυτή. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτών ιόντων είναι οι φωτοπολλαπλασιαστές, οι πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων και οι ανιχνευτές πλακών καναλιού.

5. *Ηλεκτρονικό υπολογιστή*: Η παραγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων από τη χρήση μεθόδων υψηλής απόδοσης, όπως η πρωτεωμική, οδήγησε σε αυξημένη εξάρτηση από ηλεκτρονικούς υπολογιστές για την διαχείριση των δεδομένων με μεθόδους βιοπληροφορικής [266]. Ο νέος και ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας της βιοπληροφορικής, εισάγει συνεχώς νέους αλγόριθμους για το χειρισμό μεγάλων και ετερογενών δεδομένων, την βελτίωση της διαδικασίας ανάλυσης, την συσχέτιση τους με τα θεωρητικά φάσματα από βάσεις δεδομένων, την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια ειδικών στατιστικών εργαλείων και την αυτόματη σύγκριση των δεδομένων.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων για αναζήτηση των φασμάτων είναι οι ακόλουθες:

- UniProt, που αποτελείται από τις βάσεις Swiss-Prot και TrEMBL.
- Entrez από το National Center for Biotechnology Information (NCBI).
- RefSeq (Reference Sequence) του NCBI.
- International Protein Index (IPI).

### 2.2.4 Μέθοδοι ιονισμού

- *Χρήση μήτρας μέσω laser [Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI)]*

Ο ιονισμός με τη χρήση μήτρας Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI) μέσω laser χρησιμοποιείται για την ανάλυση πρωτεϊνικών κηλίδων μετά από ηλεκτροφόρηση 2-D. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάμειξη του δείγματος με οργανική ένωση (matrix) που απορροφά στο μήκος κύματος που εκπέμπει το laser με αποτέλεσμα την δημιουργείται παλμικής ακτινοβολίας η οποία προκαλεί θέρμανση και εξάτμιση της περίσσειας κρυστάλλων στο matrix [249],[267],[268]. Τα υλικά της μήτρας (matrix), συνήθως 3,5-διμεθοξυ-4-υδροκινναμικό οξύ (σιναπινικό οξύ) ή 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, σχηματίζουν ασπίδα που προστατεύει τις πρωτεΐνες/πεπτίδια από βλάβες κατά την ακτινοβολία laser [249].

Κατά τη διάρκεια αυτής της αρχικής φάσης εξάτμισης, πραγματοποιείται ιονισμός. Τα ιόντα που απελευθερώνονται επιταχύνονται σε αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (TOF) για ανάλυση, φιλτράρισμα και τελικά ανίχνευση των πρωτεϊνών.

- *Ιονισμός από επιφάνεια μέσω laser (Surface enhanced laser desorption/ionization, SELDI)*

Η τεχνική Surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) εισήχθη το 1993 από τους Hutchens και Yip και διατέθηκε στο εμπόριο το 1997 από την Ciphergen Biosystems [269]. Είναι παραλλαγή της τεχνικής MALDI και χρησιμοποιεί τροποποιημένο στόχο με χημική συγγένεια με τις πρωτεΐνες του δείγματος, όπως η συγγένεια σύνδεσης.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που συνδέονται με τις πρωτεϊνικές συστοιχίες, συμπεριλαμβανομένων αντισωμάτων, υποδοχέων, νουκλεϊνικών οξέων, υδατανθράκων, μορίων πρόσδεσης ή χρωματογραφικών επιφανειών (δηλαδή, κατιονικές, ανιονικές, υδρόφοβες ή υδρόφιλες).

Κατά τη διαδικασία ιονισμού ο μείγμα πρωτεΐνης τοποθετείται με μορφή κηλίδων στον τροποποιημένο στόχο. Κάποιες πρωτεΐνες δεσμεύονται, ενώ οι υπόλοιπες απομακρύνονται με πλύση. Μετά τη πλύση, η μήτρα εφαρμόζεται στην επιφάνεια και αφήνεται να κρυσταλλωθεί με το δείγμα των πεπτιδίων. Ακολουθεί ιονισμός με εφαρμογή laser και ανάλυση, με αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (TOF).

- *Ιονισμός με ψεκασμό από ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray, ESI)*

Ο ιονισμός με ψεκασμό από ηλεκτρικό πεδίο (ESI) είναι τεχνική ήπιου ιονισμού που χρησιμοποιείται στη φασματογραφία μάζας για την παραγωγή φορτισμένων ιόντων πρωτεϊνών ή πεπτιδίων [270].

Ο ηλεκτροψεκασμός περιλαμβάνει τη χρήση υψηλής τάσης για την φόρτιση διαλύτη που περιέχει την υπό ανάλυση ουσία. Αυτή, με τη σειρά της, πιέζει υγρό μέσα από ένα μικρό τριχοειδή σωλήνα ώστε να σχηματιστεί «ομίχλη αερολύματος» φορτισμένων σταγονιδίων. Ο διαλύτης εξατμίζεται, αφήνοντας πολλαπλά φορτισμένα μοριακά ιόντα να κινούνται προς τον αναλυτή μάζας για ανίχνευση. Δεδομένου ότι ο ιονισμός βασίζεται στη παρουσία υγρού, το ESI συνδέεται εύκολα με υγρή χρωματογραφία για την κλασμάτωση των πρωτεϊνών και ως εκ τούτου, ο ιονισμός ESI είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ιονισμού στις πρωτεωμικές μελέτες.

### 2.2.5 Αναλυτής μαζών (mass analyzer)

Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ιονισμένων μορίων ανάλογα με το λόγο  $m/z$ .

Η μέτρηση της μάζας των πεπτιδίων γίνεται με:

- *Αναλυτές τύπου δέσμης*

Με τους αναλυτές αυτού του τύπου τα ιόντα επιταχύνονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (time-of-flight (TOF), τα τετραπολικά φίλτρα μάζας (Quadrupole Q) και οι αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector).

- *Αναλυτές τύπου παγίδας*

Τα ιόντα παγιδεύονται σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και ανιχνεύονται μέσω της ταλάντωσής τους σε αυτό. Αναλυτές αυτού του τύπου είναι οι τετραπολικές παγίδες ιόντων (Ion Trap, IT) και οι αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier.

Οι σύγχρονοι φασματογράφοι μάζας έχουν την δυνατότητα απομόνωσης ενός πεπτιδίου, ενίσχυσης της ενέργειας μέχρι θραυσματοποίησης και στη συνέχεια καταμέτρησης των θραυσμάτων που παράγονται. Αυτή η διαδικασία που είναι γνωστή ως διαδοχική φασματογραφία μάζας ή MS/MS δίνει λεπτομερείς πληροφορίες της αλληλουχίας του πεπτιδίου [271].

*Αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (time-of-flight (TOF):* Χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης για να επιταχύνει όλα τα ιόντα με την ίδια ποσότητα αρχικής κινητικής ενέργειας. Με την επιτάχυνση, τα ιόντα εισέρχονται σε περιοχή χωρίς πεδίο όπου ταξιδεύουν με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λόγου  $m/z$  με αποτέλεσμα τα ιόντα με μικρό λόγο  $m/z$  να ταξιδεύουν πιο γρήγορα από τα ιόντα με υψηλό  $m/z$ . Ο χρόνος που απαιτείται για να διανύσουν τα ιόντα το μήκος της ζώνης χωρίς πεδίο καταγράφεται και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ταχύτητας των ιόντων και τελικά του  $m/z$  κάθε ιόντος.

- *Τετραπολικός αναλυτής φίλτρου μάζας (Quadrupole Q)*

Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους που έχουν άμεση σταθερή τάση (DC) και εναλλασσόμενη ραδιοσυχνότητα (RF) δυναμικού πεδίου [272]. Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή του οργάνου εστιάζονται και περνούν κατά μήκος της μέσης του τετραπόλου με κίνηση που εξαρτάται από το ηλεκτρικό πεδίο. Μόνο ιόντα με συγκεκριμένο λόγο  $m/z$  έχουν σταθερή τροχιά και φτάνουν μέχρι τον ανιχνευτή ενώ αυτά με ασταθείς τροχιές αποκλείονται από το φίλτρο μάζας. Αυτός ο τύπος λειτουργίας του αναλυτή μάζας αναφέρεται ως «μαζικά επιλεκτική σταθερότητα».

- *Αναλυτές μάζας παγίδας ιόντων*

Ο όρος «παγίδα ιόντων» προέρχεται από το γεγονός ότι τα πεδία εφαρμόζονται με τρόπο ώστε τα ιόντα όλων των  $m/z$  να παγιδεύονται και να ταλαντώνονται στον αναλυτή μάζας [271]. Ο αναλυτής χρησιμοποιεί ένα ηλεκτρόδιο δακτυλίου που χωρίζει δύο ημισφαιρικά ηλεκτρόδια για να παγιδεύει ιόντα σε μικρό όγκο. Η ανάλυση μάζας, επιτυγχάνεται με τη διαδοχική εφαρμογή τάσης, εξαρτώμενης από  $m/z$ , που αυξάνει το πλάτος των ταλαντώσεων και εκτοξεύει τα ιόντα υψηλού  $m/z$  έξω από την παγίδα και μέσα στον ανιχνευτή. Αυτός ο τύπος λειτουργίας αναφέρεται ως «μαζικά επιλεκτική αστάθεια».

- *Αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier*

Η μέτρηση της μάζας γίνεται με ανίχνευση της έντασης του ρεύματος που παράγεται από την κυκλοτρονοποίηση ιόντων παρουσία μαγνητικού πεδίου [273]. Η ανάλυση έχει υψηλή ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια. Στους αναλυτές τύπου Fourier τα ιόντα εγχέονται σε παγίδα στατικού ηλεκτρικού/μαγνητικού ιόντος και αποτελούν μέρος ενός κυκλώματος. Δεδομένου ότι η συχνότητα του κύκλου ενός ιόντος καθορίζεται από τον λόγο  $m/z$  της μάζας προς φόρτιση, μπορεί να αποσυμπιεστεί με Fourier μετασχηματισμό.

### 2.3 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω σύγκρισης της συγκέντρωσης μεταξύ δύο διαφορετικών δειγμάτων δίνει την δυνατότητα ταυτοποίησης βιοδεικτών και παρέχει πληροφορίες και σημαντικά στοιχεία για τον ρόλο πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου [274].

Οι κύριες τεχνολογίες καθορισμού των πρωτεϊνικών επιπέδων, είναι η τεχνική χωρίς επισήμανση (label-free), η τεχνική με επισήμανση με σταθερά ισότοπα (isotope labeling) και η στοχευμένη ποσοτικοποίηση η οποία αφορά συγκεκριμένα πεπτίδια [MRM (multiple reaction monitoring) ή η τεχνική SRM (selected reaction monitoring)].

### 2.3.1 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών χωρίς επισήμανση

Με τη μέθοδο χωρίς επισήμανση, η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τα δεδομένα της φασματογραφίας μάζας δηλαδή τον αριθμό των MS/MS φασμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε πεπτιδίο ή πρωτεΐνη μετά από κανονικοποίηση [275].

Κατά τον υπολογισμό των φασμάτων, κάθε δείγμα αναλύεται ξεχωριστά. Ακολουθεί δημιουργία του καταλόγου πρωτεϊνών που εκφράζονται σε κάθε δείγμα και σύγκριση για την ανίχνευση πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δειγμάτων.

Η μέθοδος έχει υψηλή απόδοση, εξαιρετικό γραμμικό δυναμικό εύρος, είναι οικονομική και δεν απαιτεί ειδική εκπαίδευση. Ωστόσο έχει περιορισμένη απόδοση στην ανάλυση σύνθετων βιολογικών υλικών στα οποία μικρές διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση πρωτεϊνών μικρής συγκέντρωσης μπορεί να καλύπτονται από την συγκέντρωση πρωτεϊνών σε αφθονία.

Άλλα ζητήματα που περιπλέκουν την ακριβή σύγκριση πολλαπλών δεδομένων φασματογραφίας μάζας περιλαμβάνουν τον χρόνο κατακράτησης και τον λόγο  $m/z$ , πολλαπλές εκχύσεις δειγμάτων στην ίδια στήλη HPLC αντίστροφης φάσης, και την μη ευθυγραμμισμένη σύγκριση κορυφών με αποτέλεσμα μεγάλη μεταβλητότητα στον ποσοτικό προσδιορισμό. Επίσης, ο μεγάλος όγκος δεδομένων κατά την διάρκεια της φασματογραφίας μάζας τύπου LC-MS/MS απαιτεί την αυτοματοποίηση της ανάλυσης των φασμάτων με τη χρήση αλγόριθμων για σύγκριση των δεδομένων έντασης αιχμής μεταξύ δειγμάτων LC-MS σε συνολική κλίμακα [276].

### 2.3.2 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με επισήμανση

- *Μεταβολική επισήμανση.* Σε αυτή τη μέθοδο, τα κύτταρα καλλιεργούνται *in vitro* με ισοτοπικά επισημασμένα αμινοξέα ( $^{13}\text{C}$  και  $^{15}\text{N}$ ), τα οποία ενσωματώνονται στο πρωτέωμα κατά την κυτταρική ανάπτυξη. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί με διαφορετικά επισημασμένα αμινοξέα μπορούν να συγκεντρωθούν για ανάλυση [277]. Στη κατηγορία αυτή ανήκει η μέθοδος επισήμανσης πεπτιδίων SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell Culture).

- *Επισήμανση Proteolytic  $^{18}\text{O}$ .* Το Proteolytic  $^{18}\text{O}$  ενσωματώνεται κατά την πρωτεολυτική πέψη [278]. Η διαφορική κωδικοποίηση  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  βασίζεται στην ανταλλαγή  $^{18}\text{O}$ , κατά την οποία δύο άτομα  $^{16}\text{O}$  αντικαθίστανται από δύο άτομα  $^{18}\text{O}$  με ανταλλαγή οξυγόνου. Η αντίδραση καταλύεται από ένζυμα παρουσία  $\text{H}_2$ . Η μετατόπιση μάζας κατά 2-4 Da που προκύπτει μεταξύ των διαφορετικά σημασμένων πεπτιδικών ιόντων επιτρέπει την

ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών από τις οποίες παράγονται τα πεπτίδια μετά από ενζυμική πέψη.

- *Χημική επισήμανση*: Έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις μέθοδοι χημικής επισήμανσης για ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών που επιτρέπουν τη σύγκριση σημαντικού αριθμού δειγμάτων. Πρόκειται για τις μεθόδους ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags), Tandem Mass Tag (TMT) και Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) [279],[280].

Η μέθοδος Isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) είναι η πλέον διαδεδομένη γιατί έχει τη δυνατότητα ανάλυσης έως και δέκα δειγμάτων σε ένα μόνο πείραμα. Σε αυτή τη μέθοδο οι αμινομάδες πεπτιδίων, επισημαίνονται με διαφορετικά αντιδραστήρια ισοβαρικής μάζας (ετικέτες) έτσι ώστε όλα τα πεπτίδια να είναι ισοβαρικά και να μην διακρίνονται [281]. Οι διαφορετικές ετικέτες μάζας μπορούν να ανιχνευτούν μόνο μετά από κατακερματισμό των πεπτιδίων. Καθώς κάθε ετικέτα προσθέτει ίδια μάζα σε ένα δεδομένο πεπτίδιο, κάθε πεπτίδιο παράγει μόνο μία κορυφή κατά τη διάρκεια χρωματογραφίας και επομένως απομονώνεται μόνο ένα  $m/z$ . Οι διαφορετικές ετικέτες μάζας διαχωρίζονται μόνο όταν δημιουργούνται ιόντα αναφοράς. Ο λόγος έντασης των διαφορετικών ιόντων αναφοράς χρησιμοποιείται ως ποσοτική ένδειξη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι είναι διαθέσιμο μόνο ένα φάσμα για ανάλυση με αποτέλεσμα μικρότερη συνολική ευαισθησία. Άλλο μειονέκτημα της τεχνικής είναι το μεγάλο κόστος των αντιδραστηρίων και η ανάγκη χρησιμοποίησης τυπικών πρωτοκόλλων λειτουργίας (SOPs) για την επίτευξη επαναλήψιμων και αξιόπιστων αποτελεσμάτων και επομένως για την άμβλυνση της πιθανής μεταβλητότητας ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας των δειγμάτων σε πολλαπλά στάδια.

### 2.3.3 Στοχευμένη ποσοτικοποίηση

Για την ποσοτικοποίηση επιλεγμένων πρωτεϊνών μπορούν να στοχευθούν τα πεπτίδια τους με τεχνικές όπως η τεχνική multiple reaction monitoring (MRM) ή η τεχνική selected reaction monitoring (SRM) [282]. Με τις τεχνικές αυτές μελετώνται συγκεκριμένα πεπτίδια από ένα πολύπλοκο μείγμα και σε αυτά εστιάζει η συνολική αναλυτική ικανότητα του οργάνου. Η ανίχνευση και θραυσματοποίηση μόνο των πεπτιδίων που προέρχονται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Οι στοχευμένες τεχνικές ωστόσο απαιτούν συγκεκριμένο φασματογράφο όπως είναι ο τετραπολικός αναλυτής φίλτρου μάζας.

## 2.4. Χρησιμοποίηση της πρωτεωμικής για την ανίχνευση βιοδεικτών

Στην μεταγενωμική εποχή, η τεχνολογία της πρωτεωμικής χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη κυττάρων, ιστών και βιολογικών υγρών με σκοπό την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με συγκεκριμένη νόσο και την ανίχνευση βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση, πρόβλεψη, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Θεωρητικά, οποιαδήποτε πρωτεϊνική τροποποίηση που είναι στενά συνδεδεμένη με μια νόσο είναι πιθανός «βιοδείκτης». Οι βιοδείκτες πρέπει να είναι ειδικοί για τη συγκεκριμένη νόσο ή το όργανο που πάσχει και να έχουν την δυνατότητα εκτίμησης της σοβαρότητας ή την ανταπόκριση στην θεραπευτική αγωγή [283]. Επιπλέον πρέπει να ανιχνεύονται σε ικανοποιητική συγκέντρωση στο υπό μελέτη δείγμα, να παραμένουν σταθεροί μετά από μακρόχρονη αποθήκευση και να μπορούν να απομονωθούν εύκολα και με μικρό κόστος.

Η ταυτοποίηση συνεπώς των πρωτεϊνών που σχετίζονται με μια παθολογική κατάσταση, η κατανόηση της δομής και λειτουργίας κάθε πρωτεΐνης και η αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών αποτελούν σημαντικά βήματα για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων και αποτελεσματικών θεραπειών. Επιπλέον ανοίγουν το δρόμο για τη παραγωγή νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων, για την κατάληψη των ενεργών κέντρων πρωτεϊνικών μορίων, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αδρανοποίησή τους.

Την τελευταία εικοσαετία η πρωτεωμική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βιοδεικτών που σχετίζονται με τη διάγνωση και πρόβλεψη καρδιαγγειακών νοσημάτων την πρώιμη ανίχνευση διαφόρων τύπων καρκίνων καθώς και την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Οι πρωτεΐνες IL-6 και 8, Fibrinogen και οι τροπονίνες, έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση τεχνολογιών πρωτεωμικής ως υποψήφιοι βιοδείκτες και χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση καρδιαγγειακών νοσημάτων [284]. Καθοριστική επίσης υπήρξε η συμβολή της πρωτεωμικής στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών galectin-3, growth differentiation factor 15, mid-regional pro-adrenomedullin καθώς και των καρδιοπροστατευτικών ορμονών N-terminal pro-B-type NP (NT-proBNP) ως βιοδείκτες διάγνωσης και θεραπευτικής αντιμετώπισης ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [285],[286],287]. Μελέτες σιέλου ασθενών με διαφόρων τύπων καρκίνους της στοματικής κοιλότητας οδήγησαν στη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών fibronectin (FINC), Complement factor H(CFAH) και C-reactive protein(CRP) ως βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης [288]. Όσον αφορά τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, ανάλυση με μεθόδους πρωτεωμικής του εκκρινώματος εγκεφαλικών κυττάρων έδειξαν ότι η υπερέκφραση της β-secretase ενεργοποιεί την παραγωγή β-amyloid precursor protein (APP) που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των

πλακών αμυλοειδούς στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε ασθενείς με νόσο Alzheimer's [289]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι φαρμακευτικό σκεύασμα που στοχεύει την κατάληψη του ενεργού κέντρου της β-secretase μπορεί να ελαττώσει την παραγωγή APP και να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου, ανοίγοντας με αυτό τον τρόπο νέους ορίζοντες θεραπευτικής αντιμετώπισης [290].

#### **2.4.1 Βιοδείκτες και κύηση**

Κατά τη διάρκεια της κύησης, οι φυσιολογικές λειτουργίες στη μητέρα υφίστανται σημαντικές αλλαγές προκειμένου να προσαρμοστούν στο ταχέως αναπτυσσόμενο έμβρυο. Μετά την σύλληψη, όλα τα επόμενα στάδια, όπως η επιτυχής εμφύτευση, η πλακουντοποίηση, η εξέλιξη της εγκυμοσύνης και τελικά ο τοκετός είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων παραγόντων που περιλαμβάνουν ορμόνες, μόρια προσκόλλησης, αυξητικούς παράγοντες, και ανοσοτροποποιητές [249]. Οποιαδήποτε διαταραχή της ισορροπίας αυτών των βιολογικών παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιπλοκών που σχετίζονται με την κύηση, όπως η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (IUGR), η προεκλαμψία (PE), ο πρόωρος τοκετός (PTL) και η ενδοαμνιακή λοίμωξη [291].

Ερευνητικές προσπάθειες δεκαετιών έχουν συμβάλει σημαντικά στην σαφέστερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της κύησης ωστόσο υπάρχει ακόμα απόσταση που πρέπει να καλυφθεί πριν να κατανοηθούν πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για τις επιπλοκές της κύησης. Επιπλέον, οι διαθέσιμες διαγνωστικές δοκιμασίες, όσον αφορά την ακριβή πρόβλεψη των επιπλοκών, πριν από την κλινική τους εκδήλωση κρίνονται ανεπαρκείς.

Από αυτή την άποψη, η βασιζόμενη στη φασματογραφία μάζας τεχνολογία της πρωτεωμικής έχει δώσει μια νέα διάσταση στον τομέα της εμβρυομητρικής ιατρικής καθώς επιτρέπει την ευρείας κλίμακας διερεύνηση πρωτεϊνών σε πολύπλοκα βιολογικά υγρά και ιστούς που σχετίζονται με την κύηση και τον τοκετό

#### **2.5.2 Χρησιμοποίηση της πρωτεωμικής για την μελέτη επιπλοκών της κύησης**

Η πρωτεωμική έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση βιοδεικτών που σχετίζονται με την παθολογία της κύησης, μέσω της ανάλυσης της συνολικής έκφρασης των πρωτεϊνών σε ιστούς και υγρά που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη όπως είναι το υλικό βιοψίας πλακούντα, το αμνιακό υγρό, οι κοιλιοτραχηλικές εκκρίσεις, τα ούρα και το περιφερικό αίμα εγκύου με έμφαση στην προεκλαμψια. Σήμερα, είναι στη διάθεση μας μεγάλοι



κατάλογοι «βιοδεικτών» που έχουν την δυνατότητα να διευκολύνουν την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των επιπλοκών.

Η πρώτη μελέτη αμνιακού υγρού από κυήσεις με προεκλαμψία με τη χρήση τεχνικών πρωτεωμικής πραγματοποιήθηκε από τους Vascotto και συν. και αποκάλυψε ότι η αύξηση της οξειδωμένης μορφής της πρωτεΐνης Transthyretin αποτελεί πρώιμο δείκτη εκδήλωσης της επιπλοκής [292]. Ένα χρόνο αργότερα οι Park και συν. δημοσίευσαν, μετά από ανάλυση του αμνιακού υγρού με 2-DE και φασματογραφία μάζας, δύο ακόμη υποψήφιους βιοδείκτες για τη διάγνωση της προεκλαμψίας, την aroliporproteín A-I και την SSBB412 με διαφοροποιημένη έκφραση σε περιπτώσεις προεκλαμψίας [293].

Οι Buhimschi και συν. σύγκριναν δείγματα ούρων από κυήσεις με προεκλαμψία και κυήσεις χωρίς επιπλοκή και ταυτοποίησαν την αλβουμίνη και ένα κλάσμα της SERPINA-1, ως υποψήφιους βιοδείκτες για την πρώιμη ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για προεκλαμψία, έως και 10 ημέρες πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων [294].

Οι Blankley και συν., με τη μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών με αντιδραστήρια iTRAQ μπόρεσαν να αναγνωρίσουν στο πλάσμα εγκύων το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, 113 υποψήφιους βιοδείκτες για την προεκλαμψία [295]. Σε μια άλλη μελέτη, οι Anand και συν. ανέλυσαν επίσης δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων ( $n = 48$ ), το δεύτερο τρίμηνο με LC-MS/MS [296]. Σύγκριση των δεδομένων που λήφθηκαν από εγκύους που αργότερα ανέπτυξαν προεκλαμψία με αυτά της ομάδας ελέγχου αποκάλυψε περισσότερους από 60 υποψήφιους βιοδείκτες οι οποίοι, μετά από ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, είχαν την δυνατότητα να εντοπίζουν εγκύους υψηλού κινδύνου με ευαισθησία και ειδικότητα >90%.

Οι Kim και συν., πραγματοποίησαν ευρείας κλίμακας ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων πλάσματος εγκύων στις αρχές του δεύτερου τριμήνου και ταυτοποίησαν αρκετές διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες σε εγκύους που εμφάνισαν προεκλαμψία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, μεταξύ των οποίων ο παράγοντας C1s του συμπληρώματος και η alpha-1-microglobulin (AMBIP) [297].

Η πρώτη μελέτη που ανέλυσε δείγματα πλάσματος εγκύου πρώτου τριμήνου, πολύ πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων της επιπλοκής, προκειμένου να ταυτοποιηθούν προβλεπτικοί βιοδείκτες για την προεκλαμψία έγινε από τους Kolla και συν., με σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με αντιδραστήρια iTRAQ σε συνδυασμό με φασματογραφία μάζας τύπου MALDI-TOF MS/MS. [298]. Η μελέτη αποκάλυψε δέκα πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στη προεκλαμψία, συμπεριλαμβανομένων των clusterin,

fibrinogen, fibronectin, angiotensinogen, immunomodulatory molecule και της galectin 3-binding protein.

Οι Kolialexι και συν., μελέτησαν επίσης δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που αργότερα εμφάνισαν προεκλαμψία, και ταυτοποίησαν δώδεκα υποψήφιους βιοδείκτες [299]. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Alpha-1-antitrypsin (A1AT), CD5 antigen-like molecule (CD5L) Keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9), Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA), Transferrin (TRFE) and Vitamin D-binding protein (VTDB) παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση στο περιφερικό αίμα εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της επιπλοκής ενώ οι Alpha-2-HS-glycoprotein (FETUA), Beta-2-glycoprotein 1 (APOH), Complement factor B (CFAB), Haptoglobin (HPT), Vitronectin (VTNC) and Zinc-alpha-2-glycoprotein (ZA2G) παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των μελετών που προαναφέρθηκαν δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς ομοιότητες όσον αφορά τους υποψήφιους βιοδείκτες που ταυτοποιήθηκαν, πιθανώς λόγω διαφορών στην ηλικία κύησης κατά την οποία έγινε η συλλογή των δειγμάτων για ανάλυση, του υποτύπου της επιπλοκής (π.χ. πρώιμης ή όψιμης έναρξης) αλλά και διαφορών στην μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση.

Όσον αφορά τον Σακχαρώδη Διαβήτη της κύησης, μελέτες πρωτεωμικής ανάλυσης ούρων ή/και πλάσματος εγκύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης αποκάλυψαν τις πρωτεΐνες fibrinogen, adiponectin, sex hormone-binding globulin, visfatin, καθώς και τις Prenylcysteine oxidase 1 (PCYOX1), beta-ala-his dipeptidase (CNDP1), extracellular matrix protein 1 (ECM1), basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (HSPG2), thrombospondin-4 (TSP-4) ως υποψήφιους βιοδείκτες [300],[301]. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να επιβεβαιωθούν αυτά τα πρωτεωμικά ευρήματα

#### **2.4.3 Πρωτεωμική και πρόωρος τοκετός**

Ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ιστούς και βιολογικά υγρά που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση σημαντικού αριθμού πρωτεϊνικών μορίων με διαφοροποιημένη έκφραση σε κυήσεις με πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν υποψήφιους διαγνωστικούς ή και προβλεπτικούς βιοδείκτες για την επιπλοκή.

Πρώτοι, οι Gravett και συν., χρησιμοποίησαν την τεχνική SELDI-TOF για τη μελέτη δειγμάτων αμνιακού υγρού από εγκύους με συμπτώματα πρόωρου τοκετού και υποκλινική ενδομήτρια φλεγμονή και διαπίστωσαν διαφορές στην ένταση δύο κορυφών του φάσματος [302]. Περαιτέρω ανάλυση των κορυφών με LC-MS/MS έδειξε ότι αντιστοιχούν

στην calgranulin B και σε ένα πρωτεολυτικό θραύσμα της insulin growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) που προτάθηκαν ως υποψήφιοι βιοδείκτες για την ενδοαμνιακή φλεγμονή. Η σχέση της IGFBP-1 με τον αυτόματο πρόωρο τοκετό επιβεβαιώθηκε αργότερα από τους Bujold και συν., με συνδυασμό τεχνικών πρωτεομικής που περιλαμβάνουν υγρή χρωματογραφία, φασματογραφία μάζας και ανοσοπροσδιορισμούς [303].

Οι Ruetschi και συν. χρησιμοποίησαν παρόμοια τεχνική για την ανάλυση δειγμάτων αμνιακού και κοιλποτραχηλικού υγρού από εγκύους με συμπτώματα πρόωρου τοκετού με ή χωρίς ενδομήτρια φλεγμονή [304]. Η μελέτη οδήγησε στον εντοπισμό 27 πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση με σημαντικά αυξημένη έκφραση σε συμπτωματικές εγκύους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Με στοχευμένο έλεγχο, με Western Blot και ELISA, σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων, οι ερευνητές επιβεβαίωσαν ότι η υπερέκφραση των πρωτεϊνών human neutrophil protein 1-3, calgranulin A και calgranulin B υποδηλώνει ενδομήτρια φλεγμονή και διευκολύνει τη διαφορική διάγνωση μεταξύ πρόωρου τοκετού και PPROM. Τα ευρήματα αυτά επαληθεύτηκαν και από άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με συνδυασμό ηλεκτροφόρησης 2-D και φασματογραφίας μάζας και έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες neutrophil protein1-3, calgranulin A και B μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες έγκαιρης διάγνωσης ενδομήτριων λοιμώξεων [305].

Οι Hitti και συν., προκειμένου να ταυτοποιήσουν βιοδείκτες που σχετίζονται με ενδομήτρια λοίμωξη μελέτησαν με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μάζας δείγματα αμνιακού υγρού από 30 εγκύους με πρόωρο τοκετό. Η μελέτη έδειξε υπερέκφραση 15 πρωτεϊνών σε εγκύους με πρόωρο τοκετό και ενδομήτρια λοίμωξη. Κατά την ανάλυση γονιδιακής οντολογίας, οι πρωτεΐνες αυτές ταξινομήθηκαν στις βιολογικές διεργασίες «ανοσορυθμιστές» και «πρωτεΐνες οξείας φάσης» [306].

Οι Buhimschi και συν., μετά από εντατικές ερευνητικές προσπάθειες πολλών ετών στον τομέα του πρόωρου τοκετού και της νεογνικής σήψης, διαπίστωσαν ότι η έκφραση, στις κοιλποτραχηλικές εκκρίσεις, τεσσάρων πρωτεϊνών ειδικών για τη φλεγμονή, των defensin-1 και -2, calgranulin-A, και calgranulin-C μπορεί γρήγορα και με ακρίβεια να διαγνώσει ενδομήτριες λοιμώξεις και να προβλέψει τον κίνδυνο για πρόωρο τοκετό [307],[308],[309],[310]. Σε κλινικό επίπεδο, οι τέσσερις αυτοί βιοδείκτες που αποτελούν το «MR Score» έχουν την δυνατότητα να εντοπίζουν εγκύους υψηλού κινδύνου που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από ενδομήτριες παρεμβάσεις. Βαθμολογία MR 3-4 έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, μέσα στις επόμενες ημέρες, ενώ η απουσία τους αποκλείει την πιθανότητα για πρόωρο τοκετό. Επισημαίνεται ότι αυξημένο MR score έχει διαπιστωθεί και σε νεογνά που γεννήθηκαν από κυήσεις με ύποπτη ή

επιβεβαιωμένη σήψη [311]. Υπερέκφραση των Calgranulin-A και Calgranulin -B διαπιστώθηκε και στο αμνιακό υγρό εγκύων με λοίμωξη από *Ureaplasma urealyticum* σε σχέση με αυτές χωρίς τη λοίμωξη [312].

Οι Pereira και συν., συνέκριναν το πρωτέωμα του κολποτραχηλικού υγρού ασυμπτωματικών εγκύων με αυτό εγκύων με πρόωρο τοκετό και ταυτοποίησαν ένα σημαντικό αριθμό πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση, υπερέκφραση ή υποέκφραση, σε εγκύους με πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [313]. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στον μηχανισμό της πήξης, την ανάπτυξη του πλακούντα, και την φλεγμονώδη αντίδραση.

Σε μια άλλη μελέτη οι Butt και συν., μελέτησαν υλικό βιοψίας πλακούντα από εγκύους με πρόωρο τοκετό με 2-DE ακολουθούμενη από LC MS-MS [314]. Η ανάλυση αποκάλυψε έντεκα πρωτεΐνες που εκφράζονται αποκλειστικά σε πλακούντες εγκύων με την επιπλοκή, με 100% επαναληψιμότητα. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας έδειξε ότι οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού με αντιπηκτικές ιδιότητες και σχετίζονται με ενζυμικές λειτουργίες

Οι Vuadens και συν., ταυτοποίησαν στο αμνιακό υγρό εγκύων, την 17η εβδομάδα κύησης, που στη συνέχεια εμφάνισαν πρόωρο τοκετό και PPROM, δύο πεπτιδία που αντιστοιχούν στο COOH-τελικό θραύσμα της agrin και της perlecan τα οποία απουσιάζουν από δείγματα εγκύων γυναικών χωρίς την επιπλοκή [315]. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από τους Thadikaran και συν. [316].

Οι Romero και συν., εφάρμοσαν, την τεχνική LC-MS σε συνδυασμό με επισήμανση των πεπτιδίων με αντιδραστήρια iTRAQ για την μελέτη αμνιακού υγρού εγκύων με πρόωρο τοκετό και άθικτες μεμβράνες και εντόπισαν τις πρωτεΐνες mimecan precursor, latent-transforming growth factor beta-binding protein isoform 1L precursor και Resistin ως υποψήφιους βιοδείκτες για την διάγνωση εγκύων με πρόωρο τοκετό [316]. Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε και το μεταβολωμικό προφίλ αμνιακού υγρού και έδειξε ότι και η ανάλυση των μεταβολιτών έχει την δυνατότητα να εντοπίσει εγκύους με αυξημένο κίνδυνο για αυτόματο πρόωρο τοκετό, με ακρίβεια 96,3%, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ενδομήτριας λοίμωξης [317]. Ωστόσο για να ενταχθούν οι πρωτεωμικοί ή οι μεταβολωμικοί βιοδείκτες που αποκαλύφθηκαν σε κλινικό επίπεδο, για τον προσυμπτωματικό έλεγχο εγκύων υψηλού κινδύνου για πρόωρο τοκετό, θα πρέπει να ανιχνεύονται σε βιολογικά υγρά που λαμβάνονται μη επεμβατικό τρόπο, όπως είναι τα ούρα και το περιφερικό αίμα της εγκύου

Οι Gunko και συν., ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων την 17<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης που αργότερα γέννησαν πρόωρα για τη ταυτοποίηση βιοδεικτών πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για πρόωρο τοκετό. Στη μελέτη διαπιστώθηκε διαφοροποιημένη έκφραση 25 πρωτεϊνών στις εγκύους με την επιπλοκή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [318]. Η ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων που γέννησαν πρόωρα, έδειξε ότι πρόκειται για πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και εμπλέκονται στην αγγειογένεση, την πρωτεϊνοσύνθεση και την φλεγμονή. Παρά το ότι τα ευρήματα αυτά δεν έχουν επιβεβαιωθεί σε ευρείας κλίμακας μελέτες αποδεικνύουν ότι οι αλλαγές που σχετίζονται με τον πρόωρο τοκετό είναι εμφανείς στο περιφερικό αίμα της εγκύου νωρίς κατά τη διάρκεια της κύησης, πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων της επιπλοκής, θέτοντας τη βάση για την ανάπτυξη μεθόδου μη επεμβατικής πρώιμης ανίχνευσης εγκύων υψηλού κινδύνου για πρόωρο τοκετό.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΣΚΟΠΟΣ**

### 3.1 Σκοπός

Σκοπός της μελέτης είναι η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πρώιμη πρόβλεψη και τον παθογενετικό μηχανισμό του πρόωρου τοκετού με ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης στο περιφερικό αίμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση δειγμάτων από εγκύους με αυτόματο πρόωρο τοκετό μεταξύ 32<sup>0/7</sup> και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδων που αφορούν ποσοστό 60-80% των πρόωρων γεννήσεων και συνεπώς ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό περιγεννητικής και νεογνικής νοσηρότητας [319].

Η μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με μεθόδους πρωτεωμικής, με υγρή χρωματογραφία, διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) και επισήμανση των πρωτεϊνών με αντιδραστήρια iTRAQ. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ εγκύων που εμφάνισαν την επιπλοκή και εγκύων με τελειόμηνη κύηση με προγράμματα βιοπληροφορικής, για την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) (βιολογική διαδικασία, μοριακή λειτουργία και κυτταρική σύσταση) και την ταυτοποίηση των σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν.

Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, η διαφοροποιημένη έκφραση των πλέον σημαντικών πρωτεϊνών στο περιφερικό αίμα εγκύων με πρόωρο τοκετό επιβεβαιώθηκε με την μέθοδο ELISA η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας για την ανίχνευση μεμονωμένων πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να:

- εμπλουτίσουν την υπάρχουσα γνώση με δεδομένα που αφορούν την πρωτεϊνική έκφραση στο περιφερικό αίμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, με αυτόματο πρόωρο τοκετό.
- συμβάλλουν στη δημιουργία νέων προβλεπτικών δοκιμασιών για την πρώιμη, αξιόπιστη και μη επεμβατική ανίχνευση εγκύων υψηλού κινδύνου.
- αποσαφηνίσουν το παθογενετικό μηχανισμό που σχετίζεται στην εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού.
- οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπειών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**



#### 4.1 Συλλογή Βιολογικού υλικού

Πρόκειται για αναδρομική μελέτη ασθενών-μαρτύρων (case-control) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους στην 11<sup>η</sup> - 13<sup>η</sup> (12.1 ± 0.6) εβδομάδα της κύησης, που προσήλθαν κατά το χρονικό διάστημα 2018-2020 στην Μονάδα Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο (screening) πρώτου τριμήνου, για την ανίχνευση εγκύων υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Το screening περιλαμβάνει:

1. Λήψη και καταγραφή των προσωπικών στοιχείων της εγκύου (Όνοματεπώνυμο, ηλικία, επάγγελμα, διεύθυνση, τηλέφωνο) σε Η/Υ μέσω του λογισμικού ταξινόμησης και αξιολόγησης Astraia Software (GMBH)
2. Καταγραφή του βάρους και ύψους - προσδιορισμό του δείκτη μάζας σώματος (BMI).
3. Χρήση καπνού - αλκοόλ
4. Λήψη και καταγραφή του ατομικού ιστορικού (Λήψη φαρμάκων, χρόνια νοσήματα, τόκος, ιστορικό αυτόματων ή τεχνητών εκτρώσεων, ιστορικό επεμβάσεων στη μήτρα ή τον τράχηλο, ιστορικό πρόωρου τοκετού – ηλικία κύησης σε αυτόν).
5. Προσδιορισμό της ηλικίας κύησης με βάση την πρώτη ημέρα της τελευταίας εμμηνόου ρύσεως και επιβεβαίωση της ηλικίας κύησης υπερηχογραφικά, με μέτρηση του κεφαλουριαίου μήκους του εμβρύου. Σε περίπτωση απόκλισης μεγαλύτερης από 7 ημέρες, μεταξύ κεφαλουριαίου μήκους και τελευταίας περιόδου, η ηλικία κύησης υπολογίστηκε με βάση το κεφαλουριαίο μήκος του εμβρύου.
6. Υπερηχογραφικό έλεγχο: μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας (NT), έλεγχο για τη παρουσία ρινικού οστού και προσδιορισμό της αντίστασης ροής του αίματος στα μητριαία αγγεία (δείκτης παλμικότητας- UtA-PI) με υπερηχογραφία Doppler.
7. Αιμοληψία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοχημικών δεικτών (PAPP-A, β-hCG και PIGF).

Από κάθε γυναίκα συλλέγονται μετά από φλεβοκέντηση 5ml περιφερικό αίμα σε σωληνάρια με αντιπηκτικό Potassium EDTA (Becton Dickinson UK Ltd, Oxfordshire, United Kingdom). Το αίμα φυγοκεντρείται, δύο φορές στις 3500 rpm για 10min στους 4° C, για την απομόνωση του πλάσματος. Η φυγοκέντρηση γίνεται σε διάστημα έως δυο ωρών από τη

φλεβοκέντηση με στόχο την μείωση του χρόνου δράσης των πρωτεασών που προκαλούν διάσπαση των πρωτεϊνών. Το πλάσμα χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (PAPP-A και  $\beta$ -hCG) με βιοχημικές μεθόδους ενώ το πλεονάζον διαμοιράζεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf RNA/DNA enzyme-free frozen χωρητικότητας 250 $\mu$ l (Thermo F, Foster City, CA, USA) και αποθηκεύεται στους -80°C.

Μετά τον τοκετό, τα στοιχεία που αφορούν στην έκβαση της κύησης και την εμφάνιση ή όχι επιπλοκών συλλέγονται είτε από το ηλεκτρονικό αρχείο της Κλινικής είτε μετά τηλεφωνική επικοινωνία με τις γυναίκες και καταχωρούνται σε Η/Υ μέσω του λογισμικού ταξινόμησης και αξιολόγησης Astraia Software (GMBH)

Η πραγματοποίηση της μελέτης, η οποία είναι σύμφωνη με την τελευταία αναθεώρηση της Διακήρυξης του Helsinki, έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΠΓΝ «Αλεξάνδρα» (Α.Π. 9/4-1-2018)αρ. ΕΒΔ 474/30-10-14. Πριν τη λήψη του βιολογικού υλικού έγινε ενημέρωση των γυναικών για το σκοπό της μελέτης (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1). Όλες οι γυναίκες που συμμετέχουν στη μελέτη έδωσαν εγγράφως την συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους σε αυτήν (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2).

#### **4.2 Επιλογή δειγμάτων για ανάλυση**

Κατά την περίοδο της μελέτης, συλλέχθηκαν συνολικά 1809 δείγματα πλάσματος εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Μετά τον τοκετό, και αφού έγινε γνωστή η έκβαση της κύησης, έγινε η επιλογή των δειγμάτων για ανάλυση, με ανασκόπηση των φακέλων των γυναικών που τηρούνται στη βάση δεδομένων Astraia. Επιλέχθηκαν για ανάλυση, με μεθόδους πρωτεωμικής, δείγματα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό, μεταξύ 32<sup>0/7</sup> και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδων κύησης (ομάδα αυτόματου πρόωρου τοκετού) και ισάριθμα δείγματα από εγκύους αντίστοιχης ηλικίας, σωματικής διάπλασης (BMI) και διάρκειας αποθήκευσης στους -80°, που γέννησαν, τελειόμηνα νεογνά (μετά την συμπλήρωση της 37ης εβδομάδας της κύησης) (ομάδα ελέγχου).

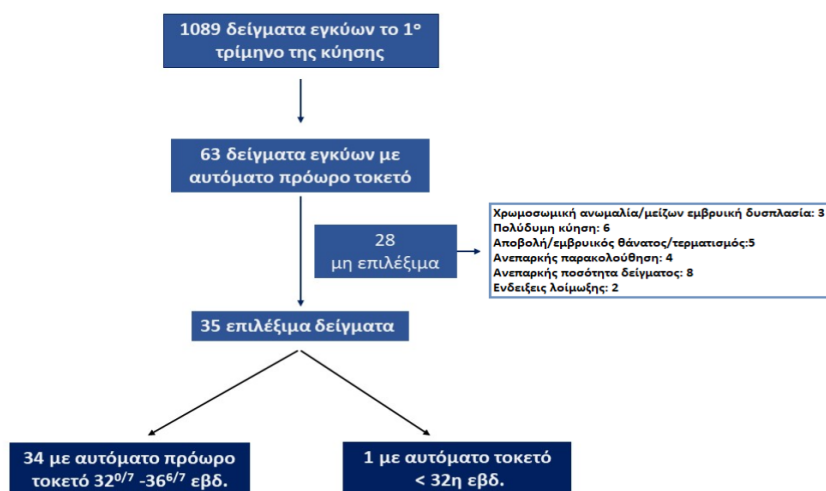
Από την μελέτη αποκλείστηκαν έγκυες με PPROM, περίδεση τραχήλου λόγω ανεπάρκειας, χορήγηση κολπικής προγεστερόνης, προδρομικό πλακούντα, γνωστές συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας, ιστορικό προεκλαμψίας, ιστορικό κωνοειδούς εκτομής τραχήλου και έμβρυα με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. Αποκλείστηκαν επίσης έγκυες με πολύδυμες κύσεις, όσες κυοφορούσαν έμβρυο με σοβαρή συγγενή ανωμαλία ή γενετικό νόσημα καθώς και αυτές που έκαναν χρήση φαρμακευτικής αγωγής.

Μέσω αναζήτηση στη βάση δεδομένων Astraia εντοπίστηκαν 63 έγκυες που περάτωσαν την κύηση με με πρόωρο τοκετό. Από αυτές, 28 αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω εμβρυϊκής χρωμοσωμικής ανωμαλίας/μείζονος εμβρυϊκής δυσπλασίας (n=3), παρουσίας πολύδυμης κύησης (n=6), αποβολής ή εμβρυϊκού θανάτου πριν την 24<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης ή τερματισμού (n=5), ανεπαρκούς παρακολούθησης (n=4) ή επειδή δεν ήταν διαθέσιμη επαρκής ποσότητα πλάσματος για ανάλυση (n=8). Δύο ακόμη έγκυες αποκλείστηκαν από τη μελέτη επειδή κατά την εισαγωγή εμφάνισαν κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία λοίμωξης. Η διαδικασία επιλογής δειγμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 1.

Μετά από ενδελεχή ανασκόπηση των φακέλων των εγκύων εντοπίστηκαν μεταξύ των 63 δειγμάτων 35 επιλέξιμα για ανάλυση, 34 από εγκύους που γέννησαν στη συνέχεια με αυτόματο πρόωρο τοκετό, μεταξύ 32<sup>0/7</sup> και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδων κύησης, και ένα με πρώιμο αυτόματο τοκετό πριν από την 32<sup>η</sup> εβδομάδα. Αυτό το τελευταίο δείγμα αποκλείστηκε για να εξασφαλιστεί ομοιογένεια μεταξύ των δειγμάτων.

Επιλέχθηκαν επίσης για ανάλυση με μεθόδους Πρωτεωμικής 34 δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων, αντίστοιχης ηλικίας, αντίστοιχου BMI και χρόνου αποθήκευσης στους -80°, που γέννησαν τελειόμηνα νεογνά (μετά την συμπλήρωση της 37<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης. Τα δείγματα αυτά αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Κατά τη περώτη φάση της μελέτης, την διερευνητική, επιλέχθηκαν τυχαία και αναλύθηκαν με LC-MS/MS συζευγμένο με iTRAQ, δείγματα από πέντε γυναίκες της ομάδας με αυτόματο πρόωρο τοκετό και τα αντίστοιχα δείγματα της ομάδας ελέγχου για την ανίχνευση πρωτεϊνών με σημαντικά διαφοροποιημένο επίπεδο έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων.



**Εικόνα 1.** Διαδικασία επιλογής δειγμάτων για ανάλυση

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης, της φάσης της επιβεβαίωσης, επικυρώθηκε η διαφορετική έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν κατά την διερευνητική φάση με στοχευμένη ποσοτικοποίηση, με ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) Για τη επιβεβαίωση χρησιμοποιήθηκαν 58 δείγματα περιφερικού αίματος, 29 από εγκύους με αυτόματο πρόωρο τοκετό μεταξύ 32<sup>0/7</sup> και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδων κύησης και 29 από εγκύους με τελειόμηνη κύηση (ομάδα ελέγχου).

### **4.3 Διασφάλιση προσωπικών δεδομένων**

Η πραγματοποίηση της μελέτης, η οποία είναι σύμφωνη με την τελευταία αναθεώρηση της Διακήρυξης του Helsinki, έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΠΓΝ «Αλεξάνδρα» αρ. ΕΒΔ 474/30-10-14. Πριν τη λήψη του βιολογικού υλικού έγινε λεπτομερής ενημέρωση των γυναικών για το σκοπό της μελέτης, και λήψη έγγραφης συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους σε αυτήν.

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

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

## **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

## 5. Μεθοδολογία

Η προτύπωση των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη έγινε με δείγματα πλάσματος εγκύων σε προηγούμενη φάση [301]. Αναλυτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν:

### 5.1 Απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλής συγκέντρωσης

Προκειμένου να εξασφαλιστεί μέγιστη ακρίβεια των μετρήσεων έγινε απομάκρυνση από το πλάσμα των πρωτεϊνών υψηλής συγκέντρωσης [αλβουμίνη (HSA) και ανοσοσφαιρίνες (IgG)] η παρουσία των οποίων μπορεί να περιπλέξει την ανάλυση και να εμποδίσει την μελέτη των πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης [320].

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλής συγκέντρωσης έγινε με χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit με στήλες, με ακινητοποιημένα ειδικά αντισώματα anti-HSA και anti-IgG, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [Pierce™ Top 2 Abundant Protein Depletion Spin Columns (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA)].

Ακολούθησε δεύτερη έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη με διαφορετικό διάλυμα (2xPBS) [321].

### 5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στα υπό μελέτη δείγματα έγινε με τη μέθοδο Bradford [322]. Πρόκειται για φασματοσκοπική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών που βασίζεται στην μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, σε μήκος κύματος 595nm, μετά από δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, κυρίως από τα βασικά αμινοξέα. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας των πρωτεϊνών. Για τη ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, 1ml αντιδραστηρίου Bradford προστίθεται σε 10μl αραιωμένου πλάσματος (1:10). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min και μέτρηση της απορρόφησης σε φωτόμετρο (SmartSpec Plus, Bio-Rad, Italy). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται με χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA-Bio Rad, Italy).

### 5.3 Προετοιμασία των δειγμάτων- Ενζυμική πέψη

Η προετοιμασία των δειγμάτων έχει στόχο την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων από το πρωτεϊνικό δείγμα, που είτε εμποδίζουν την πρωτεολυτική πέψη ή παρεμβάλλονται στην ανάλυση με φασματογραφία μάζας.

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει

- Αναγωγή των πρωτεϊνών με προσθήκη 50 mM Tris-2-carboxymethyl phosphine (TCEP) σε 40 μg πλάσματος υπό ανάδευση και επώαση στους 56°C για 1 h, χρόνος που απαιτείται για την πλήρη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων.
- Αλκυλίωση των πρωτεϊνών με προσθήκη 20 mM iodoacetamide σε σκοτεινό θάλαμο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.

Η ενζυμική πέψη πραγματοποιείται με τη χρήση υδρολυτικών ενζύμων, των πρωτεασών, που δρουν στους αμιδικούς δεσμούς σε συγκεκριμένες θέσεις. Στις περιπτώσεις που πρόκειται να αναλυθούν πρωτεΐνες επιλέγεται το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη γιατί δίνει ομοιογενή πεπτίδια μεγέθους 800-2000, κατάλληλα για περεταίρω ταυτοποίηση με φασματογραφία μάζας

Στη παρούσα μελέτη η ενζυμική πέψη πραγματοποιήθηκε με θρυψίνη (Promega, Madison, WI, USA) σε τελική αναλογία ενζύμου / πρωτεΐνης, 1:50 στους 37°C για 16-18 h. Η πέψη διακόπτεται με την προσθήκη φορμικού οξέος σε τελική συγκέντρωση 0.1%. Ακολουθεί αφαλάτωση με Zip-tips (Thermo Fisher Scientific, USA), αποξήρανση των πεπτιδίων με φυγοκέντρηση υπό κενό και αναδιάλυση σε 0.1% φορμικό οξύ.

### 5.4 Σήμανση των πεπτιδίων με ισοβαρείς ιχνηθέτες (iTRAQ)

Η σήμανση των θρυψινοποιημένων πεπτιδίων με ισοβαρείς ιχνηθέτες (iTRAQ) αποτελεί την πλέον δημοφιλή μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών ενός δείγματος με φασματογραφία μάζας γιατί επιτρέπει τη ταυτόχρονη ανάλυση δειγμάτων από διαφορετικούς ασθενείς επιταχύνοντας την πειραματική διαδικασία

#### *Αρχή της μεθόδου*

Τα μόρια επισήμανσης iTRAQ διευκολύνουν την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών πολλαπλών δειγμάτων [281]. Αποτελούνται από μια φορτισμένη ομάδα αναφοράς, μοναδική για κάθε iTRAQ ιχνηθέτη, μια ομάδα που αντιδρά με τις πρωτοταγείς αμίνες των πεπτιδίων και ένα τμήμα εξισορρόπησης που εξασφαλίζει την διατήρηση της συνολικής μάζας. Με αυτό τον τρόπο, οι ιχνηθέτες έχουν την ίδια συνολική μάζα, αλλά διαφέρουν ως προς την κατανομή των ισοτόπων άνθρακα και αζώτου. Όταν συνεπώς τα δείγματα αναμειχθούν, το ίδιο πεπτίδιο από κάθε δείγμα έχει ίδιο λόγο m / z στο φάσμα

και εμφανίζεται ως μια ενιαία κορυφή στην ίδια τιμή  $m/z$ . Μετά την θραυσματοποίηση παράγονται δύο τύποι ιόντων:

- (1) κορυφές ιόντων αναφοράς (reporter) όπου κάθε ισοβαρές έχει διαφορετική μάζα και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με συσχέτιση της σχετικής έντασης (intensity) των ιόντων αναφοράς (reporter) με εκείνη των πεπτιδίων που συλλέγονται από τη φασματογραφία μάζας.
- (2) κορυφές ιόντων θραυσμάτων πεπτιδίων που είναι ειδικές για την αλληλουχία των αμινοξέων και χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων.

#### Διαδικασία

Η σήμανση των πεπτιδίων έγινε με το αντιδραστήριο TMT10plex Isobaric Label Reagent [Pierce™ TMT10plex Isobaric Label Reagent, Thermo Scientific, Waltham, MA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθεί αποξήρανση των iTRAQ σημασμένων πεπτιδίων με φυγοκέντρηση υπό κενό. Ο τρόπος σήμανσης των δειγμάτων με τους ισοβαρείς ιχνηθέτες παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

<b>Πίνακας 3: Σήμανση των δειγμάτων με αντιδραστήρια iTRAQ</b>		
<b>α/α</b>	<b>Κατηγορία δείγματος*</b>	<b>Ιχνηθέτης iTRAQ</b>
1	C1	TMT10-126
2	C2	TMT10-127N
3	C3	TMT10-128N
4	C4	TMT10-129N
5	C5	TMT10-130N
6	ΠΤ1	TMT10-126
7	ΠΤ2	TMT10-127N
8	ΠΤ3	TMT10-128N
9	ΠΤ4	TMT10-129N
10	ΠΤ5	TMT10-130N

\*C: Δείγμα της ομάδας ελέγχου, ΠΤ: Δείγμα της ομάδας πρόωρου τοκετού



## 5.5 Κλασματοποίηση των iTRAQ σημασμένων πεπτιδίων και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με φασματογραφία μάζας

Τα πειράματα LC-MS/MS πραγματοποιήθηκαν στο European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (High pH reversed-phase chromatography) Ultimate 3000 nano UHPLC (Thermo Fisher Scientific, USA) συζευγμένο με υψηλής ανάλυσης υβριδικό σύστημα φασματογραφίας μάζας τύπου Orbitrap Q Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, USA).

Η κλασματοποίηση των iTRAQ σημασμένων πεπτιδίων με υγρή Χρωματογραφία High pH reversed-phase chromatography εξασφαλίζει καλή διαχωριστική ικανότητα και συμβατότητα των αντιδραστηρίων για περαιτέρω ανάλυση με φασματογραφία μάζας.

Βασίζεται στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ πεπτιδίων και στατικής φάσης. Η κύρια στατική φάση είναι στήλη C18 ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε υλικό με βάση το πυρίτιο. Η κινητή φάση είναι: A: 0.1% φορμικό οξύ σε H<sub>2</sub>O; B: 0.1% formic acid σε ακετονιτρίλιο.

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στα υπό μελέτη δείγματα έγινε με ο φασματογράφο μάζας Orbitrap Q Exactive™ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) που συνδυάζει αναλυτή μάζας τύπου παγίδευσης εντός ηλεκτροστατικών πεδίων με τετραπολικό φίλτρο μάζας για τη πραγματοποίηση MS/MS πειραμάτων. Ο υβριδικός φασματογράφος μάζας Orbitrap Q Exactive™ λόγω της μεγάλης ακρίβειας μαζών που διαθέτει αποτελεί μέθοδο επιλογής για την ανάλυση πολύπλοκων πρωτεϊνικών μειγμάτων.

Το όργανο περιλαμβάνει

1. Πηγή ιόντων
2. Οδηγό ιόντων σε κυλινδρική μορφή (S-lens)
3. Τετραπολικό φίλτρο μάζας
4. Καμπύλη γραμμική παγίδα-C αποθήκευσης ιόντων (C-trap) και υψηλότερη κυψέλη ενεργειακής διάστασης σύγκρουσης (HCD)
5. Αναλυτή μάζας τύπου Orbitrap.

Η διάταξη αυτή επιτρέπει στα ιόντα που αποθηκεύονται στην ιοντική παγίδα να ταλαντώνονται γύρω από το κεντρικό κυλινδρικό ηλεκτρόδιο κατά μήκος του άξονα z με τρόπο ώστε οι ελλειπτικές τροχιές να μετατρέπονται σε ελικοειδείς. Η συχνότητα της ταλάντωσης είναι αντιστρόφως ανάλογη του λόγου  $m/z$ . Επιπλέον, ιόντα διέρχονται μέσω του C-Trap στο κύτταρο HCD και πραγματοποιούνται πειράματα MS/MS σε συνδυασμό με το τετραπολικό φίλτρο μάζας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα περαιτέρω θραυσματοποίηση των ιόντων και καταγραφή των  $m/z$  θραυσμάτων.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Ανασύσταση κάθε δείγματος με 10 μl κινητής φάσης A (0,1 ο/ο% Φορμικό Οξύ) και εισαγωγή 5 μl δείγματος σε χρωματογραφική στήλη παγίδευσης (PerMap C18, 100A , 100 μm×2 cm, 5μm) με ροή 250 nL/min.

2. Αλλαγή της στήλης με αναλυτική χρωματογραφική στήλη (PerMap C18, 100A, 75 μm×50 cm, 2μm) συνδεδεμένη με πηγή nano-ηλεκτροψεκασμού και διαχωρισμό των πεπτιδίων με σταθερή ροή 300 nL/min για γραμμική βαθμιδωτή έκλυση. Η κινητή φάση (A) αποτελείται από 0,1 % Φορμικό Οξύ σε dH<sub>2</sub>O και η κινητή φάση (B) από 0,1% Φορμικό Οξύ σε Ακετονιτρίλιο.

3. Έκλυση των πεπτιδίων και διαχωρισμό με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 5% (B) σε 7% (B) για 2min, από 7% (B) σε 20% (B) για 80min, από 20% (B) σε 40% (B) για 35 min, και τέλος από 40%(B) σε 90%(B) για 4 min. Ο ρυθμός ροής διατηρείται σταθερός σε 250 nL/min. Κάθε δείγμα iTRAQ σημασμένων πεπτιδίων διαχωρίζεται σε 6 κλάσματα τα οποία υποβάλλονται στη συνέχεια σε ανάλυση με LC-MS/MS.

Ακολουθεί ανάλυση των κλασματοποιημένων πεπτιδίων με τον φασματογράφο μάζας Orbitrap Q Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, USA) ως εξής:

- Συλλογή των ιόντων στο τετραπολικό φίλτρο.
- Εξώθηση των ιόντων προς την παγίδα-C αποθήκευσης ιόντων.
- Μεταφορά των ιόντων σε τροχιακή παγίδα με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση του ηλεκτρικού πεδίου.
- Ενίσχυση των σημάτων από τα εξωτερικά ηλεκτρόδια τροχιακής παγίδας και μετατροπή τους σε φάσμα συχνοτήτων το οποίο μετασχηματίζεται σε φάσμα μάζας.
- Συλλογή των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού Xcalibur software (Thermo Electron Corp.) με το οποίο είναι εφοδιασμένος ο φασματογράφος.
- Αποθήκευση των δεδομένων σε αρχεία

Στη παρούσα μελέτη ο φασματογράφος μάζας λειτούργησε σε λειτουργία λήψης εξαρτώμενη από τα δεδομένα. Η μετάβαση των διαχωρισμένων πεπτιδίων στην αέρια φάση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροψεκασμό θετικών ιόντων υπό τάση 2,2kV και θερμοκρασία στήλης 270°C. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε ευρεία μάζα με εύρος σάρωσης επιλογής πρόδρομων ιόντων m/z 300–1650 με διακριτική ικανότητα 120.000 σε 200 m / z. Τα 15 πιο έντονα ιόντα απομονώθηκαν για κατακερματισμό με διάσταση επαγόμενη από σύγκρουση (CID) σε κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης 40%.

Η επεξεργασία των φασμάτων για τη ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της συνθήκης του Παρισιού για δημοσίευση Πρωτεωμικών δεδομένων [323].

Οι τροποποιήσεις που ορίστηκαν είναι: Carbamethylation (C) (fixed), oxidation (M) (variable); σήμα/θόρυβος για το πρόδρομο ιόν 10 ppm; συγχώνευση για κορυφές με διαφορά μάζας 0.6 Da; False Discovery Rate (FDR) <1%. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν για τον αποκλεισμό των ψευδώς θετικών αναγνωρίσεων.

## 5.6 Ανάλυση των δεδομένων της MS/MS φασματομετρίας μάζας με βιοπληροφορική

Τα πειραματικά δεδομένα από το φασματογράφο μάζας λαμβάνονται σε αρχείο fasta με τις μάζες των πεπτιδίων, που αποτελούν τα πρόδρομα ιόντα. Τα δεδομένα αυτά συλλέγονται με το λογισμικό X-calibur software (Thermo Electron Corp.) με το οποίο είναι εφοδιασμένος ο φασματογράφος και αναλύονται περαιτέρω με το λογισμικό MaxQuant 1.6.2.0-αρχείο Protein Groups (EMBL-EBI, Heidelberg, Germany), για την σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών και την στατιστική επεξεργασία.

Το αρχείο fasta εισάγεται στη βάση δεδομένων UniProt (UniprotKB (Uniprot Knowledgebase, <http://www.uniprot.org/>) για τον οργανισμό Homo Sapiens που περιέχει όλες τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες για τον ανθρώπινο οργανισμό προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών. Η αρχή λειτουργίας του λογισμικού είναι η πραγματοποίηση μιας θεωρητικής πέψης (*in silico*), όλων των πρωτεϊνών του λογισμικού με αποτέλεσμα τη δημιουργία θεωρητικών θραυσμάτων των πεπτιδίων. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των θεωρητικών θραυσμάτων με τα πειραματικά δεδομένα αποδίδει score στο πεπτίδιο ή την πρωτεΐνη στην οποία αντιστοιχεί με αποτέλεσμα την αναγνώριση. Αναγνώριση με την υψηλότερη βαθμολογία είναι και η πιο αξιόπιστη.

## 6.7 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology)

Η ταξινόμηση των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε συστηματικές λειτουργικές κατηγορίες έγινε τα λογισμικά g: profiler και WebGestalt και τη βάση δεδομένων Gene

Ontology που αποτελούν ολοκληρωμένες βάσεις βιολογικής πληροφορίας και εργαλεία ανάλυσης μεγάλου αριθμού γονιδίων ή πρωτεϊνών [324],[325].

Η βάση δεδομένων Gene Ontology διευκολύνει τη συσχέτιση βιολογικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών, όπως προκύπτουν από πειραματικά δεδομένα. Τα χαρακτηριστικά αυτά ταξινομούν τις πρωτεΐνες σε τρεις κατηγορίες 1. *Μοριακή λειτουργία* σε μοριακό επίπεδο, 2. *Βιολογική διεργασία*, που σχετίζεται με τη λειτουργία κυττάρων, ιστών, οργάνων ή οργανισμών και 3. *Κυτταρικά συστατικά* (ενδοκυτταρικά ή του εξωκυττάρου χώρου).

Οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση αναλύθηκαν με την βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) ώστε να ανευρεθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν.

## 5.8 Ανοσοενζυματική δοκιμασία (ELISA)

Η διαφοροποιημένη έκφραση πρωτεϊνών που διαπιστώθηκε με τη χρήση φασματογραφίας μάζας επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο Elisa η οποία αποτελεί στοχευμένη μέθοδο ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών με αυξημένη ευαισθησία και αξιοπιστία.

*Εισαγωγή στα πρωτόκολλα ELISA*

Οι συνδεδεμένες με ένζυμα ανοσοενζυματικές δοκιμασίες (ELISAs) είναι δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα σύνθετο μείγμα [326]. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται έμμεσα με ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχο με τη χρήση εξαιρετικά ειδικών αντισωμάτων που ακινητοποιούν το αντιγόνο σε πλάκα.

*Διαδικασία:* Στη παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η διαφοροποιημένη έκφραση των πρωτεϊνών Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM1), Serum amyloid A-1 protein (SAA) and Talin-1 ]. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες επιλέχθηκαν γιατί, με βάση τα ευρήματα της φασματογραφίας μάζας, παρουσιάζουν την πλέον σημαντική (μικρότερο επίπεδο σημαντικότητας  $p$ ) διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Μελετήθηκαν συνολικά 58 δείγματα εγκύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, 29 από εγκύους που στη συνέχεια διεκπεραίωσαν την κύηση με αυτόματο πρόωρο τοκετό και 29 από εγκύους χωρίς την επιπλοκή.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με την χρήση εμπορικά διαθέσιμων kits, για τις πρωτεΐνες VCAM-1 [human Elisa kit (#KHT0601-Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)], SAA [(#EHSAA1-Thermo Fisher

Scientific, San Jose, CA, USA)] και Talin-1 [(#MBS904386-MyBiosource, Inc, Vancouver, British Columbia, Canada)].

## 5.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics 20 software (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

Η σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εγκύων των δύο ομάδων έγινε με τη χρήση του Student t-test (για τις μεταβλητές με κανονική κατανομή) και του Mann-Whitney U test (για μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή). Το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των ποιοτικών μεταβλητών κατά την ανάλυση της Γονιδιακής Οντολογίας και την ανεύρεση των σημαντικών σηματοδοτικών οδών στις οποίες συμμετέχουν οι πρωτείνες με διαφοροποιημένη έκφραση. Η μέθοδος πολλαπλής σύγκρισης Bonferroni correction χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των  $p$ -values με σκοπό την μείωση των πιθανώς ψευδώς θετικών (false-positive) αποτελεσμάτων (σφάλματα τύπου I), τα οποία μπορούν να προληφθούν μέσω των πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη στο σύνολο των δεδομένων.

Η ανάλυση καμπύλης χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (Receiver Operating Characteristics - ROC) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ικανότητας των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση να εκτιμούν τον κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής (με 95% Standard Error - SE και 95% Confidence Intervals - CI) με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης Elisa [327]. Οι ROC καμπύλες θεωρήθηκαν σημαντικές όταν η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη ήταν μεγαλύτερη από 0.8 (Area Under the Curve, AUC>0.8) με στατιστική σημαντικότητα  $p<0.05$ .

Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (Logistic Regression Analysis) χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργηθεί μοντέλο πρόβλεψης του αυτόματου πρόωρου τοκετού πριν την 37<sup>η</sup> και μετά την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [328]. Οι πιθανοί προβλεπτικοί παράγοντες που αξιολογήθηκαν περιλαμβάνουν το ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού, τη συνήθεια του καπνίσματος, την ηλικία της εγκύου το BMI, το φύλο του νεογνού και τον τρόπο σύλληψης καθώς και τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τη μέθοδο Elisa. Η ανεξαρτησία των προβλεπτικών παραγόντων ελέγχθηκε με δοκιμασίες συγγραμικότητας (tolerance και VIF testing).

Σε όλες τις περιπτώσεις η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε σε  $p<0.05$ .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 6.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων της μελέτης

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη καθώς και οι πληροφορίες που αφορούν την κύηση, τον τοκετό και το νεογνό παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Μετά από στατιστική ανάλυση δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

<b>Πίνακας 4. Δημογραφικά και Κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων που συμμετέχουν στη μελέτη.</b>			
Μεταβλητή	Ομάδα μαρτύρων (n=34)	αΠTs (n=34)	p-value
Ηλικία εγκύου (έτη) Διάμεση τιμή (min-Max)	31.00 (24.80-38.80)	30.65 (24.80-38.20)	0.898
BMIkg/m <sup>2</sup> Διάμεση τιμή (Min-Max)	25.95 (22.00-31.20)	24.65 (20.90-31.90)	0.028
Κάπνισμα • Ναι • Όχι	12 22	8 26	0.40
Σύλληψη • Φυσιολογική • Εξωσωματική γονιμοποίηση	28 (82.4%) 6 (17.6%)	26 (76.4%) 8 (23.6%)	0.750
Αριθμός τοκετών • Πρωτόκεες • Πολυτόκεες	17 (50%) 17 (50%)	14 (41.2%) 20 (58.8%)	0.616
Ατομικό ιστορικό Πρώωρου τοκετού • Όχι • Ναι	32 (94.1%) 2 (5.88%)	27 (79.4%) 7 (20.58%)	0.104
Τοκετός • Κολπικός • Καισαρική τομή	29 (85.2%) 5 (14.7%)	22 (64.7%) 12 (35.2%)	0.075
Φύλο νεογνού • Αγόρι • Κορίτσι	18 (52.95%) 16 (47.05%)	16 (47.05%) 18 (52.95%)	0.95

## 6.2 Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών με μεθόδους πρωτεωμικής στο πλάσμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης

Κατά την διερευνητική φάση της μελέτης, η πρωτεϊνική έκφραση στο πλάσμα εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, με τη χρησιμοποίηση HPLC σε συνδυασμο με LC-MS/MS και επισήμανση των πρωτεϊνών με αντιδραστήρια iTRAQ οδήγησε στην ανίχνευση 22.250 πεπτιδικών φασμάτων από τα οποία 3.260 ήταν διακριτά πεπτίδια.

Επεξεργασία των πεπτιδικών φασμάτων με το λογισμικό MaxQuant και την βάση δεδομένων UniProt (UniProt protein database) είχε ως αποτέλεσμα τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό 236 πρωτεϊνών με διάστημα εμπιστοσύνης 99% (Παράρτημα 3). Οι πρωτεΐνες με λόγο ιόντων αναφοράς >1.5 χαρακτηρίστηκαν ως υπερεκφραζόμενες και εκείνες με λόγο <0.5 χαρακτηρίστηκαν ως υποεκφραζόμενες.

Μετά από στατιστική ανάλυση ταυτοποιήθηκαν συνολικά 142 πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων από τις οποίες πενήντα τέσσερις (54) (23%) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων που τελικά γέννησαν με αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης σε σχέση την ομάδα ελέγχου, και 88 ( 37%) με μειωμένη έκφραση. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι 30 πλέον σημαντικές πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων με κριτήριο τη μικρότερη τιμή *p*. Δεν ανχνεύτηκε πρωτεΐνη με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων, με πολύ χαμηλή τιμή σημαντικότητας *p* (*p*<0,05),

Πίνακας 5. Οι 30 πλέον σημαντικές πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης που τελικά διεκπεραίωσαν τον τοκετό πρόωρα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου με κριτήριο την μικρότερη τιμή <i>p</i> -value					
Πρωτεΐνη (ID)	Πρωτεΐνη	Γονίδιο	αΠΤ vs. ομάδα ελέγχου	log2 (Ratio)	<i>p</i> -value
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ					
P02042	Vascular cell adhesion protein 1	<i>VCAM1</i>	0.20	-2.32	0.085
Q9Y490	Talin-1	<i>TLN1</i>	0.22	-2.18	0.091
P0DJ18	Serum amyloid A-1 protein	<i>SAA1</i>	0.33	-1.58	0.113
P55056	Apolipoprotein C-IV	<i>APOC4</i>	0.24	-2.06	0.151
O00533	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	<i>CHL1</i>	0.26	-1.93	0.151
P09486	SPARC	<i>SPARC</i>	0.31	-1.70	0.164
P37802	Transgelin-2	<i>TAGLN2</i>	0.21	-2.28	0.190



P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	<i>KRT9</i>	0.39	-1.36	0.201
P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4	<i>IGFBP4</i>	0.44	-1.18	0.202
Q13201	Multimerin-1	<i>MMRN1</i>	0.36	-1.46	0.203
P09172	Dopamine beta-hydroxylase	<i>DBH</i>	0.42	-1.26	0.222
P05067	Amyloid-beta precursor protein	<i>APP</i>	0.41	-1.28	0.249
Q12913	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	<i>PTPRJ</i>	0.44	-1.18	0.252
P16070	CD44 antigen	<i>CD44</i>	0.35	-1.50	0.254
P11597	Cholesteryl ester transfer protein	<i>CETP</i>	0.43	-1.21	0.257
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	<i>TPM4</i>	0.43	-1.21	0.270
Q14515	SPARC-like protein 1	<i>SPARCL1</i>	0.36	-1.48	0.275
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ					
Q9UHG3	Preylcysteine oxidase 1	<i>PCYOX1</i>	3.14	1.65	0.141
Q15485	Ficolin-2	<i>FCN2</i>	2.88	1.53	0.151
P06702	Protein S100-A9	<i>S100A9</i>	3.10	1.63	0.154
P0075	Complement factor B	<i>CFB</i>	2.43	1.28	0.176
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	<i>IGHG4</i>	4.43	2.15	0.183
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	<i>TGFB1</i>	2.31	1.21	0.191
O95445	Apolipoprotein M	<i>APOM</i>	2.42	1.27	0.194
P01024	Prothrombin	<i>C3</i>	2.48	1.31	0.198
Q92496	Complement factor H-related protein 4	<i>CFHR4</i>	2.49	1.32	0.209
P33151	Cadherin-5	<i>CDH5</i>	2.25	1.17	0.215
P9810	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	<i>HS2</i>	2.23	1.20	0.21
P1145	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein	<i>PS2</i>	2.18	1.12	0.23

	2				
P2232	Glutathione peroxidase 3	<i>GP3</i>	2.2	1.21	0.27 3

### 6.3 Ταυτοποίηση του ρυθμιστικού ρόλου των πρωτεϊνών και των ρυθμιστικών οδών των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση

Η ανάλυση εμπλουτισμού Γονιδιακής Οντολογίας (GO) με τα εργαλεία βιοπληροφορικής g: profiler και WebGestalt και τη βάση δεδομένων Gene Ontology g-Profiler χρησιμοποιήθηκαν για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων.

Στην κατηγορία «Μοριακή λειτουργία» οι πλέον σημαντικοί όροι είναι η δραστηριότητα ρυθμιστή πεπτιδάσης (GO:0061134), δραστηριότητα αναστολέα πεπτιδάσης (GO:0030414), δραστηριότητα αναστολέα ενδοπεπτιδάσης (GO:0004866), δραστηριότητα ρυθμιστή ενδοπεπτιδάσης (GO:0061135) και δέσμευση γλυκοζαμινογλυκάνης (GO:0005539) (Πίνακας 6).



<b>Πίνακας 6. Αποτελέσματα ανάλυσης GO στην κατηγορία «Μοριακή λειτουργία»</b>			
<b>Μοριακή λειτουργία</b>	<b>GO ID</b>	<b>-log10 (adjusted)</b>	<b>Πρωτεΐνες</b>
Δραστικότητα ρυθμιστή πεπτιδάσης	0061134	25,65210118	APP,PCOLCE,SERPING1,PZP,PI16,AHSG,PROS1,FBLN1,SPP2,SERPINA7,C4A,CST3,ITIH2,ITIH3,AMBP,SERPINA1,SERPINA10,SERPINA6,A2M,SERPIND1,FN1,SERPINA4,SERPINA3,C3,SERPINF1,ITIH4,C5,HRG,FETUB,KNG1,ITIH1,SERPINF2,C4B,SERPINC1,LTF,SERPINA11
Δραστηριότητα αναστολέα πεπτιδάσης	0030414	25,0136984	APP,SERPING1,PZP,PI16,AHSG,PROS1,SPP2,SERPINA7,C4A,CST3,ITIH2,ITIH3,AMBP,SERPINA1,SERPINA10,SERPINA6,A2M,SERPIND1,SERPINA4,SERPINA3,C3,SERPINF1,ITIH4,C5,HRG,FETUB,KNG1,ITIH1,SERPINF2,C4B,SERPINC1,LTF,SERPINA11
δραστηριότητα αναστολέα ενδοπεπτιδάσης	0004866	24,21739747	APP,SERPING1,PZP,AHSG,PROS1,SPP2,SERPINA7,C4A,CST3,ITIH2,ITIH3,AMBP,SERPINA1,SERPINA10,SERPINA6,A2M,SERPIND1,SERPINA4,SERPINA3,C3,SERPINF1,ITIH4,C5,HRG,FETUB,KNG1,ITIH1,SERPINF2,C4B,SERPINC1,LTF,SERPINA11
Δραστικότητα ρυθμιστή ενδοπεπτιδάσης	0061135	23,26425696	APP,SERPING1,PZP,AHSG,PROS1,SPP2,SERPINA7,C4A,CST3,ITIH2,ITIH3,AMBP,SERPINA1,SERPINA10,SERPINA6,A2M,SERPIND1,SERPINA4,SERPINA3,C3,SERPINF1,ITIH4,C5,HRG,FETUB,KNG1,ITIH1,SERPINF2,C4B,SERPINC1,LTF,SERPINA11
Δέσμευση γλυκοζαμινογλυκάνης	0005539	22,18319915	APP,CD44,PCOLCE,LYVE1,TNXB,THBS1,COMP,F11,SELL,HABP2,PRG2,VTN,PGLYRP2,CFH,JCHAIN,SERPINA10,APOE,IGHM,SERPIND1,FN1,CLEC3B,F2,APOH,HRG,KNG1,SERPINC1,LTF,MPO,PF4V1,ENG,THBS4,APOA5,PF4,ANG

Η ανάλυση για την κατηγορία «βιολογική διεργασία» αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης σε σχέση με αυτές με τελειόμηνο τοκετό εμπλέκονται στην χυμική ανοσία (GO:0006959), την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων (GO:0002576), την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (GO:0006956) και την μεταφορά με τη μεσολάβηση κυστιδίων (GO:0016192) (πίνακας 7).

Στην κατηγορία «Κυτταρικό Συστατικό» η ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας έδειξε ότι οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων εμπλουτίζονται κυρίως στην εξωκυτταρική περιοχή (GO: 0005576), τον εξωκυτταρικό χώρο (GO: 0005615), τα μικροσωματίδια αίματος (GO: 0072562), στο εξωκυτταρικό εξώσωμα και στο οργανίδιο που οριοθετείται από την εξωκυτταρική μεμβράνη (GO: 0065010) (πίνακας 8).

Με την χρήση της βάσης δεδομένων KEGG διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στον αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με τις τελειόμηνες κυήσεις έχουν σημαντική συσχέτιση ( $p < 0.05$ ) με στα κατωτέρω 5σηματοδοτικά μονοπάτια: (1) Πήξης και ενεργοποίησης του Συμπληρώματος (2) Μόλυνσης από *Staphylococcus aureus* (3) Κοκκύτη (4) Μεταβολισμού της χοληστερόλης (5) Αφρικανικής Τρυπανοσωμίας (Πίνακας 9).



<b>Πίνακας 7. Τα ευρήματα της ανάλυσης GO για την οντολογία «Βιολογική Διεργασία»</b>			
<b>Βιολογική διεργασία</b>	<b>Term ID</b>	<b>-LOG10 (adjusted)</b>	<b>Πρωτεΐνες</b>
Χυμική ανοσία	0006959	55.42968279	FCN2,S100A9,IGHG4,MBL2,CRP,CFHR4,LYZ,SERPING1,CD5L,CFD,KRT1,C1QA,C1RL,LCN2,C4BPB,CPB2,FGB,C6,CFHR2,CPN2,CPN1,FGA,PROS1,PPBP,TF,C1S,C4A,FCN3,MASP1,CFB,IGKV320,CFP,VTN,MASP2,CFHR1,PGLYRP2,CFH,C9,JCHAIN,APCS,CLU,C4BPA,IGHM,HPX,CFHR5,CFI,C1QC,A2M,IGHA1,C8G,C3,F2,C5,HRG,C8A,IGHG2,C7,C4B,LTF,IGKV4-1,PF4V1,DEFA3,BST1,COLEC11,IGHV1-46,IGHV3-30,PF4,ANG,C2,CAMP
Αποκοκκίωση αιμοπεταλίων	0002576	51.53567239	TLN1,SPARC,TAGLN2,MMRN1,APP,FGG,FLNA,ECM1,SERPING1,F5,CFD,THBS1,IGF2,AHSG,FGB,LGALS3BP,FGA,PROS1,QSOX1,PPBP,ALB,SPP2,TMSB4X,TF,VWF,SELENOP,ITIH3,CLU,SERPINA1,A1BG,A2M,FN1,SERPINA4,SERPINA3,CLEC3B,APOA1,APOH,ITIH4,HRG,KNG1,PLG,LAMP2,ORM2,SERPINF2,PLEK,VCL,PF4
Ενεργοποίησης συμπληρώματος	0006956	51.24125454	FCN2,IGHG4,MBL2,CRP,CFHR4,SERPING1,CD5L,CFD,KRT1,C1QA,C1RL,C4BPB,CPB2,C6,CFHR2,CPN2,CPN1,PROS1,C1S,C4A,FCN3,MASP1,CFB,IGKV3-20,CFP,VTN,MASP2,CFHR1,CFH,C9,APCS,CLU,C4BPA,IGHM,CFHR5,CFI,C1QC,A2M,IGHA1,C8G,C3,F2,C5,C8A,IGHG2,C7,C4B,IGKV4-1,COLEC11,IGHV1-46,IGHV3-30,C2
Μεταφορά με μεσολάβηση κυστιδίων	0016192	45.1974535	FCN2,S100A9,CD14,IGHG4,DBH,APP,PTPRJ,CD44,MBL2,MMP9,CRP,CFHR4,LYZ,SERPING1,CD5L,CFD,KRT1,ACTG1,IGF2R,C1QA,C1RL,LCN2,C4BPB,AHSG,CPB2,C6,CFHR2,CPN2,CPN1,PROS1,SELL,QSOX1,PPBP,LRG1,C1S,LBP,C4A,CST3,FCN3,PRG2,MASP1,CFB,IGKV3-20,CFP,VTN,MASP2,HP,ICAM1,CFHR1,PGLYRP2,CFH,C9,APCS,CLU,SERPINA1,C4BPA,PIGR,GSN,IGHM,B2M,HPX,CFHR5,A1BG,CFI,C1QC,LCP1,A2M,IGHA1,SERPINA3,C8G,C3,F2,APOA1,C5,C8A,TTR,RBP4,IGHG2,C7,LAMP2,ORM2,TFRC,APOA2,C4B,LTF,CAT,MPO,IGKV4-1,ANPEP,VCL,BST1,COLEC11,VNN1,IGHV1-46,IGHV3-30,C2,CAMP,HBB

**Πίνακας 8. Ευρήματα της ανάλυσης GO για την οντολογία «Κυτταρικό Συστατικό»**

Κυτταρικό συστατικό	ID (GO)	-LOG10 (adjusted)	Πρωτεΐνες
Εξωκυτταρική περιοχή	0005576	142.608209	HBD,TLN1,PCYOX1,APOC4,CHL1,FCN2,S100A9,SPARC,CD14,IGHG4,TAGLN2,TGFBI,APOM,KRT9,IGFBP4,MMRN1,HSPG2, DBH,PSG2,APP,PTPRJ,CD44,CETP,TPM4,GPX3,SPARCL1,FGG,NCAM1,VCAM1,FLNA,MBL2,MMP9,BTD,CRP,CFHR4,GP5,CA 2,PCOLCE,CD163,GPLD1,HGFAC,ECM1,PSG1,PRG4,LYZ,DPP4,SERPING1,LYVE1,F5,CD5L,APOC2,PZP,CFD,KRT1,APOF,TNX B,PI16,ACTG1,HSPA5,IGFBP3,IGF2R,C1QA,PLTP,ADIPOQ,THBS1,C1RL,LUM,COMP,SH3BGRL3,CFHR3,HSP90B1,LCN2,IGF 2,C4BPB,AHSG,CPB2,LCAT,FGB,EFEMP1,F11,C6,CFHR2,CGB3,CPN2,GP1BA,PSG4,MAN1A1,LGALS3BP,CPN1,FGA,IGFALS, PROS1,PROC,FBLN1,QSOX1,PPBP,CDH13,LRG1,HPR,PROZ,APOC3,HABP2,ALB,SPP2,TMSB4X,TF,F13B,F10,SERPINA7,PON 1,C1S,LBP,C4A,CST3,APOD,ATRN,FCN3,VWF,PRG2,SELENOP,MASP1,CFB,BCHE,GC,IGKV320,CFP,VTN,KRT10,ITIH2,CA1,A POL1,MASP2,HP,ICAM1,CFHR1,PGLYRP2,ADAMTS13,ITIH3,CFH,C9,CTBS,JCHAIN,AMBP,APCS,CLU,SERPINA1,SERPINA10 ,LCP1,SERPINA6,C4BPA,PIGR,PFN1,GSN,APOE,IGHM,B2M,HPX,CFHR5,A1BG,CFI,APOA4,C1QC
Εξωκυτταρικό διάστημα	0005615	132.8170131	HBD,TLN1,PCYOX1,APOC4,CHL1,FCN2,S100A9,SPARC,CD14,IGHG4,TAGLN2,TGFBI,APOM,KRT9,IGFBP4,HSPG2,DBH,APP, PTPRJ,CD44,CETP,TPM4,GPX3,SPARCL1,FGG,VCAM1,FLNA,MBL2,MMP9,BTD,CRP,GP5,CA2,PCOLCE,GPLD1,HGFAC,ECM 1,LYZ,DPP4,SERPING1,LYVE1,F5,CD5L,APOC2,PZP,CFD,KRT1,APOF,TNXB,PI16,ACTG1,HSPA5,IGFBP3,IGF2R,C1QA,PLTP,A DIPOQ,THBS1,C1RL,LUM,COMP,SH3BGRL3,CFHR3,HSP90B1,LCN2,IGF2,C4BPB,AHSG,CPB2,LCAT,FGB,EFEMP1,F11,C6,C GB3,CPN2,GP1BA,MAN1A1,LGALS3BP,CPN1,FGA,IGFALS,PROS1,PROC,FBLN1,QSOX1,PPBP,CDH13,LRG1,HPR,PROZ,APO C3,HABP2,ALB,TF,F10,SERPINA7,PON1,C1S,LBP,C4A,CST3,APOD,ATRN,FCN3,VWF,PRG2,SELENOP,MASP1,CFB,BCHE,GC,I GKV320,CFP,VTN,KRT10,ITIH2,CA1,APOL1,MASP2,HP,ICAM1,CFH,CFHR1,PGLYRP2,ADAMTS13,ITIH3
μικροσωματί δια αίματος	0072562	105.5845054	HBD,FCN2,IGHG4,FGG,SERPING1,CD5L,PZP,KRT1,ACTG1,C1RL,CFHR3,AHSG,FGB,CPN2,LGALS3BP,FGA,PROS1,HPR,ALB,T F,PON1,C1S,C4A,FCN3,CFB,BCHE,GC,IGKV320,VTN,ITIH2,APOL1,HP,CFHR1,CFH,C9,JCHAIN,AMBP,APCS,CLU,C4BPA,PFN 1,GSN,APOE,IGHM,HPX,A1BG,APOA4,C1QC,A2M,IGHA1,FN1,SERPINA3,C8G,AFM,C3,F2,APOA1,ITIH4,HRG,C8A,IGHG2, HBA2,KNG1,PLG,ORM2,TFRC,APOA2,ITIH1,SERPINF2,C4B,SERPINC1,IGKV4-1,ENG,YWHAZ,HBG2,HBB
Εξωκυτταρικό εξώσωμα	0070062	96.60721321	TLN1,PCYOX1,CHL1,FCN2,S100A9,CD14,IGHG4,TAGLN2,TGFBI,KRT9,HSPG2,APP,PTPRJ,CD44,CETP,TPM4,GPX3,FGG,VCA M1,FLNA,MMP9,BTD,GP5,CA2,PCOLCE,GPLD1,ECM1,LYZ,DPP4,SERPING1,LYVE1,PZP,CFD,KRT1,TNXB,ACTG1,HSPA5,IGF 2R,THBS1,C1RL,LUM,COMP,SH3BGRL3,CFHR3,HSP90B1,LCN2,AHSG,CPB2,LCAT,FGB,EFEMP1,F11,C6,CPN2,GP1BA,MAN 1A1,LGALS3BP,FGA,IGFALS,PROS1,FBLN1,QSOX1,CDH13,LRG1,HPR,PROZ,APOC3,ALB,TF,SERPINA7,PON1,LBP,C4A,CST3, APOD,ATRN,VWF,PRG2,SELENOP,CFB,GC,IGKV3-20

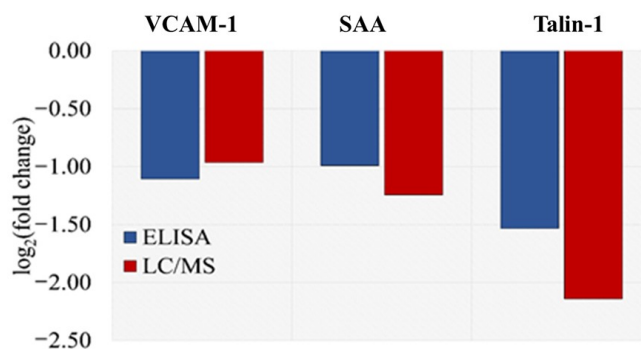


<b>Πίνακας 9. Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συσχετίζονται με τη διαφοροποιημένη έκφραση των πρωτεϊνών στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό</b>			
<b>Σηματοδοτική οδός</b>	<b>KEGG</b>	<b>-LOG10 (adjusted)</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>
Πήξης και ενεργο-ποίησης του συμπληρώματος	04610	66.26256568	FGG,MBL2,CFHR4,SERPING1,F5,CFD,C1QA,CFHR3,C4BPB,CPB2,FGB,F11,C6,CFHR2,FGA,PROS1,PROC,F13B,F10,C1S,C4A,VWF,MASP1,CFB,VTN,MASP2,CFHR1,CFH,C9,CLU,SERPINA1,C4BPA,CFHR5,CFI,C1QC,C2A2M,SERPIND1,C8G,F9,C3,F2,C5,C8A,C7,KNG1,PLG,SERPINF2,F12,C4B,SERPINC1
Μόλυνσης από Staph. aureus	05150	16.65760607	KRT9,FGG,MBL2,CFD,C1QA,C1S,C4A,MASP1,CFB,KRT10,MASP2,ICAM1,CFH,CFI,C1QC,C3,C5,PLG,C4B,DEFA3,C2,CAMP
Κοκκύτη	05133	9.161661483	FGG,MBL2,CFD,C1QA,FGB,C6,FGA,F13B,C1S,C4A,VWF,MASP1,CFB,MASP2,C9,C1QC,C8G,C3,F2,C5,C8A,C7,C4B,C2
Μεταβολισμού χοληστερίλης	04979	6.88464245	CD14,SERPING1,C1QA,C4BPB,C1S,C4A,C4BPA,C1QC,CFL1,C3,C5,C4B,C2

#### 6.4 Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων πρωτεωμικής με Elisa

Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης έγινε με στοχευμένο έλεγχο, με τη μέθοδο ELISA, σε ανεξάρτητη ομάδα 58 δειγμάτων πλάσματος εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, από τις οποίες 29 γέννησαν πρόωρα, μεταξύ 32<sup>0/7</sup> και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδων κύησης, και 29 με τελειόμηνο τοκετό. Δεδομένου ότι κατά την πρωτεωμική ανάλυση δεν ανιχνεύτηκαν πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση που να πληρούν τις προϋποθέσεις στατιστικής σημαντικότητας, όπως ορίστηκαν στη μελέτη, για περαιτέρω επιβεβαίωση επιλέχθηκαν τρεις πρωτεΐνες οι VCAM-1, SAA και Talin-1, που έδειξαν την πλέον σημαντική τιμή  $p$  (μικρότερη τιμή  $p$ ).

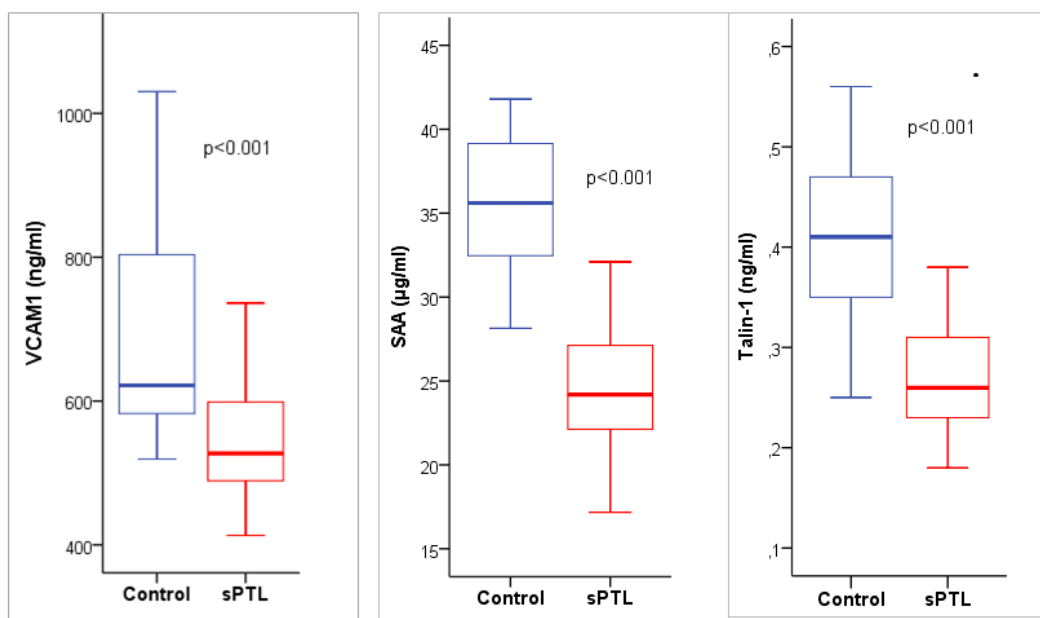
Σύμφωνα με την τάση της σχετικής ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών του πλάσματος με LC MS/MS, τα αποτελέσματα με τη μέθοδο ELISA επιβεβαίωσαν τα μειωμένα επίπεδα των VCAM-1, SAA και Talin-1 στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που εμφάνισαν στη συνέχεια αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Για την κανονικοποίηση των τιμών της πρωτεϊνικής έκφρασης μεταξύ των δύο μεθοδολογιών, εφαρμόστηκε η αναλογία  $\log_2$ -μετασχηματισμένη δείγματα/μάρτυρες (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Καταγράφεται ο λόγος της διαφοροποιημένης έκφρασης των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 με LC-MS/MS (κόκκινο) και Elisa (μπλε) μετά από κανονικοποίηση των τιμών με  $\log_2$ -μετασχηματισμό του λόγου της έκφρασης.

## 6.5 Αξιολόγηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των πρωτεϊνών για τη πρόωμη ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για αυτόματο Πρόωρο Τοκετό

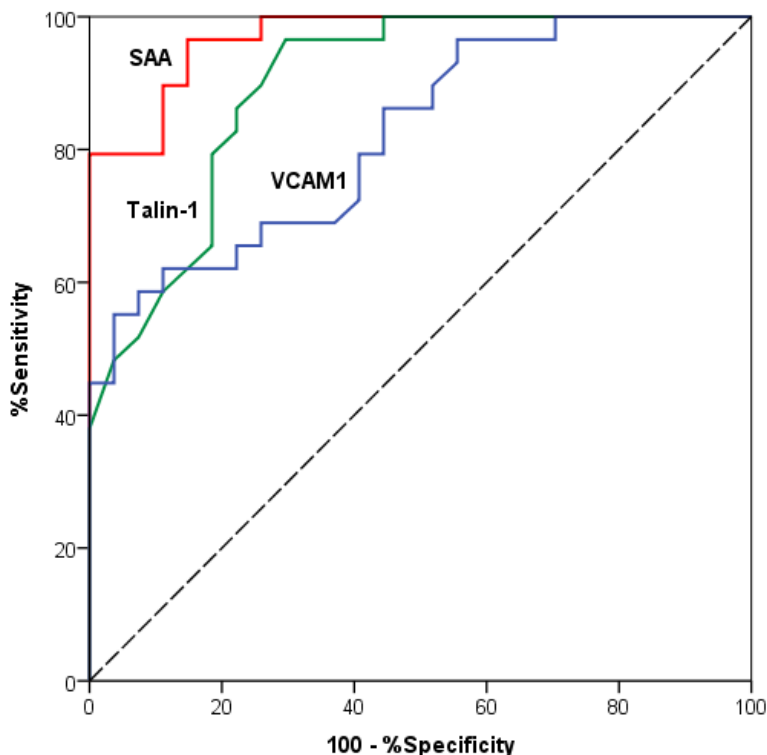
Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με ELISA έδειξαν ότι η διάμεση συγκέντρωση της VCAM-1 στην ομάδα με αυτόματο πρόωρο τοκετό ήταν 527,27 ng/mL (IQR: 413,19-736,18) έναντι 621,63 ng/mL (IQR: 519,29-1030,21) στην ομάδα ελέγχου, της SAA ήταν 24.18μg/mL (IQR: 17.17-32.10) έναντι 35.59ng/mL (IQR: 28. 14-41.80) στην ομάδα με τελειόμηνο τοκετό ενώ η διάμεση συγκέντρωση της Talin -1 στο πλάσμα των εγκύων που αργότερα περαίωσαν την κύηση αυτόματο πρόωρο τοκετό ήταν 0,26 ng/mL (IQR: 0,18-0,38) έναντι 0,41 ng. /mL (IQR: 0,25-0,56 26,4–54,8) στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Θηκόγραμμα της διακύμανσης της έκφρασης των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 στο πλάσμα εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης που στη συνέχεια διεκπεραίωσαν τη κύηση με πρόωρο τοκετό και στην ομάδα των εγκύων με τελειόμηνο τοκετό. Οι έντονες οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στην διάμεσο τιμή για κάθε ομάδα. Ο δείκτης στατιστικής σημαντικότητας ( $p$  value) υπολογίστηκε με την μη-παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U test.

Η ανάλυση ROC αποκάλυψε ότι και οι τρεις πρωτεΐνες (VCAM-1, SAA και Talin -1) έχουν την δυνατότητα να διακρίνουν τις εγκύους υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό, ήδη από το πρώτο τρίμηνο της κύησης από εκείνες που προορίζονται να γεννήσουν τελειόμηνα νεογνά με  $AUC > 0,8$  και  $p < 0,05$  σε όλες τις περιπτώσεις.

Οι καμπύλες ROC απέδωσαν τις ακόλουθες AUC: VCAM 1: AUC: 0,82 (95% CI: 0,715-0,928,  $P < 0,001$ ); SAA: AUC: 0,96 (95% CI: 0,934-1,0000,  $P < 0,001$ ) και Talin -1: AUC: 0,89 (95% CI: 0,816-0,977,  $p < 0,001$ ) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Καμπύλες ROC της έκφρασης των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 για την πρώιμη ανίχνευση εγκύων υψηλού κινδύνου για πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης. Ο δείκτης στατιστικής σημαντικότητας ( $p$ -value) υπολογίστηκε με τη στατιστική δοκιμασία «Hanley and McNeil method». AUC: Area under the curve.

Η μονομεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των VCAM-1, SAA και Talin -1 στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, είναι σημαντικοί πρώιμοι προβλεπτικοί βιοδείκτες για τον αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης (Πίνακας 10).

Σύμφωνα με το μοντέλο πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης, οι πρωτεΐνες VCAM 1 ( $p=0,001$ ) και κυρίως η Talin -1 ( $p<0,001$ ) μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια επακόλουθο αυτόματο πρόωρο τοκετό ανεξάρτητα από τους παράγοντες κινδύνου που μελετήθηκαν (ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού, κάπνισμα, BMI της εγκύου πριν από την εγκυμοσύνη, ηλικία εγκύου, φύλο εμβρύου και τρόπος σύλληψης) ενώ η πρωτεΐνη SAA είναι οριακά μη σημαντική ( $p=0,07$ ).

<b>Πίνακας 10. Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης με κριτήριο την έκφραση των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 στο πλάσμα εγκύων.</b>			
<b>Μονομεταβλητή ανάλυση</b>			
Μεταβλητή	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	<i>p</i> -value <sup>c</sup>
VCAM1	0.985	0.977-0.994	0.001
SAA	0.508	0.344-0.750	0.001
Talin-1	<0.001	<0.001	<0.001
Ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού	5.833	0.637-53.45	0.119
Κάπνισμα	0.521	0.168-1.618	0.259
Δείκτης μάζας σώματος (BMI)	0.805	0.646-1.002	0.052
Μέθοδος σύλληψης Φυσική IVF	1.00` 1.527	0.422-5.522	0.518
Φύλο νεογνού Αγόρι Κορίτσι	1.00 1.319	0.470-3.703	0.600
Ηλικία εγκύου	1.021	0.885-1.178	0.776
<b>Πολυμεταβλητή ανάλυση<sup>d</sup></b>			
Covariant	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	<i>p</i> -value <sup>c</sup>
VCAM1	0.981	0.970-0.992	0.001
SAA	0.104	0.009-1.202	0.070
Talin-1	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>a</sup> OR: Odds Ratio (συντελεστής κινδύνου)

<sup>b</sup> 95% Confidence Interval of the estimated OR (διάστημα εμπιστοσύνης)

<sup>c</sup> calculated by test for trend.

<sup>d</sup> Η πολυμεταβλητή παλινδρόμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών VCAM1 or SAA και Talin-1 προσαρμόστηκε για τις μεταβλητές: ατομικό ιστορικό αυτόματου πρόωρου τοκετού, κάπνισμα, BMI, μέθοδο σύλληψης και φύλο του εμβρύου.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 7.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αυτόματος πρόωρος τοκετός αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες περιγεννητικής νοσηρότητας και ευθύνεται για ποσοστό 75% των νεογνικών θανάτων [74]. Η πρόοδος στο τομέα της νεογνολογίας έχει συμβάλλει σημαντικά στην ελάττωση της θνησιμότητας και της νοσηρότητας που σχετίζονται με την προωρότητα [228]. Είναι γενικά αποδεκτό όμως ότι η πρόωμη ανίχνευση των εγκύων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό μπορεί να οδηγήσει, μέσω ήδη διαθέσιμων αποτελεσματικών προληπτικών παρεμβάσεων, σε αναστολή του τοκετού ή παράταση της κύησης σε βαθμό που να ελαχιστοποιούνται οι επιπτώσεις της προωρότητας για το νεογνό [291].

Παρά τις εντατικές ερευνητικές προσπάθειες, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποιος βιοδείκτης ή συνδυασμός βιοδεικτών που να μπορούν να χρησιμοποιηθεί, σε κλινικό επίπεδο και να εξασφαλίσει πρόωμη και αξιόπιστη ανίχνευση των εγκύων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού.

Η μέτρηση του μήκους του ενδοτραχήλου με διακολπικό υπερηχογράφημα αποτελεί τον εγκυρότερο δείκτη πρόβλεψης αυτόματου πρόωρου τοκετού το δεύτερο τρίμηνο της κύησης [228]. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα προκύπτει όμως ότι η εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης της επιπλοκής, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, με μέτρηση του μήκους του ενδοτραχήλου, ακόμη και αν η μέτρηση χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με ατομικά χαρακτηριστικά της εγκύου και στοιχεία του ατομικού ιστορικού, είναι πολύ μικρότερη από την απαιτούμενη για αξιόπιστο πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο (54.8% - FPR 10%)[198],[329]. Επομένως κρίνεται απαραίτητη η ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών που να μπορούν να προβλέπουν τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού σε πρώιμο στάδιο της κύησης, στις 11-13 εβδομάδες, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς η έγκαιρη ανίχνευση αποτελεί σημαντικό παράγοντα αποτελεσματικής πρόληψης.

Οι βιοδείκτες που αναζητούνται θα πρέπει να ανιχνεύονται σε βιολογικά υλικά που συλλέγονται με μη επεμβατικές ή ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους, η ποσοτικοποίηση τους σε κλινικό επίπεδο να είναι εύκολη και οικονομική χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερος εξοπλισμός και τα αποτελέσματα των μετρήσεων να αντανακλούν με αξιοπιστία τον κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής καθώς και την

εξέλιξη της [291],[330]. Ιδανικά οι νέοι βιοδείκτες θα πρέπει να μπορούν να ενσωματωθούν στο πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο (prenatal screening) για την ανίχνευση εμβρύων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, την 11<sup>η</sup> -13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο πρώιμο εφησυχασμό σε εγκύους χαμηλού κινδύνου ενώ οι έγκυες υψηλού κινδύνου έχουν την δυνατότητα να επωφεληθούν από τις διαθέσιμες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Πρωταρχικός στόχος της μελέτης είναι η ταυτοποίηση αλλαγών της πρωτεϊνικής έκφρασης στο πλάσμα εγκύων τη 11<sup>η</sup> έως 13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, που τελικά διεκπεραίωσαν τον τοκετό πρόωρα, στις 32<sup>0/7</sup> έως και 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες, σε σχέση με εκείνες που διεκπεραίωσαν τον τοκετό μετά την συμπλήρωση της 37<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης. Οι αλλαγές αυτές έχουν το ενδεχόμενο να αποτελέσουν κλινικούς βιοδείκτες πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου και με την σειρά τους να παρέχουν πληροφορίες για τους μηχανισμούς που υποκινούν την εμφάνιση της επιπλοκής. Οι πρωτεΐνες ως ρυθμιστές του συνόλου των βιολογικών διεργασιών του οργανισμού έχουν αναδειχθεί ως νέοι υποψήφιοι βιοδείκτες για διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Συγκρινόμενοι με τους γενετικούς δείκτες οι πρωτεωμικοί βιοδείκτες έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς απομονώνονται εύκολα και ποσοτικοποιούνται με ακρίβεια και ταχύτητα με τη χρήση ευαίσθητων και οικονομικών τεχνικών [331].

Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας διατριβής ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στο σχεδιασμό της μελέτης καθώς και τον τρόπο συλλογής και επιλογής του βιολογικού υλικού για ανάλυση ώστε διασφαλιστεί κατά το δυνατόν ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Η συλλογή των δειγμάτων για ανάλυση έγινε μετά από ενημέρωση των εγκύων για τον σκοπό της μελέτης και αφού έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση. Για την συλλογή των δειγμάτων περιφερικού αίματος εγκύων χρησιμοποιήθηκε αντιπηκτικό Potassium EDTA το οποίο προστατεύει την μεμβράνη των λευκοκυττάρων και εμποδίζει την λύση τους [332]. Η απομόνωση του πλάσματος έγινε 1-2 ώρες μετά την αιμοληψία. Το πλάσμα απομονώθηκε με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, για την πλήρη απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Λόγω της αναδρομικής φύσης της μελέτης η συλλογή των δειγμάτων περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε σε διάφορους χρόνους. Γι' αυτό και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C σε στείρες συνθήκες σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου με προσθήκη αναστολέα πρωτεασών



Σε όλες τις εγκύους τηρήθηκε αναλυτικό ιστορικό με σύστημα καταγραφής σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Μετά τον τοκετό και αφού διαπιστώθηκε κλινικά η έκβαση της κύησης και η ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, επιλέχθηκαν για ανάλυση δείγματα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό, στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης, και ισάριθμα δείγματα από εγκύους που γέννησαν τελειόμηνα νεογνά, αντίστοιχης ηλικίας και σωματικής διάπλασης (BMI) ώστε να εξασφαλιστεί μια ομοιογενής ομάδα δειγμάτων και να αποφευχθεί η εισαγωγή στη μελέτη μεταβλητών (confounders) οι οποίες θα μπορούσαν να δημιουργήσουν συστηματικά σφάλματα (bias) [331],[333]. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν δείγματα εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυο με σοβαρή συγγενή ανωμαλία ή γενετικό νόσημα καθώς και γυναίκες στις οποίες η εγκυμοσύνη είχε επιτευχθεί με εξωσωματική γονιμοποίηση ή που έκαναν χρήση φαρμακευτικής αγωγής. Προκειμένου να περιληφθούν στη μελέτη πολύ καλά χαρακτηρισμένα δείγματα τόσο ασθενών, όσο και μαρτύρων, η επιλογή των δειγμάτων για ανάλυση έγινε από επιστημονική ομάδα στην οποία συμμετείχαν Μαιευτήρες με μεγάλη εμπειρία στην εμβρυομητρική ιατρική και τον πρόωρο τοκετό.

Πριν την ανάλυση σε όλα τα δείγματα έγινε ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος και έλεγχος της καθαρότητας των δειγμάτων. Δεδομένου ότι οι βιοδείκτες που αναζητούνται είναι πρωτεΐνες χαμηλής συγκέντρωσης, ακολούθησε εμπλουτισμός των πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης με απομάκρυνση των πρωτεϊνών υψηλής αφθονίας, η παρουσία των οποίων μπορεί να εμποδίσει την μελέτη των πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης [334],[335]. Επιλέχθηκε εμπορικά διαθέσιμο kit με στήλες για την απομάκρυνση της αλβουμίνης και των ανοσοσφαιρινών οι οποίες αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 50 % των πρωτεϊνών του πλάσματος. Το σημαντικότερο πρόβλημα που έπρεπε να επιλυθεί σε αυτό το στάδιο της μελέτης ήταν η μεγιστοποίηση της απόδοσης της έκλουσης των πρωτεϊνών από τη στήλη δηλαδή η μεγιστοποίηση της ποσότητας πρωτεΐνης στο τελικό δείγμα. Προηγούμενη εμπειρία από τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας έχει δείξει ότι η έκλουση των πρωτεϊνών δεν είναι πάντοτε πλήρης και για την μεγιστοποίηση της απόδοσης απαιτούνται διαδοχικά βήματα έκλουσης με διαφορετικά διαλύματα [321]. Για το λόγο αυτό η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια και με τη χρήση διαφορετικών διαλυμάτων.

Η μελέτη των αλλαγών της έκφρασης των πρωτεϊνών στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, πραγματοποιήθηκε με μεθοδολογίες πρωτεωμικής που βασίζονται στη φασματογραφία μάζας με την ποσοτική πρωτεωμική τεχνική της επισήμανσης των πεπτιδίων με αντιδραστήρια iTRAQ σε συνδυασμό με διαδοχική φασματογραφία μάζας τύπου LC-MS/MS που αποτελούν σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία μεθόδους επιλογής για την ανίχνευση βιοδεικτών [265]. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν τη δυνατότητα να ερευνούν ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, να ανιχνεύουν ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση και να ταυτοποιούν τελικά ομάδα βιοδεικτών (panel) που παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη [336]. Σε συνδυασμό με τις εξελίξεις στον τομέα της βιοπληροφορικής οι τεχνικές φασματογραφίας μάζας διευκολύνουν την ταυτοποίηση της δομής μορίων τα οποία υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, σε πολύπλοκα δείγματα όπως το πλάσμα, χωρίς να απαιτείται προεπιλογή [336]. Για να αυξηθεί περαιτέρω η αξιοπιστία και η ευαισθησία στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και την ταυτοποίηση βιοδεικτών τέθηκαν αυστηρά όρια κανονικοποίησης και στατιστικής σημαντικότητας κατά την βιοπληροφορική ανάλυση. Επιπλέον, σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης επιβεβαιώθηκαν οι ποσοτικές διαφορές σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων, με την μέθοδο Elisa η οποία αποτελεί μέθοδο αυξημένης ευαισθησίας και αξιοπιστίας [337].

Κατά το πρώτο στάδιο της μελέτης, το διερευνητικό, με τη χρήση LC-MS/MS συζευγμένο με iTRAQ, μελετήθηκαν δείγματα πλάσματος από 5 εγκύους στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, που αργότερα γέννησαν πρόωρα, στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης, και τα αντίστοιχα δείγματα της ομάδας ελέγχου, για την ανίχνευση πρωτεϊνών με σημαντικά διαφοροποιημένο επίπεδο έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων. Δεδομένου ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι υψηλής απόδοσης (high throughput) και δίνει την δυνατότητα ανάλυσης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών μορίων που εκφράζονται σε ένα βιολογικό υλικό την συγκεκριμένη χρονική στιγμή, αυτός ο αριθμός δειγμάτων κρίνεται, σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα, ικανοποιητικός για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων [331].

Σε σύγκριση με τα δείγματα πλάσματος εγκύων του πρώτου τριμήνου που ελήφθησαν από γυναίκες που γέννησαν τελειόμηνα νεογνά, η πρωτεωμική

ανάλυση πλάσματος εγκύων που διεκπεραιώσαν τον τοκετό πρόωρα, στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης, αποκάλυψε αλλαγές στην έκφραση 142 πρωτεϊνών. Αν και καμία από αυτές τις οι αλλαγές πρωτεϊνικής έκφρασης δεν έφτασε το κριτήριο της πολύ μικρής τιμής στατιστικής σημαντικότητας  $p$  ( $p < 0,05$ ) που είχε τεθεί στη μελέτη, αντιπροσωπεύουν υποψήφιους βιοδείκτες για τον αυτόματο πρόωρο τοκετό και έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη μιας προβλεπτικής δοκιμασίας που θα βοηθήσει τους κλινικούς ιατρούς να εκτιμήσουν πρώιμα τον κίνδυνο προωρότητας, για κάθε εγκυμοσύνη. Η ανίχνευση αλλαγών στην πρωτεϊνική έκφραση στο πλάσμα εγκύων σε πρώιμο στάδιο, ήδη από το πρώτο τρίμηνο της κύησης, αποτελεί ένδειξη υπέρ της θεωρίας των πολλαπλών προσβολών (multiple hit theory), για τον παθογενετικό μηχανισμό της επιπλοκής. Οι μεταβολές δηλαδή σε πρώιμους βιοδείκτες, όπως ανιχνεύτηκαν στη παρούσα μελέτη, πιθανώς αντανακλούν την πρώτη προσβολή, η οποία δημιουργεί το έδαφος για αυτόματο πρόωρο τοκετό, ενώ οι μεταβολές σε όψιμους βιοδείκτες όπως οι ιντερλευκίνες αποτελούν την καθοριστική δεύτερη προσβολή, η οποία εκτρέπει τη διαδικασία της κύησης και οδηγεί σε αυτόματο πρόωρο τοκετό [77].

*In silico* ανάλυση έδειξε ότι οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό εμπλουτίζονται κυρίως στο σηματοδοτικό μονοπάτι της πήξης και του συμπληρώματος και επιβεβαιώνουν αποτελέσματα άλλων ερευνών που υποστηρίζουν την εμπλοκή του αιμοστατικού συστήματος και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον παθογενετικό μηχανισμό που οδηγεί στην εμφάνιση της επιπλοκής [338],[339],[340],[341]. Μεταξύ άλλων, η ομάδα των πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό, περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση της προθρομβίνης και των συστατικών Β και Η του συμπληρώματος. Η υπερέκφραση της προθρομβίνης που αποτελεί την πρόδρομη ουσία της θρομβίνης έχει συσχετιστεί με σχηματισμό θρόμβων, αυξημένη έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών (MMP), ενεργοποίηση του μυομητρίου και συσπάσεις της μήτρας που οδηγούν σε πρόωρο τοκετό [340],[341]. Όσον αφορά την αυξημένη έκφραση του παράγοντα Β του συμπληρώματος, στην αρχή της εγκυμοσύνης, σε εγκύους που στη συνέχεια γέννησαν πρόωρα, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους αντίδρασης που προκαλείται είτε από υποκλινική μικροβιακή εισβολή στην αμνιακή κοιλότητα ή είναι αποτέλεσμα απελευθέρωσης

αποπτωτικών σωματιδίων από τον πλακούντα στη μητρική κυκλοφορία τα οποία αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας [342]. Υπερέκφραση του παράγοντα Β έχει συσχετιστεί με αυτόματο πρόωρο τοκετό πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης ενώ η υπερέκφραση του παράγοντα Η του συμπληρώματος που παρατηρήθηκε στη μελέτη πιθανώς έχει σκοπό να αποτρέψει την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, καθώς η απορρύθμιση του ελέγχου μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή φλεγμονώδη αντίδραση και ιστικές βλάβες στην υποψήφια μητέρα[339],[343],[344].

Η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος στο περιφερικό αίμα εγκύων την 11<sup>η</sup> έως 13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης που αργότερα διεκπεραίωσαν τον τοκετό πρόωρα επιβεβαιώνεται και από την διαφοροποιημένη έκφραση της Ficolin-2 (L-ficolin) στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό. Η Ficolin-2 εμπλέκεται στην κάθαρση των παθογόνων και των αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων με ενεργοποίηση της οδού της λεκτίνης είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω φαγοκυττάρωσης [345]. Πριν από περισσότερο από μια δεκαετίες, οι Kilpatrick και συν., διαπίστωσαν μειωμένα επίπεδα Ficolin-2 στον ομφάλιο λώρο νεογνών σε σχέση με τους ενήλικες και σημαντική συσχέτιση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στον ομφάλιο λώρο με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό. Πρόσφατα, οι Gajek και συν. επιβεβαίωσαν το εύρημα αυτό και έδειξαν διπλάσια συχνότητα περιγεννητικών λοιμώξεων σε πρόωρα νεογνά με ανεπάρκεια της Ficolin-2 [346]. Οι Wang και συν., αναφέρουν διακυμάνσεις της έκφρασης της Ficolin-2 στο περιφερικό αίμα εγκύων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και σημαντικά μειωμένες τιμές σε κύσεις με προεκλαμψία πιθανώς ως αποτέλεσμα κατανάλωσης της πρωτεΐνης που οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων από τον αποπτωτικό πλακούντα [347]. Μέχρι σήμερα ωστόσο δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με τον ρόλο Ficolin-2 στον παθογενετικό μηχανισμό άλλων επιπλοκών της κύησης συμπεριλαμβανομένου και του αυτόματου πρόωρου τοκετού .

Εκτός από τη συμμετοχή στην ρυθμιστική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος, οι πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη έκφραση στο πλάσμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που αργότερα διεκπεραιώνουν τον τοκετό πρόωρα, έχουν ποικίλες μοριακές λειτουργίες όπως η χυμική ανοσία και η μεταφορά με τη μεσολάβηση κυστιδίων.

Στη μελέτη διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης S100-A9, γνωστής ως καλγκρανουλίνη Β, στο πλάσμα εγκύων στο πρώτο τρίμηνο των γυναικών που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για αυτόματο πρόωρο τοκετό. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει συμμετοχή της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης στον παθογενετικό μηχανισμό του αυτόματου πρόωρου τοκετού. Η πρωτεΐνη S100-A9 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της φλεγμονώδους αντίδρασης και της ανοσολογικής απάντησης με προ-φλεγμονώδη και αντι-φλεγμονώδη δράση [448],[449],[450]. Πρόσφατη μελέτη σε μονοκύτταρα ομφάλιου λώρου έδειξε ότι η υπερέκφραση της S100-A9 σχετίζεται με χοριαμνιονίτιδα και πρόωρο τοκετό [451]. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε με μελέτες mRNA του γονιδίου S100-A9 [452]. Σε εγκύους με αυτόματο πρόωρο τοκετό τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης S100-A9 στο αμνιακό υγρό και τις κολποτραχηλικές εκκρίσεις έχουν προταθεί ως διαγνωστικός δείκτης ενδοαμνιακής λοίμωξης ή και άσηπτης φλεγμονής [340],[353]. Οι Averil και συν., σε εγκύους με άσηπτη φλεγμονή ή παρουσία ιστικής βλάβης έδειξαν απελευθέρωση της S100-A9 στη μητρική κυκλοφορία η οποία δρα ως εξωκυτταρικός διαμεσολαβητής για την ενδοκυτταρική μεταγραφική ρύθμιση της επιδιόρθωσης [354]. Αντίθετα, οι Lee και συν., αναφέρουν μειωμένη έκφραση της S100-A9 στο πλάσμα εγκύων με πρόωρο τοκετό έως και είκοσι μία ημέρες μετά την αιμοληψία [341].

Η apolipoprotein C-IV (APOC4) είναι πρωτεΐνη μεταφοράς λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) και χυλομικρών. Τα επίπεδα έκφρασης της APOC4 μειώνονται τις τελευταίες εβδομάδες της εγκυμοσύνης, δεν υπάρχουν όμως προς το παρόν τουλάχιστον βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης στο περιφερικό αίμα εγκύων το πρώτο τρίμηνο της κύησης [355].

Η insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) ανήκει στο σύμπλεγμα των πλακουντιακών σωματοτροπινών (Chorionic somatomammotropin hormone 1 - CSH1) που παράγονται αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της κύησης και είναι μερικώς υπεύθυνες για την ανάπτυξη του εμβρύου, την μεταβολική προσαρμογή και την γαλουχία [356]. Η αυξημένη έκφραση της IGFBP3 που διαπιστώθηκε στη μελέτη πιθανώς σχετίζεται με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις της κύησης.

Η πρωτεωμική ανάλυση πλάσματος εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης έδειξε μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης SAA σε εγκύους υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η SAA συντίθεται στο ήπαρ, τα λευκοκύτταρα, τα λιποκύτταρα, τα αρθρικά κύτταρα, τα

καρκινικά και τα τροφοβλαστικά και αποτελεί συστατικό των αμυλοειδών θέσεων στην συστηματική αμυλοείδωση τύπου A. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο της SAA στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης, την φαγοκυττάρωση, την κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων και τον μεταβολισμό των λιπιδίων [357]. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η SAA έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του εμβρύου και την ομοιόσταση του πλακούντα. Μελέτες που στοχεύουν στην αξιολόγηση των επιδράσεων της SAA στην κυτταρική εισβολή και την διαφοροποίηση έδειξαν ότι η χορήγηση SAA μείωσε την έκφραση του bHCG και προκάλεσε εισβολή παθογόνων με τρόπο που εξαρτάται από το TLR4, υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο της SAA στον πλακούντα και την πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Με τη χρησιμοποίηση μεθόδων πρωτεωμικής διαπιστώθηκε σχεδόν υποδιπλάσια έκφραση της VCAM-1 στο πλάσμα εγκύων υψηλού κινδύνου για αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η VCAM-1, που αρχικά αναγνωρίστηκε ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης και την διαμεμβρανική μετανάστευση των λευκοκυττάρων στις θέσεις της φλεγμονής [348],[358]. Η έκφραση της VCAM-1 διεγείρεται από τις ιντερλευκίνες IL-1, IL-6, αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS) καθώς και την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και TNF- $\alpha$ . Στο πλαίσιο των επιπλοκών της κύησης έχει αναφερθεί θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της VCAM-1 στο περιφερικό αίμα εγκύων και της εμφάνισης προεκλαμψίας και υπολειπόμενης ανάπτυξης (IUGR) [349],[350],[359]. Υπάρχουν ωστόσο αντικρουόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την έκφραση της VCAM-1 στο περιφερικό αίμα εγκύων και τον πρόωρο τοκετό που πιθανώς οφείλονται σε διαφορές στην ηλικία κύησης κατά τη συλλογή των δειγμάτων για ανάλυση [348],[349]. Ενδεικτικά, Chen και συν., σε δείγματα που ελήφθησαν στις 16<sup>η</sup> και 30<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης αναφέρουν υψηλότερα επίπεδα VCAM-1 στον ορό σε γυναίκες με αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σύγκριση με εκείνες με φυσιολογική διάρκεια εγκυμοσύνης [360]. Από την άλλη, οι Docheva και συν., διαπίστωσαν μειωμένη έκφραση της VCAM-1 στο περιφερικό αίμα συμπτωματικών [349].

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης είναι η μειωμένη έκφραση της Talin-1 στο πλάσμα εγκύων με αυτόματο πρόωρο τοκετό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πρόκειται για μία μεγάλη πρωτεΐνη μεγέθους 270 kDa με 18 τομείς που εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά, το στομάχι, τον σπλήνα, τους πνεύμονες

και τους λείους μύες των αγγείων με κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και την σύνδεσή τους με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης [361]. Διαφοροποιημένη έκφραση της Talin-1 έχει αναφερθεί σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο του προστάτη, καρκίνο του μαστού, καρκίνο του ήπατος, των ωοθηκών και του ενδομητρίου. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα εμπλέκουν την Talin-1 εμπλακεί ανάπτυξη ενδομητρίωσης και την εμφύτευση του εμβρύου διευκολύνοντας την προσκόλληση των κυττάρων του ενδομητρίου [360],[362],[363]. Μελέτες σε ποντίκια με μετάλλαξη του γονιδίου Talin-1 έδειξαν ότι έμβρυα ετεροζυγώτες της παθολογικής μετάλλαξης αναπτύσσονται φυσιολογικά. Αντιθέτως τα ομοζυγωτικά ζώα δεν επιζούν αποδεικνύοντας ότι η Talin-1 είναι απαραίτητη για την εμβρυογένεση. Τα έμβρυα ομοζυγώτες της παθολογικής μετάλλαξης αναπτύσσονται φυσιολογικά κατά το στάδιο της βλαστοκύστης και εμφυτεύονται, αλλά εμφανίζουν αποδιοργανωμένους εξωεμβρυϊκούς ιστούς, ατελή σχηματισμό των κοιλοτήτων και μειωμένο εξώδερμα, σε μέγεθος και σε αριθμό κυττάρων, ενώ το εμβρυϊκό μεσόδερμα συσσωρεύεται ως μάζα στην πίσω πλευρά των εμβρύων και αποτυγχάνει να μεταναστεύσει στις εξωεμβρυϊκές περιοχές. Το θεμελιώδες έλλειμμα επομένως σε αυτά τα έμβρυα φαίνεται να είναι η αποτυχία της κυτταρικής μετανάστευσης κατά το στάδιο σχηματισμού του γαστρίδιου[364].

Κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης επιβεβαιώθηκαν, με Elisa, με στοχευμένη ποσοτική μέτρηση των πρωτεϊνών με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα χαμηλότερα επίπεδα των πρωτεϊνών VCAM-1, SAA και Talin-1 στο πλάσμα εγκύων, το πρώτο τρίμηνο της κύησης, που εμφάνισαν στη συνέχεια αυτόματο πρόωρο τοκετό στις 32<sup>0/7</sup> έως 36<sup>6/7</sup> εβδομάδες κύησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρατηρήθηκαν ωστόσο αποκλίσεις στις τιμές σημαντικότητας (*p* value) αυτών των αλλαγών με τις δύο μεθόδους που μπορούν να ερμηνευθούν από τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν με LC-MS/MS και την διαφορετική ευαισθησία που παρουσιάζουν οι δύο τεχνικές.

Σε ανεξάρτητη εκτεταμένη ομάδα δειγμάτων διαπιστώθηκε με Elisa σημαντικά μειωμένη έκφραση των VCAM1, SAA και Talin-1 ( $p \leq 0.001$ ) σε περιπτώσεις αυτόματου πρόωρου τοκετού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μετά από στατιστική ανάλυση, οι τιμές AUC που λήφθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν οι Talin-1, SAA και VCAM-1 ως μεμονωμένοι βιοδείκτες ήταν >85% σε όλες τις περιπτώσεις. Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης ανέδειξε τις δυνατότητές των

VCAM1 και Talin-1 ως υποψήφιους πρώιμους προβλεπτικούς βιοδείκτες για τον αυτόματο πρόωρο τοκετό ανεξάρτητα από γνωστούς παράγοντες κινδύνου όπως προηγούμενο αυτόματου πρόωρου τοκετού, κάπνισμα μητέρας, BMI της μητέρας πριν την εγκυμοσύνη, ηλικία της μητέρας και το φύλο του εμβρύου.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη πρωτεωμική ανάλυση πλάσματος εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, στο πλαίσιο της παγκόσμιας ερευνητικής προσπάθειας για την ταυτοποίηση βιοδεικτών πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση αυτόματου πρόωρου τοκετού.

Το κύριο πλεονέκτημα έγκειται στη χρήση μιας ευαίσθητης μεθόδου για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών που ακολουθείται από επαλήθευση των πρωτεωμικών δεδομένων με ELISA και στην ανάλυση ομοιογενούς ομάδας καλά χαρακτηρισμένων δειγμάτων που συλλέγονται και επιλέγονται από επιστήμονες με μεγάλη εμπειρία στον τομέα της μητρικής και εμβρυϊκής με τη χρήση τυποποιημένου πρωτοκόλλου. Παρ' όλο που τα ευρήματα της μελέτης παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, η ισχύς τους περιορίζεται σημαντικά από τον μικρό αριθμό εγκύων που ήταν διαθέσιμες για μελέτη, τη χρησιμοποίηση κατεψυγμένων δειγμάτων και τον σχεδιασμό ως αναδρομική μελέτη ασθενών-μαρτύρων. Για τους λόγους αυτούς πιθανώς τα ευρήματα να μην αντανακλούν τον γενικό μαιευτικό πληθυσμό. Τέλος, επισημαίνεται ότι οι υποψήφιοι βιοδείκτες που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση πολύ πρόωρου τοκετού (<32 εβδομάδες κύησης), που είναι η πιο κοινή αιτία περιγεννητικής θνησιμότητας.

Η μεγαλύτερη όμως πρόκληση είναι η ενσωμάτωση των νέων βιοδεικτών στη κλινική πράξη η οποία απαιτεί αξιολόγηση των υποψήφιων βιοδεικτών σε ευρείας κλίμακας μελέτες, σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, σε συνδυασμό με τα κλινικά και υπερηχογραφικά δεδομένα. ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά τον εντοπισμό κυήσεων υψηλού που θα βελτιώσουν τις δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης και θα προσφέρουν πρώιμο εφησυχασμό στους υποψήφιους γονείς για την πορεία και την έκβαση της κύησης



## 7.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι η τεχνολογία της πρωτεωμικής έχει την δυνατότητα να ανιχνεύσει στο περιφερικό αίμα εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, αλλαγές στη πρωτεϊνική έκφραση που συνδέονται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης αυτόματου πρόωρου τοκετού.

Η χρησιμοποίηση της τεχνολογία της πρωτεωμικής για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης στο περιφερικό αίμα εγκύων, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης οδήγησε στη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών Talin-1 και VCAM-1, ως υποψήφιους βιοδείκτες που συνδέονται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης αυτόματου πρόωρου τοκετού.

Οι βιοδείκτες αυτοί, μετά από αξιολόγηση σε ευρείας κλίμακας μελέτες, μπορούν να διευκολύνουν την κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της επιπλοκής και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων και χαμηλού κόστους προβλεπτικών δοκιμασιών που θα αλλάξουν ριζικά τον τρόπο διαχείρισης της κύησης. Αποτελούν επιπλέον πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

Οι βιοδείκτες αυτοί μπορούν να διευκολύνουν την κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της επιπλοκής και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων και χαμηλού κόστους προβλεπτικών δοκιμασιών που θα αλλάξουν ριζικά τον τρόπο διαχείρισης της κύησης. Αποτελούν επιπλέον πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

|

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8**

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Blencowe H, Cousens S, Chou D, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health* 2013;10 Suppl 1: S2.
2. WHO, March of Dimes, Partnership for Maternal, Newborn & Child Health, Save The Children. Born too soon: the global action report on preterm birth. 2012, [www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/born\\_too\\_soon/en/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/born_too_soon/en/).
3. Anonymous. WHO; recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977; 56(3): 247–53.
4. Iams JD, Creasy RK: *Preterm Labor and Delivery; Maternal-Fetal Medicine Principles and Practice* 5th ed. 2004; 623-65.
5. TA NEA (έντυπη εφημερίδα), 22 εβδομάδες το νέο όριο των πρόωρων γεννήσεων, Νοέμβριος 2018, <https://www.tanea.gr/print/2018/11/03/greece/22evdomades-to-neo-orio-ton-prooron-genni-seon>.
6. Lash FA, 1950). Engle WA: a recommendation for the definition of “late preterm” (Near Term) and the birth-weight-gestational age classification system. *Semin Perinatol*, 2006; 30:2-7. 1116.
7. WHO. 2018. Preterm birth. <http://www.who.int/en/news-room/factsheets/details/preterm-birth>.
8. Engle WA. A recommendation for the definition of "late preterm" (near-term) and the birth weight-gestational age classification system. *Semin Perinatol.* 2006 Feb;30(1):2-7. doi: 10.1053/j.semperi.2006.01.007.
9. Kramer MS, Platt R, Yang H, Joseph KS, Wen SW, Morin L, Usher RH. Secular trends in preterm birth: a hospital-based cohort study. *JAMA.* 1998 Dec 2; 280(21):1849-54.
10. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371(9606):75-84.21.
11. Kramer MS, Platt R, Yang H, Joseph KS, Wen SW, Morin L, Usher RH. Secular trends in preterm birth: a hospital-based cohort study. *JAMA.* 1998 Dec 2;280(21):1849-54.
12. Doubilet PM. Should a first trimester dating scan be routine for all pregnancies? *Semin Perinatol.* 2013 Oct; 37(5):307-9.

- 13.**Whitworth M, Bricker L, Mullan C. Ultrasound for fetal assessment in early pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Jul 14; 2015(7):CD007058.
- 14.**Lynch CD, Zhang J. The research implications of the selection of a gestational age estimation method. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007 Sep;21 Suppl 2:86-96. doi: 10.1111/j.1365-3016.2007.00865.
- 15.**Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Oct; 52:3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.04.00.
- 16.**Vogel JP, Williams M, Gallos I, Althabe F, Oladapo OT. WHO recommendations on uterotonics for postpartum haemorrhage prevention: what works, and which one? *BMJ Glob Health.* 2019 Apr 11;4(2): e001466.
- 17.**Lumley J. Birth then and now. *BMC Med.* 2008 Mar 18; 6:8. doi: 10.1186/1741-7015-6-8.
- 18.**Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG.* 2003 Apr;110 Suppl 20:30-3. doi: 10.1016/s1470-0328(03)00021-1.
- 19.**Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotcsh F, Hassan S, Erez O et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006; 113: 17-42.
- 20.**Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer BM, Iams JD, Moawad AH, Miodovnik M, Menard MK, Caritis SN, Thurnau GR, Bottoms SF, Das A, Roberts JM, McNellis D. The preterm prediction study: risk factors for indicated preterm births. Maternal-Fetal Medicine Units Network of the National Institute of Child Health and Human Development. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Mar;178(3):562-7.
- 21.**Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med.* 2010;362(6):529-35.
- 22.**Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio placentae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):313-27.
- 23.**Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014; 345(6198): 760-5.
- 24.**Morrison JJ, Rennie JM. Clinical, scientific and ethical aspects of fetal and neonatal care at extreme preterm periods of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 1341–50.
- 25.**United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UIGME). 'Levels & Trends in Child Mortality: Report. Estimates developed by the United Nations

Inter-agency Group for Child Mortality Estimation'. New York, NY: United Nations Children's Fund; 2019.

**26.**Demissie K, Rhoads GG, Ananth CV, Alexander GR, Kramer MS, Kogan MD, Joseph KS. Trends in preterm birth and neonatal mortality among blacks and whites in the United States from 1989 to 1997. *Am J Epidemiol.* 2001 Aug 15;154(4):307-15. doi: 10.1093/aje/154.4.307.

**27.**Dani C, Poggi C, Romagnoli C, Bertini G. Survival and major disability rate in infant born at 22-25 weeks of gestation. *J Perinat Med* 2009; 37:599-608.

**28.**Crump C, Sundquist J, Winkleby MA, Sundquist K. Preterm birth and risk of chronic kidney disease from childhood into mid-adulthood: national cohort study. *BMJ.*2019; 365:l1346.

**29.**Vohr BR, Heyne R, Bann C, Das A, Higgins RD, Hintz SR, et al. High Blood Pressure at Early School Age Among Extreme Preterms. *Pediatrics.* 2018;142(2).

**30.**Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, Jarvenpaa AL, Strang-Karlsson S, Makitie O, et al. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med.* 2007;356(20):2053-63.

**31.**Swamy GK, Ostbye T, Skjaerven R. Association of preterm birth with longterm survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *JAMA.* 2008;299(12):1429-36.

**32.**Katz VL, Bose CL. Improving survival of the very premature infant. *J Perinatol* 1993; 13: 261–65.

**33.**El-Metwally D, Vohr B, Tucker R. Survival and neonatal morbidity at the limits of viability in the mid 1990s: 22 to 25 weeks. *J Pediatr* 2000; 137: 616–22).

**34.**Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR. Neurological and developmental disability after extremely preterm birth. *N Engl J Med* 2000; 343: 378–84).

**35.**Veen S, Ens-Dokkum MH, Schreuder AM, Verloove-Vanhorick SP, Brand R, Ruys JH. Impairments, disabilities, and handicaps of very preterm and verylow- birthweight infants at five years of age. The Collaborative Project on Preterm and Small for Gestational Age Infants (POPS) in The Netherlands. *Lancet.* 1991 Jul 6;338(8758):33-6.

**36.**Mangham LJ, Petrou S, Doyle LW, Draper ES, Marlow N. The cost of preterm birth throughout childhood in England and Wales. *Pediatrics.* 2009 Feb;123(2):e312-27.

- 37.**Walani SR. Global burden of preterm birth. *Int J Gynaecol Obstet.* 2020 Jul;150(1):31-33.
- 38.**Ananth CV, Joseph KS, Oyelese Y, Demissie K, Vintzileos AM. Trends in preterm birth and perinatal mortality among singletons: United States, 1989 through 2000. *Obstet Gynecol.* 2005; 105(5 Pt 1): 1084-91.
- 39.**Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2004;103(3):551-63).
- 40.**Haram K, Mortensen JH, Wollen AL. Preterm delivery: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Aug; 82(8): 687-704.
- 41.**Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol.* 2017; 41(7): 387-91.
- 42.**Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller A-B, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: A systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health.* 2019; 7: e37–e46.
- 43.**Martin JA, Hoyert DL. The national fetal death file. *Semin Perinatol.* 2002 Feb; 26(1):3-11.
- 44.**Joseph KS. Ethics in clinical research: searching for absolutes. *CMAJ.* 1998 May 19;158(10):1303-5.
- 45.**Group E, Fellman V, Hellstrom-Westas L, Norman M, Westgren M, Kallen K, et al. One-year survival of extremely preterm infants after active perinatal care in Sweden. *JAMA.* 2009; 301(21): 2225-33.
- 46.**Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, et al. Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG.* 2013; 120(11): 1356-65).
- 47.**Barros FC, Papageorghiou AT, Victora CG, Noble JA, Pang R, Iams J, et al. The distribution of clinical phenotypes of preterm birth syndrome: implications for prevention. *JAMA Pediatr.* 2015; 169(3): 220-9.
- 48.**Dagklis T, Tsakiridis I, Mamopoulos A, Dardavessis T, Athanasiadis A. Modifiable risk factors for spontaneous preterm birth in nulliparous women: a prospective study. *J Perinat Med.* 2020; 48(2):96-101.
- 49.**Arias F, Romero R, Joist H, Kraus F. Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Mater Fetal Med* 1998; 7: 277-286.

- 50.**Ozbek AN, Atac BFB, Verdi BH. Relationship between small for gestational age births and maternal thrombophilic mutations. *Thromb Res* 2007; 122: 175-178.
- 51.**Holzman C, Bullen B, Fisher R, Paneth N, Reuss L and the Prematurity Study Group. Pregnancy outcomes and community health: the POUCH study of preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001; 15:136-58.
- 52.**Bertina R, Koeleman B, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.
- 53.**Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Guo-Ping Shi, Strauss, III JF. Pro-Inflammatory Cytokines Induce Expression of Matrix- Metabolizing Enzymes in Human Cervical Smooth Muscle Cells. *Am J Pathol* 1999; 154: 1755-62.
- 54.**Ferrand PE, Parry S, Sammel M, et al. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 494–501.
- 55.**Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metallo-proteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem* 2002; 277:6296–302.
- 56.**Challis JR, Hooper S. Birth: outcome of a positive cascade. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989;3(3):781-93.
- 57.**Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Oct; 52: 13-22.
- 58.**Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007 Jan; 25(1): 21-39. 34.
- 59.**Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, et al. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol*, 182:7244, 2009. 35.
- 60.**Benirschke K. Routes and types of infection in the fetus and the newborn. *AMA J Dis Child*, 99:714-721, 1960.
- 61.**Krishnan L, Nguyen T, McComb S.J *Reprod Immunol.* From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy, 97:62-73, 2013.
- 62.**Daikoku NH, Kaltreider DF, Johnson TR Jr, Johnson JW, Simmons MA. Premature rupture of membranes and preterm labor: neonatal infection and perinatal mortality risks. *Obstet Gynecol*, 58:417-25, 1981.

- 63.** Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med*, 17:12-19, 2012.
- 64.** Menon R, Velez DR, Morgan N, et al. Genetic regulation of amniotic fluid TNF-alpha and soluble TNF receptor concentrations affected by race and preterm birth. *Hum Genet*, 124:243, 2008.
- 65.** Pierce BT, Pierce LM, Wagner RK, Apodaca CC, Hume RF, Jr., Nielsen PE, et al. Hypoperfusion causes increased production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in the isolated, dually perfused placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183 (4):863-7.
- 66.** O'Sullivan CJ, Allen NM, O'Loughlin AJ, et al. Thrombin and PAR1-activating peptide: effects on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 190:1098, 2004.
- 67.** Elovitz MA, Baron J, Phillippe M. The role of thrombin in preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 185:1059, 2001.
- 68.** Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta*. 2006;27(11-12):1037-51.
- 69.** Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*, 342:1500-1507, 2000) (Goldenberg RL, Culhane JF. Infection as a cause of preterm birth. *Clin Perinatol*, 30:677-700, 2003.
- 70.** Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, Gomez R, Romero R, Cassell GH. Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 173:606-12, 1995.
- 71.** Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 22:423, 2009.
- 72.** Hoang M, Potter JA, Gysler SM, Han CS, Guller S, Norwitz ER, Abrahams VM. Human fetal membranes generate distinct cytokine profiles in response to bacterial Toll-like receptor and nod-like receptor agonists. *Biol Reprod*. 2014 Feb 27;90(2):39.
- 73.** Wang B, Koga K, Osuga Y, Cardenas I, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Mor G, Taketani Y. Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology*. 2011 Dec; 152(12):4984-92.



- 74.** Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 371:75-84, 2008.
- 75.** Jakobsson M, Gissler M, Paavonen J, Tapper AM. Loop electrosurgical excision procedure and the risk for preterm birth. *Obstet Gynecol*, 114:504, 2009.
- 76.** Di Renzo GC, Giardina I, Rosati A, Clerici G, Torricelli M, Petraglia F; Italian Preterm Network Study Group. Maternal risk factors for preterm birth: a country-based population analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Dec; 159(2):342-6.
- 77.** Fasoulakis Z, Koutras A, Ntounis T, Antsaklis P, Theodora M, Valsamaki A, Daskalakis G, Kontomanolis EN. Inflammatory Molecules Responsible for Length Shortening and Preterm Birth. *Cells*. 2023 Jan 4; 12(2):209.
- 78.** Lima SAM, El Dib RP, Rodrigues MRK, Ferraz GAR, Molina AC, Neto CAP, et al. Is the risk of low birth weight or preterm labor greater when maternal stress is experienced during pregnancy? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *PLoS One*. 2018; 13(7): e0200594.
- 79.** Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR. Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(5): 1585-91.
- 80.** Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Buchwalder LF, Ocak N, Guzel E, et al. Enhanced Human Decidual Cell-Expressed FKBP51 May Promote Labor-Related Functional Progesterone Withdrawal. *Am J Pathol*. 2015;185(9):2402-11.
- 81.** Jones SA, Challis JR. Effects of corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin on prostaglandin output by human placenta and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest*. 1990;29(3):165-8.
- 82.** Chakravorty A, Mesiano S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(10): 3732-8.
- 83.** Tilburgs T, Scherjon SA, Claas FH. Major histocompatibility complex (MHC)-mediated immune regulation of decidual leukocytes at the fetal-maternal interface. *J Reprod Immunol*, 85:58, 2010.
- 84.** Petroff MG, Hunt JS. Immunity at the maternal-fetal interface. In: *Mucosal immunology*, 3rd ed, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, et al (Eds), Academic Press, New York, p.1735, 2005.
- 85.** Shekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 471-495.

- 86.**Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, et al. Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 85: 40, 2010. 67.
- 87.**Lila N, Carpentier A, Amrein C, et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet*, 355: 2138, 2000.
- 88.**Sooranna SR, Engineer N, Loudon JA, Terzidou V, Bennett PR, Johnson MR. The mitogen-activated protein kinase dependent expression of prostaglandin H synthase-2 and interleukin-8 messenger ribonucleic acid by myometrial cells: the differential effect of stretch and interleukin-1{beta}. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3517-27.
- 89.**Maradny EE, Kanayama N, Halim A, Maehara K, Terao T. Stretching of fetal membranes increases the concentration of interleukin-8 and collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174(3): 843-9.
- 90.**Mahendroo M. Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model. *Reproduction*. 2012; 143(4): 429-38.
- 91.**Quezada MS, Francisco C, Dumitrascu-Biris D, Nicolaides KH, Poon LC. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jan 45(1):101-5.
- 92.**Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16; 350(9076): 485-7.
- 93.**Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, Dziegiel MH, Tabor A. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn* 2012; 32(9): 840e5.
- 94.**Zhang J, Shynlova O, Sabra S, Bang A, Briollais L, Lye SJ. Immunophenotyping and activation status of maternal peripheral blood leukocytes during pregnancy and labour, both term and preterm. *J Cell Mol Med* 2017; 21(10):2386e402.
- 95.**Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 2007;(8):772e9.
- 96.**Herrera CA, Storker J, Carlquist J, Stoddard GJ, Jackson M, Esplin S, et al. Cell-free DNA, inflammation, and the initiation of spontaneous term labor. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217(5):91-98.
- 97.**Esplin MS, O'Brien E, Fraser A, Kerber RA, Clark E, Simonsen SE, Holmgren C, Mineau GP, Varner MW. Estimating recurrence of spontaneous preterm delivery.

Obstet Gynecol. 2008 Sep;112(3):516-23. 98. Bhattacharya S, Raja EA, Mirazo ER, et al. Inherited predisposition to spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol*, 115:1125, 2010.

**98.** Kazemier BM, Buijs PE, Mignini L, Limpens J, de Groot CJ. Impact of obstetric history on the risk of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies: a systematic review. *BJOG*. 2014 Sep;121(10):1197-208.

**99.** Iams JD, Berghella V. Care for women with prior preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 203:89–100.

**100.** Hsieh TT, Chen SF, Shau WY, Hsieh CC, Hsu JJ, Hung TH. The impact of interpregnancy interval and previous preterm birth on the subsequent risk of preterm birth. *J Soc Gynecol Investig*, 12:202-207, 2005.

**101.** Schaaf JM, Hof MH, Mol BW, et al. Recurrence risk of preterm birth in subsequent twin pregnancy after preterm singleton delivery. *BJOG*, 119: 1624, 2012).

**102.** Smith GC, Pell JP, Dobbie R. Interpregnancy interval and risk of preterm birth and neonatal death: retrospective cohort study. *BMJ* 2003; 327: 313.

**103.** Cortes Castell E, Rizo-Baeza MM, Aguilar Cordero MJ, Rizo-Baeza J, Gil Guillén V. Maternal age as risk factor of prematurity in Spain; Mediterranean area. *Nutr Hosp*, 28:1536-40, 2013.

**104.** Malaquias JB, Ramalho FS, Omoto C, Godoy WA, Silveira RF. Imidacloprid affects the functional response of predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) to strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on Bt cotton. *Ecotoxicology*, 19:2013.

**105.** Fraser AM, Brockert JE, Ward RH. Association of young maternal age with adverse reproductive outcomes. *N Engl J Med* 1995; 332: 1113–17.

**106.** Smith GC, Pell JP. Teenage pregnancy and risk of adverse perinatal outcomes associated with first and second births: population based retrospective cohort study. *BMJ* 2001; 323: 476–80.

**107.** Dagklis T, Papazisis G, Tsakiridis I, Chouliara F, Mamopoulos A, Rousso D. Prevalence of antenatal depression and associated factors among pregnant women hospitalized in a high-risk pregnancy unit in Greece. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2016;51(7):1025-31.

**108.** Fiscella K. Race, perinatal outcome, and amniotic infection. *Obstet Gynecol Surv*. 1996; 51(1): 60-6. 107.

- 109.** Collins JW, Jr., Hawkes EK. Racial differences in post-neonatal mortality in Chicago: what risk factors explain the black infant's disadvantage? *Ethn Health*. 1997;2(1-2):117-25. 108.
- 110.** Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 Jan 5; 371(9606): 75-84.
- 111.** Goldenberg RL, Cliver SP, Mulvihill FX, et al. Medical, psychosocial and behavioral risk factors do not explain the increased risk for low birth weight among black women. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:1317-24.
- 112.** Srinivasjois RM, Shah S, Shah PS, Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm LBWB. Biracial couples and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analyses. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012; 91(10): 1134- 46.
- 113.** Shapiro-Mendoza CK, Barfield WD, Henderson Z, James A, Howse JL, Iskander J, et al. CDC Grand Rounds: Public Health Strategies to Prevent Preterm Birth. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65(32):826-30. 113.
- 114.** Rubens CE, Sadovsky Y, Muglia L, Gravett MG, Lackritz E, Gravett C. Prevention of preterm birth: Harnessing science to address the global epidemic. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 262sr5.
- 115.** Siega-Riz AM, Adair LS, Hobel CJ. Maternal underweight status and inadequate rate of weight gain during the third trimester of pregnancy increases the risk of preterm delivery. *J Nutr*. 1996 Jan; 126(1):146-53.
- 116.** Cnattingius S, Villamor E, Johansson S, et al. Maternal obesity and risk of preterm delivery. *JAMA*. 2013; 309: 2362–2370.
- 117.** Ferrero DM, Larson J, Jacobsson B, et al. Cross-country individual participant analysis of 4.1 million singleton births in 5 countries with very high human development index confirms known associations but provides no biologic explanation for 2/3 of all preterm births. *PLoS ONE*. 2016;11: e0162506.
- 118.** Englund-Ogge L, Brantsaeter AL, Sengpiel V, Haugen M, Birgisdottir BE, Myhre R, et al. Maternal dietary patterns and preterm delivery: results from a large prospective cohort study. *BMJ*. 2014; 348: g1446.
- 119.** Olsen SF, Secher NJ. Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ*, 324:447, 2002.
- 120.** Maisonneuve E. Lifestyle recommendations for prevention of spontaneous preterm birth in asymptomatic pregnant women. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2016; 45:1231–1246.

- 121.** Shiono PH, Klebanoff MA, Rhoads GG. Smoking and drinking during pregnancy. Their effects on preterm birth. *JAMA*. 1986 Jan 3;255(1):82-4.
- 122.** Moore E, Blatt K, Chen A, et al. Relationship of trimester-specific smoking patterns and risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215: 109.e1–109.e6.
- 123.** McCowan LM, Dekker GA, Chan E, Stewart A, Chappell LC, Hunter M, Moss Morris R, North RA; SCOPE consortium. Spontaneous preterm birth and small for gestational age infants in women who stop smoking early in pregnancy: prospective cohort study. *BMJ*, 26; 338: b1081., 2009. 102.
- 124.** Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *Lancet*. 2002 Nov 9;360(9344):1489-97. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11476-0.
- 125.** Little BB, Snell LM, Klein VR, Gilstrap LC 3rd, Knoll KA, Breckenridge JD. Maternal and fetal effects of heroin addiction during pregnancy. *J Reprod Med*, 35:159-62, 1990.
- 126.** Pompeii LA, Savitz DA, Evenson KR, Rogers B, McMahan M. Physical exertion at work and the risk of preterm delivery and small-for-gestational-age birth. *Obstet Gynecol*. 2005; 106:1279–1288.
- 127.** Mozurkewich EL, Luke B, Avni M, Wolf FM. Working conditions and adverse pregnancy outcome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 95:623-35, 2000.
- 128.** Di Mascio D, Magro-Malosso ER, Saccone G, Marhefka GD, Berghella V. Exercise during pregnancy in normal-weight women and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Nov;215(5):561-571.
- 129.** Faraji J, Soltanpour N, Lotfi H, Moeeni R, Moharreri AR, Roudaki S et al (2017) Lack of social support raises stress vulnerability in rats with a history of ancestral stress. *Sci Rep* 7(1): 5277).
- 130.** ACOG Practice Bulletin No. 201: Pregestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol*. 2018; 132(6): e228-e48.
- 131.** Zeitlin J, Saurel-Cubizolles MJ, De Mouzon J, Rivera L, Ancel PY, Blondel B, et al. Fetal sex and preterm birth: are males at greater risk? *Hum Reprod*. 2002;17(10):2762-8.
- 132.** Whitworth M, Quenby S, Cockerill RO, Dowswell T. Specialised antenatal clinics for women with a pregnancy at high risk of preterm birth (excluding multiple pregnancy) to improve maternal and infant outcomes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(9): CD006760).

- 133.** Joseph KS, Marcoux S, Ohlsson A, Kramer MS, Allen AC, Liu S, Wu Wen S, Demissie K, Sauve R, Liston R; Fetal and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. Preterm birth, stillbirth and infant mortality among triplet births in Canada, 1985 -96. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 16:141-148, 2002.
- 134.** Wisborg K, Ingerslev HJ, Henriksen TB. In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil Steril*. 2010; 94(6): 2102-6.
- 135.** Elovitz MA, Gajer P, Riis V, Brown AG, Humphrys MS, Holm JB, Ravel J. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nat Commun*. 2019 Mar 21;10(1):1305.
- 136.** Daskalakis G, Psarris A, Koutras A, Fasoulakis Z, Prokopakis I, Varthaliti A, Karasmani C, Ntounis T, Domali E, Theodora M, Antsaklis P, Pappa KI, Papapanagiotou A. Maternal Infection and Preterm Birth: From Molecular Basis to Clinical Implications. *Children (Basel)*. 2023 May 22;10(5):907.
- 137.** McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, 192:1325, 2005.
- 138.** Woelfer B, Salim R, Banerjee S, Elson J, Regan L, Jurkovic D. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies detected by three-dimensional ultrasound screening. *Obstet Gynecol*. 2001 Dec;98(6):1099-103.
- 139.** Romero R, Espinoza J, Erez O. The role of cervical cerclage in obstetric practice: can the patient who could benefit from this procedure be identified? *Am J Obstet Gynecol* 2008; 194: 1-9.
- 140.** Madinger NE, Greenspoon JS, Ellrodt AG. Pneumonia during pregnancy: has a modern technology improved maternal and fetal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 657-662.
- 141.** Ebersole JL, Holt SC, Cappeli D. Periodontitis in pregnant baboons; a systemic inflammation and adaptive immune responses and pregnancy outcomes in a baboon model. *J Periodontal Res* 2013; 28: 10,1111/12099.
- 142.** Sanz M, Kornman K, Working group 3 of joint EFPAAPw. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*. 2013; 40 Suppl 14: S164-9.
- 143.** Dayan J, Creveuil C, Marks MN, et al. Prenatal depression, prenatal anxiety, and spontaneous preterm birth: a prospective cohort study among women with early and regular care. *Psychosom Med*, 2006; 68: 938–46.

- 144.** Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*.2011;118(5):533–549.
- 145.** Wagner J, Kerry-Barnard S, Sadiq ST, Oakeshott P. Research benefits of storing genitourinary samples: 16S rRNA sequencing to evaluate vaginal bacterial communities. *Int J STD AIDS*. 2017; 28:315–317.
- 146.** Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000. 342: 1500–07.
- 147.** Nygren P, Fu R, Freeman M, Bougatsos C, Klebanoff M, Guise JM; U.S. Evidence on the benefits and harms of screening and treating pregnant women who are asymptomatic for bacterial vaginosis: an update review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Preventive Services Task Force*.*Ann Intern Med*. 2008 Feb 5; 148(3):220-33.
- 148.** Clausson B, Lichtenstein P, Cnattingius S. Genetic influence on birthweight and gestational length determined by studies in offspring of twins. *BJOG* 2000; 107:375–81. 25.
- 149.** Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *BJOG* 2005;112: 28–31.
- 150.** Chang HH, Larson J, Blencowe H, et al. Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *Lancet* 2013; 381:223-34.
- 151.** Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaides KH. Progesterone and the risk of pre-term birth among women with a short cervix. *N Engl J Med* 2007;357: 462–9.
- 152.** Amory JH, Adams KM, Lin MT, Hansen JA, Eschenbach DA, Hitti J. Adverse outcomes after preterm labor are associated with tumor necrosis factor-alpha polymorphism -863, but not-308, in mother-infanecrosis factor-alpha polymorphism - 863, but not -308, in mother-infant pairs. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1362-7.
- 153.** Roberts AK, Monzon-Barbonaba F, Van Deerlin PG, et al. Association of polymorphism with the promoter of the tumor necrosis factor a gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:1297–302.
- 154.** Menon R, Velez DR, Thorsen P, et al. Ethnic characterization of candidate genes for spontaneous preterm delivery: TNF-alpha and receptors. *Hum Hered* 2006; 62:107-18.

- 155.** Velez DR, Fortunato S, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1619–30.
- 156.** Bessler H, Osovsky M, Sirota L. Association between IL-1ra gene polymorphism and preterm birth. *Biol Neonate* 2004; 85:179-83.
- 157.** Holzman C, Bullen B, Fisher R, Paneth N, Reuss L and the Prematurity Study Group. Pregnancy outcomes and community health: the POUCH study of preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001; 15:136-58.
- 158.** Hartel Ch, Finas D, Ahrens P. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery *Mol Hum Reprod* 2004; 10:911-5.
- 159.** Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Kontomanolis EN, Maltezos E. Association of -634G/C and 936C/T polymorphisms of the vascular endothelial growth factor with spontaneous preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83:461-5.
- 160.** Landau R, Xie HG, Dishy V, et al. Beta2-Adrenergic receptor genotype and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1294-8.
- 161.** Landau R, Xie HG, Dishy V, et al. Beta2-Adrenergic receptor genotype and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1294-8. 125.
- 162.** Doh K, Sziller I, Vardhana S, Kovacs E, Papp Z, Witkin SS. Beta2- adrenergic receptor gene polymorphisms and pregnancy outcome. *J Perinat Med* 2004; 32:413-7. 126.
- 163.** Ozkur M, Dogulu F, Ozkur A, Gokmen B, Inaloz SS, Aynaciaoglu A. Association of the Gln27Glu polymorphism of the beta-2-adrenergic receptor with preterm labor. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77:209-15.
- 164.** Zhang G, Feenstra B, Bacelis J ET AL. Genetic Associations with Gestational Duration and Spontaneous Preterm Birth. *N Engl J Med*. 2017 Sep 21;377(12):1156-1167.
- 165.** Gyory I, Boller S, Nechanitzky R, et al. Transcription factor Ebf1 regulates differentiation stage-specific signaling, proliferation, and survival of B cells. *Genes Dev* 2012; 26: 668-82.
- 166.** Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; 478: 103-9.



- 167.** Wain LV, Verwoert GC, O'Reilly PF, et al. Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nat Genet* 2011; 43: 1005-11.
- 168.** Xie G, Myint PK, Voora D, et al. Genome-wide association study on progression of carotid artery intima media thickness over 10 years in a Chinese cohort. *Atherosclerosis* 2015; 243: 30.
- 169.** Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 2014; 94: 739-77.
- 170.** Burnum KE, Hirota Y, Baker ES, et al. Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua. *Endocrinology* 2012; 153: 4568-79.
- 171.** Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010; 362: 529.
- 172.** Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural SH, Strauss JF 3rd. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1504-8.
- 173.** Nukui T, Day RD, Sims CS, Ness RB, Romkes M. Maternal/newborn GSTT1 null genotype contributes to risk of preterm, low birthweight infants. *Pharmacogenetics* 2004; 14:569-76. 174.
- 174.** Prevalence of iron deficiency in France and southern Europe. Dhur A, Herberg S. *Bibl Nutr Dieta*. 1989;(44):106-13.
- 175.** Bodnar LM, Pugh SJ, Abrams B, Himes KP, Hutcheon JA. Gestational weight gain in twin pregnancies and maternal and child health: a systematic review. *J Perinatol*. 2014 Apr;34(4):252-63.
- 176.** Himes KP, Bodnar LM. Validation of criteria to identify severe maternal morbidity. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2020 Jul;34(4):408-415.
- 177.** Joubert BR et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):680-96.
- 178.** Burris HH, Baccarelli AA, Motta V, Byun HM, Just AC, Mercado-Garcia A, Schwartz J, Svensson K, Téllez-Rojo MM, Wright RO. Association between length of gestation and cervical DNA methylation of PTGER2 and LINE 1-HS. *Epigenetics*. 2014 Aug;9(8):1083-91.

- 179.** Wang H, Lou D, Wang Z. Crosstalk of Genetic Variants, Allele-Specific DNA Methylation, and Environmental Factors for Complex Disease Risk. *Front Genet.* 2019 Jan 9; 9:695.
- 180.** Glover AV, Manuck TA. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018 Apr;23(2):126-132.
- 181.** Daskalakis G, Goya M, Pergialiotis V, Cabero L, Kyvernitakis I, Antsaklis A, Arabin B. Prevention of spontaneous preterm birth. *Arch Gynecol Obstet.* 2019 May;299(5):1261-1273.
- 182.** Hoffman MK, Goudar SS, Kodkany BS, Metgud M, Somannavar M, Okitawutshu J, et al. Low-dose aspirin for the prevention of preterm delivery in nulliparous women with a singleton pregnancy (ASPIRIN): a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2020;395(10220):285-93.
- 183.** Banos N, Murillo-Bravo C, Julia C, et al. Mid-trimester sonographic cervical consistency index to predict spontaneous preterm birth in a low-risk population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017 3 31.
- 184.** Farras Llobet A, Regincos Marti L, Higuera T, et al. The uterocervical angle and its relationship with preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017:1–11.
- 185.** Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E719e30.
- 186.** Owen J, Hankins G, Iams JD, et al. Multicenter randomized trial of cerclage for preterm birth prevention in high-risk women with shortened midtrimester cervical length. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 375. e1–8.
- 187.** Newnham JP, White SW, Meharry S, et al. Reducing preterm birth by a statewide multifaceted program: an implementation study. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 216: 434–42.
- 188.** Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, et al. Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 38:18–31.
- 189.** Wu W, Clark EA, Stoddard GJ, et al. Effect of interleukin-6 polymorphism on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. *BMC Genet* 2013; 14:30.

- 190.** Blackwell SC, Gyamfi-Bannerman C, Biggio JR Jr et al. 17-OHPC to Prevent Recurrent Preterm Birth in Singleton Gestations (PROLONG Study): A Multicenter, International, Randomized Double-Blind Trial. *Am J Perinatol.* 2020 Jan; 37(2): 127-136.
- 191.** Arabin B, Halbesma JR, Vork F, Hubener M, van Eyck J. Is treatment with vaginal pessaries an option in patients with a sonographically detected short cervix? *J Perinat Med.* 2003;31(2):122-33.
- 192.** Saccone G, Maruotti GM, Giudicepietro A, Martinelli P, Italian Preterm Birth Prevention Working G. Effect of Cervical Pessary on Spontaneous Preterm Birth in Women with Singleton Pregnancies and Short Cervical Length: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;318(23):2317-24. 244.
- 193.** Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Picciarelli G, Tul N, Zamprakou A, et al. A Randomized Trial of a Cervical Pessary to Prevent Preterm Singleton Birth. *N Engl J Med.* 2016; 374(11): 1044-52.
- 194.** Esplin MS, Manuck TA, Varner MW, et al. Cluster analysis of spontaneous preterm birth phenotypes identifies potential associations among preterm birth mechanisms. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:429.
- 195.** Parra-Saavedra M, Gomez L, Barrero A, Parra G, Vergara F, Navarro E. Prediction of preterm birth using the cervical consistency index. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 38:44–51.
- 196.** Morken NH, Kallen K, Jacobsson B. Predicting risk of spontaneous preterm delivery in women with a singleton pregnancy. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2014; 28:11–22.
- 197.** Meertens LJE, van Montfort P, Scheepers HCJ, van Kuijk SMJ, Aardenburg R, Langenveld J, et al. Prediction models for the risk of spontaneous preterm birth based on maternal characteristics: a systematic review and independent external validation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018.
- 198.** Beta J, Akolekar R, Ventura W, Syngelaki A, Nicolaides KH. Prediction of spontaneous preterm delivery from maternal factors, obstetric history and placental perfusion and function at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011 Jan; 31(1): 75-83.
- 199.** Honest H, Bachmann LM, Sundaram R, Gupta JK, Kleijnen J, Khan KS. The accuracy of risk scores in predicting preterm birth - A systematic review. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2004; 24: 343–359.

- 200.** Germain AM, Carvajal J, Sanchez M, Valenzuela GJ, Tsunekawa H, Chuaqui B. 1999. Preterm labor: placental pathology and clinical correlation. *Obstet Gynecol* 94:284–289.
- 201.** Agarwal N, Suneja A, Arora S, Tandon OP, Sircar S. 2004. Role of uterine artery velocimetry using color-flow Doppler and electromyography of uterus in prediction of preterm labor. *J Obstet Gynecol Res* 30: 402–408.
- 202.** Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F. 2007. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol* 109: 1316–1324.
- 203.** Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. 2002. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1762–1767.
- 204.** Tul N, Pusenjak S, Osredkar J, Spencer K, Novak-Antolic Z. 2003. Predicting complications of pregnancy with first-trimester maternal serum free-beta HCG, PAPP-A and inhibin-A. *Prenat Diagn* 23: 990–996.
- 205.** Spencer K, Cowans NJ, Molina F, Kagan KO, Nicolaides KH. 2008. First trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 147–152.
- 206.** Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. 2005. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat Diagn* 25:949–953.
- 207.** Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2010; 116:393–401.
- 208.** Kunze M, Klar M, Morfeld CA, et al. Cytokines in noninvasively obtained amniotic fluid as predictors of fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215(96): e1-e8.
- 209.** Martinez-Portilla RJ, Hawkins-Villarreal A, Alvarez-Ponce P, et al. Maternal serum interleukin-6: A non-invasive predictor of histological chorioamnionitis in women with preterm-prelabor rupture of membranes. *Fetal Diagn Ther*. 2018.
- 210.** Thomakos N, Daskalakis G, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha at mid-

trimester genetic amniocentesis: relationship to intra-amniotic microbial invasion and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Feb; 148(2): 147-51.

**211.** Saade GR, Boggess KA, Sullivan SA, et al. Development and validation of a spontaneous preterm delivery predictor in asymptomatic women. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214:633. e1–24.

**212.** Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal D, Shah KD, Thung SN, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med* 1991; 325:669-674 (Level II-2)

**213.** Goldenberg RL, Thom E, Moawad AH, Johnson F, Roberts J, Caritis SN. The preterm prediction study: fetal fibronectin, bacterial vaginosis, and peripartum infection. NICHD Maternal Fetal Medicine Units Network. *Obstet Gynecol* 1996; 87:656-660.

**214.** Bastek JA, Elovitz MA. The role and challenges of biomarkers in spontaneous preterm birth and preeclampsia. *Fertil Steril* 2013; 99:1117-23.

**215.** Hezelgrave NL, Abbott DS, Radford SK, Seed PT, Girling JC, Filmer J, et al. Quantitative Fetal Fibronectin at 18 Weeks of Gestation to Predict Preterm Birth in Asymptomatic High-Risk Women. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(2): 255-63. 264.

**216.** Esplin MS, Elovitz MA, Iams JD, et al. Predictive accuracy of serial transvaginal cervical lengths and quantitative vaginal fetal fibronectin levels for spontaneous preterm birth among nulliparous women. *JAMA* 2017; 317:1047–56.

**217.** Berghella V, Hayes E, Visintine J, Baxter JK. Fetal fibronectin testing for reducing the risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8;2008(4): CD006843.

**218.** Goldenberg RL, Klebanoff M, Carey JC, et al. Vaginal fetal fibronectin measurements from 8 to 22 weeks' gestation and subsequent spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:469–75.

**219.** Conde-Agudelo A, Papageorghiou AT, Kennedy SH, Villar J. Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *Br J Obstet Gynecol* 2011; 118:1042–54.

**220.** McLaren JS, Hezelgrave NL, Ayubi H, Seed PT, Shennan AH. Prediction of spontaneous preterm birth using quantitative fetal fibronectin after recent sexual intercourse. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Jan; 212(1):89. e1-5.44.

**221.** Nikolova T, Bayev O, Nikolova N, Di Renzo GC. Comparison of a novel test for placental alpha microglobulin-1 with fetal fibronectin and cervical length

measurement for the prediction of imminent spontaneous preterm delivery in patients with threatened preterm labor. *J Perinat Med.* 2015; 43:395-40250.

**222.** Nikolova T, Uotila J, Nikolova N, Bolotskikh V, Borisova V, Di Renzo GC. Prediction of spontaneous preterm delivery in women presenting with premature labor: A comparison of placenta alpha microglobulin-1, phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 and cervical length. *Am J Obstet Gynecol.* 2018; 219:610, e1-610.e951.

**223.** Werlen S, Raia T, Di Bartolomeo A, Chauleur C. Preterm labor: Reproducibility of detection test of PAMG-1 before and after digital examination, and transvaginal ultrasound cervical length. *Gynecol Obstet Fertil.* 2015; 43:640–645].

**224.** Salomon LJ, Diaz-Garcia C, Bernard JP, Ville Y. Reference range for cervical length throughout pregnancy: non-parametric LMS-based model applied to a large sample. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Apr;33(4):459-64.

**225.** Heath VC, Southall TR, Souka AP, Novakov A, Nicolaides KH. Cervical length at 23 weeks of gestation: relation to demographic characteristics and previous obstetric history. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12: 304–311.

**226.** To MS, Skentou C, Cicero S, Nicolaides KH. Cervical assessment at the routine 23-weeks' scan: problems with transabdominal sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 15:292-109.

**227.** ΕΜΓΕ, Κατευθυντήρια Οδηγία Νο 53 Ιούλιος 2021.

**228.** Coutinho CM, Sotiriadis A, Odibo A, Khalil A, D'Antonio F, Feltovich H, Salomon LJ, Sheehan P, Napolitano R, Berghella V, da Silva Costa F. ISUOG Practice Guidelines: role of ultrasound in the prediction of spontaneous preterm birth. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022 Sep; 60(3):435-456.

**229.** Son M, Grobman WA, Ayala NK, Miller ES. A universal mid-trimester transvaginal cervical length screening program and its associated reduced preterm birth rate. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: 365. e1-5.

**230.** Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Electronic address: pubs@smfm, McIntosh J, Feltovich H, Berghella V, Manuck T. The role of routine cervical length screening in selected high- and low-risk women for preterm birth prevention. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: B2–B7.

**231.** Di Renzo GC, Gratacos E, Kurtser M, Malone F, Nambiar S, Sierra N, Yang H, Fuchtnner C, Berghella V, Castelazo Morales E, Hanson M, Hod M, Ville Y, Visser G, Simpson JL, Adra A, Bataeva R, Chmait RH, Cheng Y, Hyett J, Giardina I, Morrison J,

Nazareth A, Poon CYL, Quintero R, Sepulveda W, Tosto V. Good clinical practice advice: Prediction of preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2019; 144: 340–346.

**232.** Berghella V, Palacio M, Ness A, Alfirevic Z, Nicolaides KH, Saccone G. Cervical length screening for prevention of preterm birth in singleton pregnancy with threatened preterm labor: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials using individual patient-level data. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49: 322–329.

**233.** Berghella V, Saccone G. Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm από delivery. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 9: CD007235129.

**234.** Alfirevic Z, Allen-Coward H, Molina F, Vinuesa CP, Nicolaides K. Targeted therapy for threatened preterm labor based on sonographic measurement of the cervical length: a randomized controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 29(1): 47-50.

**235.** Palacio M, Caradeux J, Sanchez M, Cobo T, Figueras F, Coll O, Gratacós E, Cararach V. Uterine Cervical Length Measurement to Reduce Length of Stay in Patients Admitted for Threatened Preterm Labor: A Randomized Trial. *Fetal Diagn Ther* 2018; 43:184–190.

**236.** Hirsch L, Yogev Y, Domniz N, Meizner I, Bardin R, Melamed N. The role of cervical length in women with threatened preterm labor: Is it a valid predictor at any gestational age? *Am J Obstet Gynecol* 2014; 211: 532.e1-9.

**237.** Grimes-Dennis J, Berghella V. Cervical length and prediction of preterm delivery. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19: 191–195.

**238.** Berghella V, Roman A, Daskalakis C, Ness A, Baxter JK. Gestational age at cervical length measurement and incidence of preterm birth. *Obstet Gynecol* 2007; 110:311–317.

**239.** Guzman ER, Walters C, O'reilly-Green C, et al. Use of cervical ultrasonography in prediction of spontaneous preterm birth in triplet gestations. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1108.

**240.** Cahill AG, Odibo AO, Caughey AB, Stamilio DM, Hassan SS, Macones GA, Romero R. Universal cervical length screening and treatment with vaginal progesterone to prevent preterm birth: a decision and economic analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 548.e1-8.

- 241.** Einerson BD, Grobman WA, Miller ES. Cost-effectiveness of risk-based screening for cervical length to prevent preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: 100.e1-7.
- 242.** Crosby DA, Miletin J, Semberova J, Daly S. Is routine transvaginal cervical length measurement cost-effective in a population where the risk of spontaneous preterm birth is low? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2016; 95: 1391–1395.
- 243.** Bloom SL, Leveno KJ. Unproven technologies in maternal-fetal medicine and the high cost of US health care. *JAMA* 2017; 317: 1025–1026.
- 244.** Newnham JP, White SW, Meharry S, Lee HS, Pedretti MK, Arrese CA, Keelan JA, Kemp MW, Dickinson JE, Doherty DA. Reducing preterm birth by a statewide multifaceted program: an implementation study. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 216: 434-442.
- 245.** Antsaklis P, Daskalakis G, Pilalis A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. The role of cervical length measurement at 11-14 weeks for the prediction of preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Mar;24(3):465-70.
- 246.** Parra-Cordero M, Sepúlveda-Martínez A, Rencoret G, Valdés E, Pedraza D, Muñoz H. Is there a role for cervical assessment and uterine artery Doppler in the first trimester of pregnancy as a screening test for spontaneous preterm delivery? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014 Mar;43(3):291-6.
- 247.** Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:311-23. doi: 10.1038/ng1106.
- 248.** Fan Y., Wang J., Yang Y., Liu Q., Fan Y., Yu J., Zheng S., Li M., Wang J. (2010). Detection and identification of potential biomarkers of breast cancer. *Journal of cancer research and Clinical Oncology*, 136: 1243-1254.
- 249.** Anagnostopoulos AK, Tsangaris GT. Proteomics advancements in fetomaternal medicine. *Clin Biochem.* 2013 Apr;46(6):487-96.
- 250.** Ahlf DR, Thomas PM, Kelleher NL. Developing top-down proteomics to maximize proteome and sequence coverage from cells and tissues. *Curr Opin Chem Biol.* 2013 Oct;17(5):787-94.
- 251.** Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL (2014) Top-Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* 445:683–693.
- 252.** Boersema et al., 2008, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2008 May;391(1):151-9. doi: 10.1007/s00216-008-1865-7.



- 253.** O'Farrell PH. The pre-omics era: the early days of two-dimensional gels. *Proteomics*. 2008; 8: 4842-4852.
- 254.** Kondo T and Hirohashi S. Application of 2D-DIGE in cancer proteomics toward personalized medicine. *Methods in Molecular Biology*, vol. 577, pp. 135–154, 2009.
- 255.** Koo J, Kim K, Min B, Lee GM. Differential protein expression in human articular chondrocytes expanded in serum-free media of different medium osmolalities by DIGE *Journal of Proteome Research*, 9; 5, 2480-2487, 2010.
- 256.** Lopez JL. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 849; 1-2, 190-202, 2007.
- 257.** Ettre LS. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) *Pure and Applied Chemistry*, 1993, Volume 65, No. 4, pp. 819 -872.
- 258.** Kočová Vlčková H, Pilařová V, Svobodová P, Plíšek J, Švec F, Nováková L Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis. *Analyst*. 2018 Mar 12; 143(6): 1305-1325.
- 259.** Christof Lenz and Hassan Dihazi. Introduction to Proteomics Technologies Issaq HJ, Chan KC, Janini GM et al Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B*, 2005, 817:35-47.
- 260.** Giddings JC. Two dimensional separations: concept and promise. *Anal Chem*, 1984, 56:1258A–1264A.
- 261.** Cortes HJ (ed) (1990) *Multidimensional chromatography. Techniques and applications*. Marcel Dekker, New York.
- 262.** Anderegg RJ, Wagner DS, Blackburn RK, Opitck GJ, Jorgenson JW. A multidimensional approach to protein characterization. *J Protein Chem*, 1997,16:523-526.
- 263.** Neverova I, Van Eyk JE Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B*, 2005, 815:51–63.
- 264.** Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-throughput proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2014; 7:427-54. doi: 10.1146/annurev-anchem-071213-020216.
- 265.** Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23;190(4):491-500.

- 266.** Alexandridou A, Tsangaris GT, Vougas K, Nikita K, Spyrou G. UniMaP: finding unique mass and peptide signatures in the human proteome. *Bioinformatics*. 2009; 22:3035-7.
- 267.** Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*, 2015,61:100–111.
- 268.** Hines WM, Parker K, Peltier J et al Protein identification and protein characterization by high-performance time-of-flight mass spectrometry. *J Protein Chem*, 1998, 17:525–526.
- 269.** Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
- 270.** Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 919:157-169.
- 271.** Neagu AN, Jayathirtha M, Baxter E, Donnelly M, Petre BA, Darie CC. Applications of Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) in Protein Analysis for Biomedical Research. *Molecules*. 2022 Apr 8; 27(8):2411. doi: 10.3390/molecules27082411.
- 272.** Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli R, et al. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10:889.
- 273.** Scigelova M, Hornshaw M, Giannakopoulos A, Makarov A. Fourier transform mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2011; 7:111.
- 274.** Kline KG, Sussman MR. Protein quantitation using isotope-assisted mass spectrometry. *Annu Rev Biophys*. 2010; 39:291-308.
- 275.** Griffin M, J. Yu, F. Long et al., “Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis,” *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 1, pp. 83–89, 2010.
- 276.** Huang SK., Darfler MM., Nicholl MB. et al., “LC/MS-based quantitative proteomic analysis of paraffin-embedded archival melanomas reveals potential proteomic biomarkers associated with metastasis,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 2, Article ID e4430, 2009.
- 277.** Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR., Mann M. “uper-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature Methods*, vol. 7, no. 5, pp. 383–385, 2010.

- 278.** Ye X, Luke B, Andresson T, Blonder J. <sup>18</sup>O stable isotope labeling in MS-based proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, vol. 8, no. 2, pp. 136–144, 2009.
- 279.** Ross P.L, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using aminereactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 3, no. 12, pp. 1154–1169, 2004.
- 280.** Thompson A, Schafer J, Kuhn K et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 8, pp. 1895–1904, 2003.
- 281.** Moulder R, Bhosale SD, Goodlett DR, Laheesmaa R. Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling. *Mass Spectrom Rev.* 2018 Sep; 37(5): 583-606.
- 282.** Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: work flows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods.* 2012 May 30;9(6):555-66.
- 283.** Mavreli D, Theodora M, Kolialexi A. Known biomarkers for monitoring pregnancy complications. *Expert Rev Mol Diagn.* 2021 Nov; 21(11):1115-1117.
- 284.** White MY, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: past, present, and future. *Mol Diagn Ther*, 11(2): 83-95, 2007.
- 285.** Castiglione V, Aimò A, Vergaro G, Saccaro L, Passino C, Emdin M. Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2022 Mar;27(2):625-643.
- 286.** Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JI, Barderas MG, Blanco-Colio LM, Duran MC, Martín-Ventura JL, Vivanco F, Egido J. Proteomic approach in the search of new cardiovascular biomarkers. *Kidney Int Suppl.* 2005 Dec;(99): S103-7.
- 287.** Durán MC, Martín-Ventura JL, Mohammed S, Barderas MG, Blanco-Colio LM, Mas S, Moral V, Ortega L, Tuñón J, Jensen ON, Vivanco F, Egido J. Atorvastatin modulates the profile of proteins released by human atherosclerotic plaques. *Eur J Pharmacol.* 2007 May 7;562(1-2):119-29.
- 288.** Chen, Y.T., Chen, H.W., Wu, C.F., Chu, L.J., Chiang, W.F., Wu, C.C., Yu, J.S., Tsai, C.H., Liang, K.H., and Chang, Y.S. (2017). Development of a multiplexed LC-MRM/MS method for evaluation of salivary proteins as oral cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. Mayo S, Benito-León J, Peña-Bautista C, Baquero M, Cháfer-Pericás C. Recent Evidence in Epigenomics and Proteomics Biomarkers for Early and Minimally

Invasive Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2021; 19(8):1273-1303.

**289.** Whelan CD, Mattsson N, Nagle MW, Vijayaraghavan S, Hyde C, Janelidze S, Stomrud E, Lee J, Fitz L, Samad TA, Ramaswamy G, Margolin RA, Malarstig A, Hansson O. Multiplex proteomics identifies novel CSF and plasma biomarkers of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Nov 6; 7(1):169.

**290.**

**291.** Kolialexi A, Mavreli D, Papantoniou N. Proteomics for early prenatal screening of pregnancy complications: a 2017 perspective. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Feb;14(2):113-11.

**292.** Vascotto C, Salzano AM, D'Ambrosio C, Fruscalzo A, Marchesoni D, di Loreto C, Scaloni A, Tell G, Quadrifoglio F. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *J Proteome Res*, 6:160-170, 2007.

**293.** Park JS, Oh KJ, Norwitz ER, Han JS, Choi HJ, Seong HS, Kang YD, Park CW, Kim BJ, Jun JK, Syn HC. Identification of proteomic biomarkers of preeclampsia in amniotic fluid using SELDI-TOF mass spectrometry. *Reprod Sci*, 15(5):457-68, 2008.

**294.** Buhimschi IA, Zhao G, Funai EF, Harris N, Sasson IE, Bernstein IM, Saade GR, Buhimschi CS. Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 199(5): 551.e1-16, 2008.

**295.** Blankley RT, Fisher C, Westwood M, et al. A label-free selected reaction monitoring workflow identifies a subset of pregnancy specific glycoproteins as potential predictive markers of early-onset pre-eclampsia. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12:3148–3159.

**296.** Anand S, Bench Alvarez TM, Johnson WE, et al. Serum biomarkers predictive of pre-eclampsia. *Biomark Med*. 2015; 9:563–575.

**297.** Kim SM, Cho B-K, Kang MJ, et al. Expression changes of proteins associated with the development of preeclampsia in maternal plasma: a case-control study. *Proteomics*. 2016; 16:1581–1589.

**298.** Kolla V, Jenö P, Moes S, et al. Quantitative proteomic (iTRAQ) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:1-8.

**299.** Kolialexi A, Tsangaris GT, Sifakis S, Gourgiotis D, Katsafadou A, Lykoudi A, Marmarinos A, Mavreli D, Pergialiotis V, Fexi D, Mavrou A, Papaioanou GK,

- Papantoniou N. Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Mar;14(3):269-276.
300. Bernea EG, Uyy E, Mihai DA, Ceausu I, Ionescu-Tirgoviste C, Suica VI, Ivan L, Antohe F. New born macrosomia in gestational diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2022 Oct 5;24(6):710. doi: 10.3892/etm.2022.11646.
301. Mavreli D, Evangelinakis N, Papantoniou N, Kolialexi A. Quantitative Comparative Proteomics Reveals Candidate Biomarkers for the Early Prediction of Gestational Diabetes Mellitus: A Preliminary Study. *In Vivo*. 2020 Mar-Apr;34(2):517-525.
302. Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, Reddy AP, Jacob T, Turner M, et al. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel bio-markers. *JAMA* 2004;28: 462-9.
303. Bujold E, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Chaiworapongsa T, et al. Proteomic profiling of amniotic fluid in preterm labor using two-dimensional liquid separation and mass spectrometry. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21:697-713.
304. Rüetschi U, Rosén A, Karlsson G, Zetterberg H, Rymo L, Hagberg H, et al. Proteomic analysis using protein chips to detect biomarkers in cervical and amniotic fluid in women with intra-amniotic inflammation. *J Proteome Res* 2005; 4:2236-42.
305. Park SJ, Yoon WG, Song JS, Jung HS, Kim CJ, Oh SY, Yoon BH, Jung G, Kim HJ, Nirasawa T. Proteome analysis of human amnion and amniotic fluid by two-dimensional electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*, 6:349-363, 2006.
306. Hitti J, Lapidus JA, Lu X, Reddy AP, Jacob T, Dasari S, Eschenbach DA, Gravett MG, Nagalla SR. Noninvasive diagnosis of intraamniotic infection: proteomic biomarkers in vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Jul;203(1): 32.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2010.03.037.
307. Buhimschi IA, Christner R, Buhimschi CS. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG* 2005;112: 173-81.
308. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Christner R, Weiner CP. Proteomics technology for the accurate diagnosis of inflammation in twin pregnancies. *BJOG* 2005; 112:250-5.
309. Buhimschi CS, Weiner CP, Buhimschi IA. Proteomics, part II: the emerging role of proteomics over genomics in spontaneous preterm labor/birth. *Obstet Gynecol Surv* 2006; 61:543-53.

310. Abdel-Razeq SS, Buhimschi IA, Bahtiyar MO, Rosenberg VA, Dulay AT, Han CS, et al. Interpretation of amniotic fluid white blood cell count in “bloody tap” amniocenteses in women with symptoms of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010; 116:344-54.
311. Buhimschi CS, Bhandari V, Dulay AT, Nayeri UA, Abdel-Razeq SS, Pettker CM, et al. Proteomics mapping of cord blood identifies haptoglobin “switch-on” pattern as biomarker of early-onset neonatal sepsis in preterm newborns. *PLoS One* 2011; 10:e26111.
312. Buhimschi CS, Buhimschi IA, Abdel-Razeq S, Rosenberg VA, Thung SF, Zhao G, et al. Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res* 2007; 61:318-24.
313. Pereira L, Reddy AP, Jacob T, Thomas A, Schneider KA, Dasari S, et al. Identification of novel protein biomarkers of preterm birth in human cervical-vaginal fluid. *J Proteome Res* 2007; 6:1269-76.
314. Butt RH, Lee MW, Pirshahid SA, Backlund PS, Wood S, Coorsen JR. An initial proteomic analysis of human preterm labor: placental membranes. *J Proteome Res* 2006; 5:3161-72.
315. Vuadens F, Benay C, Crettaz D, Gallot D, Sapin V, Schneider P, et al. Identification of biologic markers of the premature rupture of fetal membranes: proteomic approach. *Proteomics* 2003; 3:1521-5.
316. Romero R, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, et al. Isobaric labeling and tandem mass spectrometry: a novel approach for profiling and quantifying proteins differentially expressed in amniotic fluid in preterm labor with and without intra-amniotic infection/inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 4:261-80
317. Romero R, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Gomez R, et al. Metabolomics in premature labor: a novel approach to identify patients at risk for preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 12:1344-59.
318. Gunko V. O., Pogorelova T. N., Linde V. A. Proteomic profiling of the blood serum for prediction of premature delivery. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;161(6):829–832. doi: 10.1007/s10517-016-3522-z.
319. Frey HA, Klebanoff MA. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016 Apr;21(2):68-73.

320. Pey Yee Lee 1, Junaida Osman 1, Teck Yew Low 1, Rahman Jamal 1 Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery DOI: 10.4155/bio-2019-0145.
321. Guerrier L, Righetti PG, Boschetti E (2008) Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. *Nat Protoc* 3:883–890.
322. Bradford MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. [*Anal Biochem.* 1976 May 7; 72:248-54.
323. WHO: International statistical classification of diseases and related health problems 10th revision, Vol.2, WHO, Geneva, Switzerland 1993.
324. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, et al. g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1): W191-W198.
325. Wang J, Vasaiakar S, Shi Z, et al. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 3;45(W1): W130-W137.
326. Khodadadi A, Madani R, Hoghooghi Rad N, Atyabi N Development of Nano-ELISA Method for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis in Mice. *Arch Razi Inst.* 2021 Jan;75(4):419-426.
327. Karimollah Hajian-Tilaki, PhD\* Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013 Spring; 4(2): 627–635.
328. Julien I.E. Hoffman, *Logistic Regression in Basic Biostatistics for Medical and Biomedical Practitioners (Second Edition)*, 2019
329. Greco E, Lange A, Ushakov F, Calvo JR, Nicolaides KH. Prediction of spontaneous preterm delivery from endocervical length at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011 Jan;31(1):84-9.
330. Li Y, Fu X, Guo X, Liang H, Cao D, Shi J. Maternal preterm birth prediction in the United States: a case-control database study. *BMC Pediatr.* 2022 Sep 14;22(1):547.
331. Lygirou V, Makridakis M, Vlahou A. Biological sample collection for clinical proteomics: existing SOPs. *Methods Mol Biol.* 2015; 1243:3.
332. Tammen H. Specimen collection and handling: standardization of blood sample collection. *Methods Mol Biol.* 2008;428:35-42.

- 333.** Omenn GS, Menon R, Adamski M, Blackwell T, Haab BB, Gao W, States DJ (2007) The human plasma and serum proteome. In: Thongboonkerd V (ed) Proteomics of human body fluids. Humana, Totowa
334. Candiano G, Dimuccio V, Bruschi M, et al. Combinatorial peptide ligand libraries for urine proteome analysis: investigation of different elution systems. *Electrophoresis* 2009, 30(14):2405-11. doi: 10.1002/elps.200800762.
335. Di Girolamo F, Boschetti E, Chung MC et al. "Proteomineering" or not? The debate on biomarker discovery in sera continues. *J Proteomics*. 2011 May 1;74(5):589-94. doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.013
336. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Feb;2(2):140-50.
- 337.** Bose U, Wijffels G, Howitt CA, Colgrave ML. Proteomics: Tools of the Trade. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1073:1-22.
- 338.** Gobel K, Eichler S, Wiendl H, Chavakis T, Kleinschnitz C, Meuth SG. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders-A Systematic Review. *Front Immunol*. 2018; 9:1731. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731> PMID: 30105021.}
- 339.** Lynch AM, Wagner BD, Deterding RR, Giclas PC, Gibbs RS, Janoff EN, et al. The relationship of circulating proteins in early pregnancy with preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 214(4):517 e1– e8].
- 340.** Elovitz MA, Baron J, Phillippe M. The role of thrombin in preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185(5):1059–63
341. Lee JE, Park KH, Kim HJ, et al. Proteomic identification of novel plasma biomarkers associated with spontaneous preterm birth in women with preterm labor without infection/inflammation. *PLoS One*. 2021;16(10):e0259265.
342. Gibbs RS. Management of clinical chorioamnionitis at term. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):1-2.
343. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol*. 2010 Aug;47(13):2187–2197.
344. Schramm EC, Clark SJ, Triebwasser MP, Raychaudhuri S, Seddon JM, Atkinson JP. Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration: a review. *Mol Immunol*. 2014 Oct;61(2):118–125.
345. Kilpatrick DC, Chalmers JD. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:138797.



346. Gajek G, Świerzko AS, Jarych D, Mikulski D, Kobiela P et al. Association of low ficolin-2 concentration in cord serum with respiratory distress syndrome in preterm newborns. *Front Immunol*. 2023 Jan 17;14:1107063.
347. Wang CC, Yim KW, Poon TC, Choy KW, Chu CY, Lui WT, Lau TK, Rogers MS, Leung TN. Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia. *Clin Chem*. 2007 Jan;53(1):42-52.
348. Bartha JL, Fernandez-Deudero A, Bugatto F, et al. Inflammation and cardiovascular risk in women with preterm labor. *J Womens Health (Larchmt)*. 2012 Jun;21(6):643-8.
349. Docheva N, Romero R, Chaemsaitong P, et al. The profiles of soluble adhesion molecules in the "great obstetrical syndromes"(). *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019 Jul;32(13):2113-2136.
350. Coata G, Pennacchi L, Bini V, et al. Soluble adhesion molecules: marker of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2002 Jul;12(1):28-34.
351. Golubinskaya V, Puttonen H, Fyhr IM, Rydbeck H, Hellstrom A, Jacobsson B, et al. Expression of S100A Alarmins in Cord Blood Monocytes Is Highly Associated With Chorioamnionitis and Fetal Inflammation in Preterm Infants. *Front Immunol*. 2020;11:1194. doi: 10.3389/fimmu.2020.01194.
352. Erez O, Romero R, Tarca AL, Chaiworapongsa T, Kim YM, Than NG, et al. Differential expression pattern of genes encoding for anti-microbial peptides in the fetal membranes of patients with spontaneous preterm labor and intact membranes and those with preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(12):1103–15.
- 353.** Hao K, Wang X, Niu T, Xu X, Li A, Chang W, et al. A candidate gene association study on preterm delivery: application of high-throughput genotyping technology and advanced statistical methods. *Human molecular genetics*. 2004;13(7):683–91.
- 354.** Averill MM, Barnhart S, Becker L, Li X, Heinecke JW, Leboeuf RC, et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation*. 2011;123(11):1216–26.
- 355.** Yan X, Payet LD, Baxter RC, Firth SM. Activity of human pregnancy insulin-like growth factor binding protein-3: determination by reconstituting recombinant complexes. *Endocrinology*. 2009 Nov;150(11):4968-76.

- 356.** Vannucci L, Frigenti L, Fausone-Pellegrini MS. From conception to birth: ancient library sources of embryology and women anatomy kept in the Biblioteca Biomedica of the Università degli Studi di Firenze (Biomedical Library of Florence University). *Ital J Anat Embryol* 2011;116:93–103.
- 357.** Sandri S, Urban Borbely A, Fernandes I, de Oliveira EM, Knebel FH, Ruano R, Zugaib M, Filippin-Monteiro F, Bevilacqua E, Campa A. Serum amyloid A in the placenta and its role in trophoblast invasion. *PLoS One*. 2014 Mar 10;9(3):e90881.
- 358.** Meigs JB, Hu FB, Rifai N, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):1978-86.
- 359.** Vrachnis N, Zygouris D, Vrachnis D, et al. Perinatal Inflammation: Could Partial Blocking of Cell Adhesion Molecule Function Be a Solution? *Children (Basel)*. 2021 May 12;8(5).
- 360.** Chen S, Liu B, Li J, et al. Talin1 regulates endometrial adhesive capacity through the ras signaling pathway. *Life Sci* 2021 Jun 1;274: 119332.
- 361.** Slater M, Cooper M, Murphy CR. The cytoskeletal proteins alpha-actinin, ezrin, and talin are de-expressed in endometriosis and endometrioid carcinoma compared with normal uterine epithelium. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15(2):170–174.
- 362.** Shen Y, Qin A. Regulation of embryonic signal on Talin1 in mouse endometrium. *Reprod Sci*. 2019;26(9): 1277–1286.
- 363.** Tang X, Li Q, Li L, et al. Expression of talin-1 in endometriosis and its possible role in pathogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19(1):42.
- 364.** Monkley SJ, Zhou XH, Kinston SJ, Giblett SM, Hemmings L, Priddle H, Brown JE, Pritchard CA, Critchley DR, Fässler R. Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev Dyn*. 2000 Dec;219(4):560-74

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### Έντυπο Συγκατάθεσης

Έντυπο Συγκατάθεσης Ασθενούς για συμμετοχή σε μελέτες για την ανίχνευση νέων βιολογικών δεικτών για τη πρώιμη πρόβλεψη επιπλοκών της κύησης

#### Συγκατάθεση για τη λήψη και αποθήκευση δείγματος αίματος

Δια του παρόντος δηλώνω ότι είμαι ικανοποιημένη με τις πληροφορίες που έχω λάβει, ότι έχω ενημερωθεί σχετικά με τις διαδικασίες που πρόκειται να υποβληθώ για την πραγματοποίηση λήψης αίματος, ότι κατανόησα ότι το δείγμα που θα ληφθεί θα χρησιμοποιηθεί για ερευνητικό σκοπό, για την ανίχνευση νέων βιολογικών δεικτών για τη πρώιμη ανίχνευση επιπλοκών της κύησης, στο περιφερικό αίμα. Τυχόν πλεονάζον βιολογικό υλικό θα φυλαχθεί στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα» 5 χρόνια, για μελλοντικές μελέτες στο γνωστικό αντικείμενο της Παθολογίας της κύησης. Ενημερώθηκα ότι έχω το δικαίωμα να ζητήσω την καταστροφή του δείγματός μου οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμώ. Δηλώνω ότι είχα τη δυνατότητα να κάνω τις ερωτήσεις που κρίνω κατάλληλες και ότι έχω λάβει επαρκείς απαντήσεις σε αυτές τις ερωτήσεις, καθώς και ότι κατανοώ το πεδίο εφαρμογής της διαδικασίας και επομένως,

- ΠΑΡΕΧΩ ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΚΑΙ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΑ ΤΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΠΡΩΙΜΗ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΕΠΙΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΟΠΩΣ ΠΕΡΙΓΡΑΦΕΤΑΙ ΠΑΡΑΠΑΝΩ.

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

Ον/μο ασθενούς \_\_\_\_\_ Υπογραφή ασθενούς \_\_\_\_\_ Ημ/νία \_\_\_\_\_

Ον/μο Ερευνητή \_\_\_\_\_ Υπογραφή \_\_\_\_\_

Ερευνητή \_\_\_\_\_ Ημ/νία \_\_\_\_\_

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### Έντυπο Ενημέρωσης

#### Φυλλάδιο Ενημέρωσης Ασθενή για συμμετοχή σε μελέτες για την ανίχνευση νέων βιολογικών δεικτών για τη πρόληψη επιπλοκών της κύησης

Σας έχει γίνει πρόταση να συμμετέχετε σε ερευνητικές μελέτες για την ανίχνευση νέων βιολογικών δεικτών για τη πρόληψη επιπλοκών της κύησης. Πριν αποφασίσετε αν θέλετε να συμμετέχετε σε αυτήν, είναι σημαντικό να κατανοήσετε τους λόγους για τους οποίους πραγματοποιείται και τι περιλαμβάνει. Παρακαλώ πολύ να αφιερώσετε λίγα λεπτά από το χρόνο σας για να διαβάσετε προσεκτικά τις πληροφορίες που παρατίθενται και να τις συζητήσετε με συγγενείς και φίλους, ακόμα και με τον θεράποντα ιατρό, αν θέλετε. Σε περίπτωση που έχετε οποιαδήποτε ερώτηση ή χρειάζεστε περισσότερες πληροφορίες, παρακαλώ μη διστάσετε να επικοινωνήσετε μαζί μας.

#### Ποιος είναι ο σκοπός της μελέτης;

Ο στόχος μας είναι να προσπαθήσουμε να αναγνωρίσουμε τις γυναίκες που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν κάποια επιπλοκή της κύησης (π.χ. προεκλαμψία, πρόωρο τοκετό, Σακχαρώδη Διαβήτη της κύησης) νωρίς στην κύηση.

#### Γιατί επιλέχθηκα εγώ;

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

#### Πρέπει να λάβω μέρος στη μελέτη;

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

#### Τι θα συμβεί σε εμένα, αν λάβω μέρος στη μελέτη;

Κατά τη διάρκεια της επίσκεψής σας, στην 11<sup>η</sup> – 13<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, θα μετρήσουμε το σωματικό βάρος και το ύψος σας και την αρτηριακή σας πίεση, ενώ παράλληλα θα εκτιμήσουμε τη ροή του αίματος στη μήτρα και τον πλακούντα, με υπερηχογράφημα Doppler. Τα αποτελέσματα των υπερηχογραφικών και βιοχημικών δεικτών θα και θα προσδιοριστεί ο κίνδυνος να εμφανίσετε προεκλαμψία.

Από το αίμα που θα ληφθεί, ένα μέρος θα χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη χρωμοσωμικών ανωμαλιών μέσω της πρωτεΐνης PAPP-A και β HCG. Σε περίπτωση που

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

Τι πρέπει να κάνω εγώ;

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

Η φύλαξη των αρχείων μου θα είναι εμπιστευτική;

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

Τι θα συμβεί με τα αποτελέσματα της μελέτης;

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

Ποιος έχει ελέγξει τη μελέτη;

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

